

**INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ**

**EXTRACTOS VEGETALES Y *Beauveria bassiana* COMO  
CONTROL BIOLÓGICO EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum  
lycopersicum* L.)**

**COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE:  
MAESTRO EN CIENCIAS DE INGENIERÍA BIOQUÍMICA**

**PRESENTA:**

**I.Q. JESÚS ADRIAN PÉREZ ROBLES**

**DIRECTOR DE TESIS:**

**DR. JOAQUÍN ADOLFO MONTES MOLINA**

**TUXTLA GUTIÉRREZ, CHIAPAS.**

**JUNIO 2020**



"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Tuxtla Gutiérrez, Chiapas **11/junio/2020**

OFICIO No. DEPI-405/2020.

**C. I.Q. JESÚS ADRIAN PÉREZ ROBLES  
PASANTE DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN INGENIERÍA BIOQUÍMICA  
EGRESADO DEL INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TUXTLA GUTIÉRREZ  
PRESENTE.**

Habiendo recibido la comunicación, por parte de los CC. DR. JOAQUIN ADOLFO MONTES MOLINA, DR. VICTOR MANUEL RUÍZ VALDIVIEZO, DRA. NANCY RUÍZ LAU. En el sentido, de que se encuentra satisfactorio el contenido de la tesis denominada "EXTRACTOS VEGETALES Y *Beauveria bassiana* COMO CONTROL BIOLÓGICO EN PLANTAS DE TOMATE (*Solanum lycopersicum L*)", elaborada por usted, como prueba escrita para obtener el Grado de Maestro en Ciencias en Ingeniería Bioquímica, AUTORIZAMOS a que se proceda a la impresión de la misma.

SIN MAS POR EL MOMENTO ENVIO UN CORDIAL SALUDO.

ATENTAMENTE.

Excelencia en Educación Tecnológica  
"Ciencia y Tecnología con Sentido Humano"

Vo. Bo.

**DR. JUAN JOSÉ VILLALOBOS  
MALDONADO  
JEFE DE LA DIVISION DE POSGRADO E  
INVESTIGACION.**



SECRETARÍA DE EDUCACIÓN  
PÚBLICA  
INSTITUTO TECNOLÓGICO  
DE Tuxtla Gutiérrez  
DIVISION DE ESTUDIOS DE  
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

**M.C. JOSÉ MANUEL ROSADO PÉREZ  
DIRECTOR.**

C.c.p. Servicios escolares  
C.c.p. Archivo



Carretera Panamericana Km. 1080, C. P. 29050, Apartado Postal 599, Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.  
Tel. (961) 61 5 04 61, 61 5 01 38, 61 5 48 08 Ext. 325 e-mail: posgrado@ittg.edu.mx  
www.tuxtla.tecnm.mx



ESTADO DE CHIAPAS  
2019-2022



APORTANDO  
EL PACTO GLOBAL

## AGRADECIMIENTOS

Al **Instituto de Ciencia, Tecnología e Innovación del estado de Chiapas (ICTI)** por la beca otorgada para la realización de mi tesis.

Al **Conejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT)** por brindarme los recursos económicos a través de la autorización de la beca (N° 887990) para llevar a cabo mis estudios de posgrado.

Al **Dr. Joaquín Adolfo Montes Molina** por brindarme la oportunidad y confianza de poder trabajar con él, por darme el apoyo, enseñanzas y respaldo como mi director de tesis en todo momento que lo necesité ya que, sin todo eso, este trabajo no hubiese culminado de la manera correcta.

A la **Dra. Nancy Ruiz Lau** por todo el apoyo no solo académico que me brindó a lo largo de la maestría, siempre estuvo ahí para brindarme un espacio en su laboratorio, ayudarme a resolver mis dudas y principalmente a motivarme a hacer las cosas de manera correcta.

Al **Dr. Víctor Manuel Ruiz Valdiviezo** por darme el respaldo y apoyo en aperturarme las puertas de su laboratorio en todo momento, también por las sugerencias y la disponibilidad de su tiempo para aclarar las dudas del proyecto.

Al **Dr. José Miguel Culebro Ricaldi** por muy amablemente estar al pendiente del avance del proyecto, compartir sus conocimientos y brindarme muchos consejos indispensables, así como sugerencias para la realización del proyecto.

A la **Dra. Rosa Isela Cruz Rodríguez** por su disponibilidad para brindarme la asesoría necesaria, por proporcionarme materiales y reactivos que fueron de suma importancia para la realización de todo el proyecto.

## **DEDICATORIAS**

### **A Dios:**

Muchas gracias Señor por darme salud y tantas bendiciones en mi vida, por regalarme la capacidad como ser humano para aprender y comprender todas las cosas que necesité para realizar este proyecto de la mejor manera posible y guiar mi camino para lograr el objetivo soñado.

### **A mis padres:**

Gracias por ser mi sustento, estar todo el tiempo a mi lado, por apoyarme en todo momento y enseñarme lo que es el sentido de responsabilidad y la perseverancia para lograr las metas, por motivarme a ser mejor cada vez más y no ser conformista en la vida, todo lo que soy se los debo a ustedes dos y siempre, toda la vida les estaré agradecidos.

### **A mi familia:**

Les estoy muy agradecido ya que los momentos malos se olvidaban con la convivencia y el apoyo fraternal del hogar, gracias por esos momentos de alegrías que disipaban el estrés y el cansancio.

### **A mi novia:**

La mujer más importante en mi vida, gracias por recobrar en mi la esperanza de confiar en las personas, por brindarme tu lealtad incondicional, ya que siempre, en cada momento estuviste a mi lado, a pesar de todos los obstáculos tanto en momentos felices como en los difíciles, por darme tus palabras de aliento para hacer las cosas bien, pero principalmente por hacer de mi un mejor hombre.

## ABREVIATURAS

%	Porcentaje
°C	Grado centígrado
μL	Microlitro
ANOVA	Análisis de varianza
BSA	Albúmina sérica bovina
cm	Centímetro
ddt	Días después del trasplante
g	Gramo
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogeno
M	Molar
mg	Miligramo
min	Minutos
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Mili molar
nm	Nanómetros
pH	Potencial de hidrógeno
ROS	Especies Reactivas de Oxígeno
SPAD	Soil Plant Analysis Development
PDA	Papa Dextrosa Agar
pkat	Picokatal

## RESUMEN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) ha sido una hortaliza de gran importancia en el mundo, sin embargo, el hongo *Fusarium oxysporum* es una de las enfermedades más devastadoras que puede reducir significativamente su producción. Por tal motivo, en este estudio, se utilizaron extractos vegetales de *Azadirachta indica* A. Juss, *Piper auritum* Kunth, *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum y *Gliricidia sepium* para determinar la actividad fungicida contra el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, empleando la técnica de alimento envenenado en cajas Petri donde se inoculó en el centro un disco micelial del hongo patógeno, se llevó a cabo un diseño experimental simple con tres repeticiones. Los extractos que presentaron una mayor actividad antifúngica fueron usados en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) en conjunto con *Beauveria bassiana* para tratar de potencializar el efecto fungicida. El método de inoculación a las plantas fue una aplicación directa al suelo.

Se determinaron las actividades enzimáticas de glucanasas, quitinasas, peroxidasas y catalasas, así como la producción de metabolitos secundarios de fenoles y flavonoides en raíces de plantas de tomate a diversos días después del trasplante.

En este estudio se demostró que los extractos de *A. indica* y *P. auritum*, permitieron el crecimiento de *B. bassiana* y presentaron actividad fungistática con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* ya que se obtuvo un 42.10% y 26.43% de inhibición respectivamente a las 144 h, teniendo diferencia estadística significativa con respecto a los extractos de *G. sepium* y *T. peruviana*. Además, la aplicación de *B. bassiana* y extractos vegetales de *A. indica* y *P. auritum* en plantas de *S. lycopersicum* L. incrementa la concentración de la actividad enzimática y metabolitos secundarios, lo cual es de ayuda a la planta para la generación de mecanismos de defensa en presencia de un estrés.

Palabras clave: *Fusarium*, *Beauveria bassiana*, actividad enzimática, *Solanum lycopersicum* L.

## ABSTRACT

The tomato (*Solanum lycopersicum* L.) has been a vegetable of great importance in the world, however, the fungus *Fusarium oxysporum* is one of the most devastating diseases that can significantly reduce its production. For this reason, in this study, were used vegetable extracts of *Azadirachta indica* a. Juss, *Piper auritum* Kunth, *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum and *Gliricidia sepium* to determine fungicide activity against the phytopathogenic fungus *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, using the poisoned food technique in Petri boxes where a mycellial disc of the pathogenic fungus was inoculated at the center, a simple experimental design was carried out with three repetitions. Extracts that exhibited increased antifungal activity were used in tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) in conjunction with *Beauveria bassiana* to try to enhance the fungicide effect. The method of inoculation to plants was a direct application to the soil.

Enzymatic activities of glucanase, chitinase, peroxidase and catalase, as well as the production of secondary metabolites of phenols and flavonoids in tomato plant roots were determined several days after transplantation.

In this study it was shown that the extracts of *A. indica* and *P. auritum*, allowed the growth of *B. bassiana* and presented fungistatic activity with *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* as it obtained 42.10% and 26.43% inhibition respectively at 144 h, having significant statistical difference with respect to extracts of *G. sepium* and *T. peruviana*. In addition, the application of *B. bassiana* and vegetable extracts from *A. indica* y *P. auritum* in plants of *S. lycopersicum* L. increases the concentration of enzymatic activity and secondary metabolites, which is to help the plant for the generation of defense mechanisms in the presence of stress.

Keywords: *Fusarium*, *Beauveria bassiana*, enzymatic activity, *Solanum lycopersicum* L.

## ÍNDICE

ABREVIATURAS .....	5
RESUMEN .....	6
ABSTRACT .....	7
ÍNDICE DE CUADROS .....	11
ÍNDICE DE FIGURAS .....	12
1. INTRODUCCIÓN .....	14
2. ANTECEDENTES .....	16
2.1. El cultivo de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) .....	16
2.2. Plagas y enfermedades en el tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.) .....	17
2.2.1. El género <i>Fusarium</i> .....	18
2.2.1.1. Marchitamientos causados por <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .....	19
2.3 Interacción planta-patógeno .....	20
2.4. Defensas químicas de las plantas .....	22
2.4.1 Compuestos fenólicos .....	24
2.4.2. Presencia de flavonoides .....	26
2.5. Mecanismos de defensa de plantas contra patógenos .....	28
2.5.1. Peroxidasas .....	29
2.5.2. Catalasas .....	30
2.6. Control biológico .....	31
2.6.1. <i>Beauveria bassiana</i> .....	32
2.6.1.1. Mecanismos de <i>Beauveria bassiana</i> .....	33
2.7. Mecanismos de hongos para el control de enfermedades .....	34
2.7.1. $\beta$ -1,3-glucanasas .....	35
2.7.2. Quitinasas .....	37
2.8. Uso de extractos vegetales como control biológico .....	39
2.8.1 Neem ( <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.) .....	40
2.8.2 Hierba santa ( <i>Piper auritum</i> Kunth) .....	42
2.8.3 Cascabel ( <i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) K. Schum) .....	43
2.8.4. Matarratón ( <i>Gliricidia sepium</i> ) .....	44
3. JUSTIFICACIÓN .....	46

4. OBJETIVOS .....	47
4.1. Objetivo general.....	47
4.2. Objetivos específicos .....	47
5. METODOLOGÍA .....	48
5.1. Ubicación del experimento .....	48
5.2. Colecta y elaboración de los extractos vegetales .....	48
5.3. Material fúngico .....	49
5.4. Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de extractos vegetales .....	49
5.5. Prueba de antagonismo <i>in vitro</i> .....	50
5.5.1. Microscopía del halo de inhibición entre <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> y <i>Beauveria bassiana</i> .....	50
5.6. Evaluación <i>in vivo</i> al cultivo de <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	51
5.6.1. Material vegetal.....	51
5.7. Unidades experimentales y tratamientos.....	51
5.8. Preparación de solución fúngica de <i>Beauveria bassiana</i> .....	52
5.9. Preparación de solución fúngica de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .....	52
5.10. Aplicación de <i>Beauveria bassiana</i> en cultivos de <i>Solanum lycopersicum</i> L. .	53
5.11. Aplicación de extractos vegetales en cultivos de <i>Solanum lycopersicum</i> L..	53
5.12. Inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> en cultivos de <i>Solanum lycopersicum</i> L. ....	53
5.13. Efecto de <i>B. bassiana</i> y los extractos vegetales sobre <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> en las variables morfométricas de las plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. ....	53
5.14. Evaluación de la actividad enzimática en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. ....	54
5.15. Cuantificación de quitinasas.....	55
5.15.1 Cuantificación de $\beta$ -1,3-glucanasas .....	56
5.15.2 Cuantificación de peroxidasas .....	56
5.15.3 Cuantificación de catalasas .....	57
5.16. Evaluación de metabolitos secundarios en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. ....	57
5.16.1. Cuantificación de fenoles totales .....	57
5.16.2. Cuantificación de flavonoides .....	58
5.17. Diseño experimental y análisis estadístico .....	58

<b>6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN</b> .....	59
6.1. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antifúngica de los extractos vegetales en presencia de <i>Beauveria bassiana</i> .....	59
6.2. Evaluación <i>in vitro</i> de la actividad antifúngica de los extractos vegetales en presencia de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .....	61
6.3. Antagonismo <i>in vitro</i> por confrontación de <i>Beauveria bassiana</i> y <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .....	64
6.4. Microscopía del halo de inhibición.....	65
6.5. Efecto de <i>Beauveria bassiana</i> y extractos vegetales en las plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. inoculadas con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .....	66
6.6. Actividad enzimática en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. ....	70
6.6.1. Actividad de $\beta$ -1,3-glucanasas.....	70
6.6.2. Actividad de quitinasas .....	75
6.6.3. Actividad de peroxidasas.....	80
6.6.4. Actividad de catalasas.....	83
6.7. Metabolitos secundarios en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L.....	85
6.7.1. Cuantificación de fenoles totales .....	85
6.7.2. Cuantificación de flavonoides .....	88
<b>7. CONCLUSIONES</b> .....	91
<b>8. REFERENCIAS</b> .....	92

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Clasificación taxonómica de tomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> L.).....	17
<b>Cuadro 2.</b> Clasificación taxonómica de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .....	19
<b>Cuadro 3.</b> Clasificación taxonómica de <i>Beauveria bassiana</i> .....	33
<b>Cuadro 4.</b> Clasificación taxonómica de <i>Azadirachta indica</i> A. Juss .....	41
<b>Cuadro 5.</b> Clasificación taxonómica de <i>Piper auritum</i> Kunth .....	43
<b>Cuadro 6.</b> Clasificación taxonómica de <i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) K. Schum.....	44
<b>Cuadro 7.</b> Clasificación taxonómica de <i>Gliricidia sepium</i> .....	45
<b>Cuadro 8.</b> Nomenclatura empleada para los tratamientos.....	51
<b>Cuadro 9.</b> Efecto de los extractos sobre el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .....	62
<b>Cuadro 10.</b> Efecto de los extractos sobre el porcentaje de inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .....	63
<b>Cuadro 11.</b> Efecto de <i>Beauveria bassiana</i> y extractos vegetales en las variables morfométricas de las plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. ....	67

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Estructura del fenol .....	25
<b>Figura 2.</b> Estructura básica de los flavonoides .....	27
<b>Figura 3.</b> Efecto en el crecimiento micelial de <i>Beauveria bassiana</i> en presencia de los extractos vegetales.....	60
<b>Figura 4.</b> Efecto de <i>Beauveria bassiana</i> sobre el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .....	64
<b>Figura 5.</b> Interacción de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> y <i>Beauveria bassiana</i> .....	65
<b>Figura 6.</b> Efectos en plantas de <i>S. lycopersicum</i> L. infectadas con <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> .....	69
<b>Figura 7.</b> Efecto de <i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> en la raíz y follaje de plantas de <i>S. lycopersicum</i> L.....	70
<b>Figura 8.</b> Actividad de $\beta$ -1,3-glucanasas en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. a los 50 ddt. ....	71
<b>Figura 9.</b> Actividad de $\beta$ -1,3-glucanasas en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. a los 82 ddt.....	72
<b>Figura 10.</b> Actividad de $\beta$ -1,3-glucanasas en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. a los 114 ddt.....	73

<b>Figura 11.</b> Actividad de quitinasas en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. a los 50 ddt. ....	75
<b>Figura 12.</b> Actividad de quitinasas en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. a los 82 ddt. ....	76
<b>Figura 13.</b> Actividad de quitinasas en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. a los 114 ddt. ....	77
<b>Figura 14.</b> Actividad de peroxidases en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. a los 114 ddt.....	80
<b>Figura 15.</b> Actividad de catalasas en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. a los 114 ddt. ....	83
<b>Figura 16.</b> Cuantificación de fenoles totales en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. a los 82 ddt. ....	85
<b>Figura 17.</b> Cuantificación de fenoles totales en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. a los 114 ddt. ....	86
<b>Figura 18.</b> Cuantificación de flavonoides en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. a los 82 ddt. ....	88
<b>Figura 19.</b> Cuantificación de flavonoides en raíces de plantas de <i>Solanum lycopersicum</i> L. a los 114 ddt. ....	89

## 1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es considerado una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo, ocupando el segundo lugar sólo superado por el cultivo de la papa (Gonzales y Peteira, 2012). Primeramente, fue domesticado y cultivado en América Central por las primeras civilizaciones indígenas de México, posteriormente introducido en España e Italia y a mitad del siglo XVI a otros países europeos.

China es el primer productor en el mundo, con 50,125,055 toneladas, el 23.75% del total. (Gálvez, 2015). El Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) publicó el cierre del año 2016 para México una producción de 3.3 millones de toneladas; el avance al mes de julio 2017, registra 1.6 millones de toneladas, 17.8% más que la obtenida al mismo mes del año anterior.

Los tomates son frutos importantes en muchos países, sin embargo, para mantenerlos frescos se requiere una alta humedad, lo que promueve el crecimiento de hongos patógenos como *Alternaria alternata*, *Fusarium* sp., *Fusarium oxysporum*, entre otros, que causan pudrición, una de las principales enfermedades en el tomate, la cual se presenta posterior a la cosecha, causando grandes pérdidas (Hanaa *et al.*, 2011; Shixiang *et al.*, 2013). La producción de tomate a menudo se reduce de 30 a 40%, sin embargo, a veces puede alcanzar hasta 80% (Nirmaladevi *et al.*, 2016).

El hongo *Fusarium oxysporum* transmitido por el suelo es una de las enfermedades más devastadoras que ocupa el quinto lugar en hongos fitopatógenos, que puede reducir significativamente la producción de tomate (Dean *et al.*, 2012).

El control biológico, representa una estrategia innovadora para el manejo de enfermedades de plantas de importancia agrícola (Nava, *et al.*, 2012). El uso concreto de organismos que interfieren con los patógenos y plagas de las plantas es un enfoque amigable con la naturaleza, ecológico para superar los problemas causados por métodos químicos estándar de protección de las plantas (Borkvich y Ebbole, 2010).

El control biológico de fitopatógenos se basa en la utilización de microorganismos antagonistas presentes en la microbiota del suelo capaces de disminuir la actividad del agente fitopatógeno, como parte del manejo integrado de enfermedades de plantas, lo cual hace necesario el conocimiento de los microorganismos benéficos y sus mecanismos de acción (Pal y McSpadden, 2006).

El empleo de extractos vegetales para el control de plagas y enfermedades en el marco de una agricultura sostenible constituye una alternativa promisoriosa, debido a su elevada efectividad, bajo costo y no ser contaminantes del ambiente, además de evitar el desarrollo a la resistencia (Rodríguez *et al.*, 2000).

La simbiosis entre plantas y hongos ascomicetos entomopatógenos como *Beauveria bassiana*, se ha convertido en un área importante de estudio en la protección de cultivos, la agronomía y la ecología en los últimos años. La simbiosis de ascomicetos entomopatógenos puede impactar positivamente crecimiento de las plantas, resistencia contra las plagas de invertebrados y hongos patógenos (Quesada *et al.*, 2014).

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1. El cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es una planta hortícola anual con una gran distribución mundial y un valor económico elevado, gracias a su gran contenido en compuestos antioxidantes presenta una serie de efectos beneficiosos para la salud a través de su consumo (Bilton *et al.*, 2001). Es la hortaliza más popular y difundida mundialmente, por lo tanto, la de mayor valor económico. Su demanda aumenta continuamente en todo el mundo, y con ella su cultivo, producción y comercio (Gálvez, 2015).

El tomate es una planta de la familia de las Solanáceas, la especie típica es *Solanum lycopersicum* L. que se caracteriza por su fruto jugoso, de epidermis rojiza y agradable sabor. La planta es anual, con un ciclo vegetativo completo de 4 a 6 meses según la variedad (Las diferencias en las condiciones agroclimáticas y las fuerzas microevolutivas han dado lugar a una gran diversidad fenotípica en las variedades de tomate, con una gran diversidad en tamaño del fruto, forma y color), se cultiva en todas las regiones tropicales, subtropicales y templadas del mundo. La consistencia es herbácea con tallos y hoja pubescentes de longitud y porte variable (Díez y Nuez, 2008; Rodríguez *et al.*, 2005; Figása *et al.*, 2015). Los tomates contienen grandes cantidades de vitamina C (40% del valor diario recomendado), 15% de vitamina A, 8% de potasio y, 7 a 10% de hierro recomendado para mujeres y hombres respectivamente (Bhowmik *et al.*, 2012).

El tomate es considerado como una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo, por el gran número de productos que se obtienen. La producción de tomate se concentra en cinco estados de México que generan 54% del volumen nacional. Sinaloa mantiene el liderazgo en la producción con 23% del total, le siguen San Luis Potosí con 11%, Michoacán 8% y Zacatecas 6%. (SIAP 2017).

**Cuadro 1. Clasificación taxonómica de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Viridiplantae</i>
<b>Infrareino</b>	<i>Streptophyta</i>
<b>Superdivisión</b>	<i>Embryophyta</i>
<b>División</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Subdivisión</b>	<i>Spermatophytina</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Asteranae</i>
<b>Orden</b>	<i>Solanales</i>
<b>Familia</b>	<i>Solanaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Solanum</i> L.
<b>Especie</b>	<i>Solanum lycopersicum</i> L.

Fuente: NCBI (2019)

## **2.2. Plagas y enfermedades en el tomate (*Solanum lycopersicum* L.)**

Los marchitamientos vasculares se encuentran entre las enfermedades de las plantas más difíciles de controlar. El hecho de que una sola infección de una planta por una espora es suficiente para introducir al patógeno en ella (en la que se desarrolla y propaga internamente), hace que la prevención de la infección y su posterior control con fungicidas de contacto sea prácticamente imposible e ineficaz (Jaramillo *et al.*, 2007)

Los marchitamientos se deben a la presencia y actividades del patógeno en los tejidos vasculares xilémicos de las plantas. En pocas semanas el patógeno puede ocasionar la muerte de plantas completas o de sus órganos que se localizan por arriba del punto de invasión vascular en la mayoría de las plantas anuales y algunas perennes, Por lo común, el patógeno continúa propagándose internamente en forma de micelio o conidios a través de los vasos xilémicos hasta que muere toda la planta. En tanto la planta infectada continúe viviendo, el hongo que produce los marchitamientos vasculares se limita a los tejidos vasculares (xilema) y a algunas células circunvecinas y nunca sale a la superficie de la planta, incluso tampoco produce esporas. Sólo

cuando la enfermedad ocasiona la muerte de una planta infectada, el hongo se propaga hacia otros tejidos y esporula en la planta muerta o sobre la superficie de ésta (Agrios, 2005).

La marchitez vascular del tomate producida por el hongo *Fusarium*, es una enfermedad importante en el mundo, el patógeno causa pudrición radical y lesiones necróticas extensivas en el cuello y base del tallo, marchitez y muerte. Las lesiones necróticas con frecuencia ascienden hasta 30 cm a partir del cuello de la planta, las cuales mueren generalmente al inicio de la maduración de los frutos, causando la pérdida total de la producción (Morales *et al.*, 2014).

Particularmente, *Fusarium oxysporum* es un hongo cosmopolita que existe en muchas formas patogénicas, parasitando más de 100 especies de plantas gimnospermas y angiospermas, gracias a los diversos mecanismos que tiene el hongo para vencer las defensas de muchas plantas (Bosland 1988).

### **2.2.1. El género *Fusarium***

El género *Fusarium* es un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidos en el suelo y plantas. Debido a su capacidad de crecer a 37°C, son considerados oportunistas (Leslie *et al.*, 2006). Se caracteriza por producir colonias de rápido crecimiento, con una tasa diaria cercana a un centímetro en medio papa dextrosa agar (PDA) a 25 °C. La morfología de las colonias es muy variable y puede presentar dos tipos: una de tipo micelial caracterizada por la producción de abundante micelio aéreo, algodonoso, con una coloración variable, de blanco a rosado durazno, pero usualmente con un tinte púrpura o violeta más intenso en la superficie del agar y pocas microconidias (Garcés *et al.*, 2001).

Este patógeno produce tres tipos de esporas asexuales. Los microconidios, que tienen de una a dos células son las esporas que el hongo produce con una mayor frecuencia y en mayor abundancia en todas las condiciones. Los macroconidios, son las esporas típicas de "*Fusarium*", están constituidos de tres a cinco células, se adelgazan

gradualmente y se encorvan hacia ambos extremos. El último tipo de espora son las clamidosporas, que están constituidas por una o dos células, son de pared gruesa y son esporas redondas que se forman terminal o intercaladamente en el micelio más viejo o en los macroconidios del hongo (Agrios, 2005).

**Cuadro 2. Clasificación taxonómica de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici***

<b>Dominio</b>	<i>Eukaryota</i>
<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>Subreino</b>	<i>Dikarya</i>
<b>División</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Subdivisión</b>	<i>Pezizomycotina</i>
<b>Clase</b>	<i>Sordariomycetes</i>
<b>Subclase</b>	<i>Hypocreomycetidae</i>
<b>Orden</b>	<i>Hypocreales</i>
<b>Familia</b>	<i>Nectriaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Fusarium</i>
<b>Especie</b>	<i>F. oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>

Fuente: NCBI (2019)

### **2.2.1.1. Marchitamientos causados por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici***

Es la principal enfermedad que causa problemas en el cultivo de tomate, disminuye en un 60% el rendimiento y afecta la calidad del producto. Esta enfermedad, ha sido reportado en por lo menos 32 países (Culebro-Ricaldi *et al.*, 2017), y prospera en una diversidad de condiciones ambientales desde trópicos secos hasta climas templados (Cai *et al.*, 2003).

El patógeno causa la enfermedad del marchitamiento vascular, es un organismo que habita en el suelo y que sobrevive entre los cultivos en los restos de plantas infectadas que yacen en el suelo en forma de micelio y en cualquiera de sus formas de esporas, pero lo hace con mayor frecuencia en forma de clamidosporas, es frecuente que una

vez que un área haya sido infectada por *Fusarium* se mantenga así por tiempo indefinido (Agrios, 2005).

Los primeros síntomas de la enfermedad se manifiestan en un ligero aclaramiento de las nervaduras de los folíolos jóvenes más externos, después de lo cual ocurre la epinastia de las hojas senescentes ocasionada por el debilitamiento de los pecíolos. Cuando las plantas son infectadas en la etapa de plántula, es frecuente que se marchiten y mueran poco después de haber aparecido los primeros síntomas (Agrios, 2005).

El micelio del hongo se propaga intercelularmente a través de la corteza de la raíz y cuando llega a los vasos xilémicos, entra en ellos a través de las punteaduras. Se mantienen en los vasos y viaja a través de ellos, principalmente en sentido ascendente, hacia el tallo y la corona de la planta. Cuando se encuentra en los vasos, dicho micelio se ramifica y produce microconidios que son desprendidos y llevados hacia la parte superior de la planta en el torrente de savia. Los microconidios germinan en el punto donde cesa su movimiento ascendente, el micelio penetra la pared superior del vaso y el hongo produce más microconidios en el siguiente vaso (Agrios, 2005; Pérez *et al.*, 2014).

Las especies de *Fusarium* causantes de marchitez siguen un patrón similar de infección; penetran por la raíz y colonizan en el tallo de las plantas el sistema vascular (Turlier *et al.*, 1994).

### **2.3 Interacción planta-patógeno**

Las plantas se encuentran en continuo contacto con otros organismos. Bajo condiciones naturales, ellas interactúan además con un gran número de microorganismos potencialmente patogénicos. Sin embargo, las plantas normalmente permanecen sanas debido, en parte, a la manifestación de varios mecanismos de defensa (Madriz-Ordeñaña., 2002).

Los mecanismos de defensa involucrados incluyen una combinación de cambios físicos, químicos y moleculares, tales como lignificación o la inducción de varias proteínas relacionadas con la patogénesis (Sánchez *et al.*, 2013).

El ataque de patógenos es una condición desfavorable que generalmente activa una serie de mecanismos de defensa cuyo fin es detener, aminorar o contrarrestar la infección. La activación de la defensa en plantas supone la existencia de mecanismos de reconocimiento mediante los cuales la planta determina la presencia del patógeno (Madriz-Ordeñaña., 2002).

Las interacciones entre una planta y un microorganismo pueden mostrar varios tipos que van desde las relaciones altamente perjudiciales para el hospedante, hasta aquellas que benefician tanto al hospedante como al microorganismo. Como consecuencia de una estrecha coevolución, muchos microorganismos se desarrollan de una forma patogénica solo en un ámbito limitado de hospedantes, frecuentemente a nivel de género, especie y subespecies. De forma similar, las especies y cultivares de plantas, por lo general son susceptibles solamente a pocas especies, aislamientos o razas de patógenos (Heath 2000a).

Los patógenos de plantas, incluyendo hongos que causan marchitamiento, secretan muchas enzimas que pueden contribuir a la virulencia. Estas incluyen enzimas que se dirigen a las barreras físicas, barreras químicas de las plantas y respuestas de defensa inducida (De Sain y Rep, 2015). Estas enzimas le permiten al hongo degradar constituyentes importantes de las barreras de protección externa de los hospederos, por lo cual puede penetrar y colonizar tejidos (Valencia *et al.*, 2011).

Como parásitos, los fitopatógenos están obligados a obtener los nutrimentos de fuentes existentes y para ello necesitan invadir y adaptarse al tejido del hospedante para eventualmente reproducirse. Además, necesitan evadir o contrarrestar los mecanismos de defensa de la planta (Madriz-Ordeñaña., 2002).

Un patógeno puede ser muy patogénico o poco patogénico para un hospedante dado. El grado de patogenicidad se define frecuentemente como virulencia. De esta forma,

y dependiendo de su habilidad de causar enfermedad, un patógeno puede ser altamente virulento para un hospedante y levemente virulento para otro (Collinge *et al.* 2001).

Una vez que el patógeno penetra la planta, ya sea a través de aperturas naturales (estomas), o atravesando directamente la pared celular, hay inducción de cambios en las células cercanas al invasor, y en la mayoría de los casos estos cambios bloquean el avance del patógeno (Puentes, 2019).

#### **2.4. Defensas químicas de las plantas**

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico, una de ellas es la producción de metabolitos secundarios con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros, o con actividad antioxidante (Croteau *et al.*, 2000).

Las barreras físicas y bioquímicas preformadas constituyen la primera línea de defensa de la plantas contra patógenos. Estas defensas pasivas incluyen la presencia de superficies preformadas de cera y paredes celulares, enzimas antimicrobiales y compuestos del metabolismo secundario (Thordal-Christensen, 2003; Mysore y Ryu, 2004).

Existe un extenso repertorio de metabolitos secundarios presentes en concentraciones variables, en todos los tejidos vegetales, cuya función primordial parece ser la defensa contra invasiones microbianas; estos compuestos se caracterizan por su estado permanente. Tienen por misión servir de barrera inicial a la propagación de bacterias u hongos dentro de los tejidos de la planta (Vivanco *et al.*, 2005).

Los metabolitos secundarios son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis

con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico.

Los metabolitos secundarios, en particular los alcaloides, fenoles, flavonoides y taninos, son compuestos químicos que intervienen en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente. Se sintetizan cuando las plantas están en condiciones adversas, entre ellas, el ataque por herbívoros, microorganismos y la presencia de diferentes especies que compiten por luz, agua y nutrientes (Sepúlveda *et al.*, 2003; Granados *et al.*, 2008).

Dentro de la compleja red de procesos bioquímicos de las plantas está la ruta fenilpropanoide, la cual aporta los compuestos más importantes con funcionalidad de defensa. Entre ellos se encuentran las cumarinas, ligninas, flavonoides, compuestos fenólicos y fitoalexinas. Estos compuestos tienen una variedad de funciones de tipo estructural en las plantas: en la membrana celular, la formación de pigmentos en frutas y flores, y el desarrollo de actividad directa contra la infección de hongos y bacterias, razón por la cual han sido involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas (Solecka y Kacperska, 2003; Sgarbi *et al.*, 2003).

Los flavonoides modulan la ingestión y el desarrollo de la oviposición en los insectos, la enzima polifenoloxidasa cataliza la oxidación de metabolitos secundarios fenólicos, resultando en quinonas sumamente reactivas, que se polimerizan en una goma que atrapa a los insectos o reduce la calidad nutricional de las proteínas (Vivanco *et al.*, 2005).

En la actualidad se conocen aproximadamente 20,000 estructuras de metabolitos secundarios que por su composición química son clasificados en dos grupos

principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos (Dat *et al.*, 2000).

#### **2.4.1 Compuestos fenólicos**

Los compuestos fenólicos o polifenoles constituyen un amplio grupo de sustancias químicas, con diferentes estructuras y propiedades químicas y actividad biológica, englobando más de 8.000 compuestos distintos. Como antioxidantes, pueden proteger las células de las plantas contra el daño oxidativo, por lo tanto, limitar el riesgo de varias enfermedades degenerativas asociadas al estrés oxidativo causado por los radicales libres (Scalbert *et al.*, 2005).

La distribución de los compuestos fenólicos en los tejidos y células vegetales varía considerablemente de acuerdo, al tipo de compuestos que se trate, situándose en el interior de las células o en la pared celular (Martínez-Valverde *et al.*, 2000).

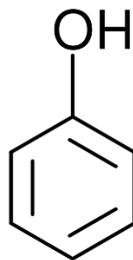
Algunos fenoles aparecen constitutivamente en la planta e inhiben el crecimiento de diferentes patógenos. Otros se forman en respuesta al ataque del patógeno y su aparición es considerada como una parte activa de la respuesta de defensa (Nicholson y Hammerschmidt, 1992).

Estos compuestos químicos están ampliamente distribuidos en las plantas como producto de su metabolismo secundario, algunos de los cuales son indispensables para su funcionamiento y otros son útiles en los mecanismos de defensa bajo situaciones de tensión (Kim *et al.*, 2003) y contra el ataque de organismos patógenos (Bakan *et al.*, 2003).

Los compuestos fenólicos participan en muchas funciones metabólicas en plantas, como son la síntesis de lignina, actividad alelopática, y en algunos casos en la biosíntesis de compuestos relacionados a la defensa como las fitoalexinas (Vlot *et al.*, 2009).

En el mecanismo de actividad antimicrobiana de los polifenoles se ha demostrado que los productos formados por oxidación de los compuestos fenólicos inhiben enzimas importantes debido a la oxidación de grupos esenciales SH. La actividad inhibidora de los polifenoles sobre las enzimas pectolíticas de los hongos patógenos debe contribuir a proporcionar resistencia a la planta, impidiendo el crecimiento del patógeno (Oku,1994).

Químicamente, presentan un anillo aromático que tiene uno o más grupos hidroxilos y su estructura puede variar desde la de una molécula fenólica simple (ácidos fenólicos) a la de un complejo de alto peso molecular como un polímero de masa tales como taninos condensados (de Albuquerque Gil, 2011).



**Figura 1. Estructura del fenol**

Los fenoles de bajo peso molecular, tales como el ácido benzoico y los fenilpropanoides, se forman como respuesta primaria ante la infección. Los compuestos fenólicos se acumulan rápidamente durante la interacción huésped-patógeno y median en la supresión de la enfermedad por medio de la inactivación de enzimas, o mediante la formación de componentes estructurales de la planta. La inducción de ésteres de ferulato o ésteres fenólicos de la pared celular puede actuar directamente como compuestos de defensa, o indirectamente como precursores de la síntesis de lignina, suberina y otras barreras de polifenoles inducidos por las heridas (Pomar, 2000).

Los compuestos fenólicos constituyen uno de los grupos de sustancias más numerosos y ampliamente distribuidos en el reino vegetal. Ellos son productos del metabolismo secundario de las plantas, que son determinantes en la calidad sensorial y nutrición de las frutas, verduras y otras plantas (de Albuquerque Gil, 2011).

#### **2.4.2. Presencia de flavonoides**

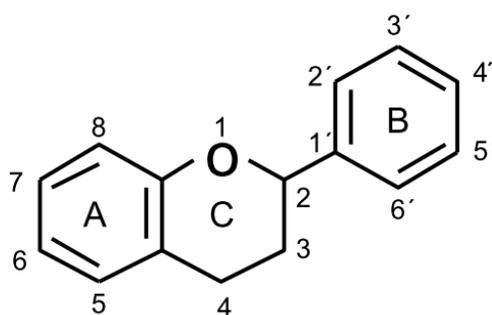
Los flavonoides constituyen una clase de compuestos polifenólicos de amplia distribución en el reino vegetal. Se encuentran en las plantas generalmente en forma de glicósidos y son los pigmentos de las flores. Actúan como atractores visuales para favorecer la polinización, como un mecanismo de defensa frente al ataque de insectos y microorganismos y como protectores de la radiación UV por sus propiedades antioxidantes (Martino, 2000). Los flavonoides componen un variado grupo de metabolitos secundarios, algunos de ellos fenólicos, siendo la mayoría poderosos antioxidantes *in vitro* (Campbell *et al.*, 2004).

Se les han atribuido numerosas, variadas e importantes funciones en el crecimiento y desarrollo de las plantas. Muchas de ellas son vitales para la supervivencia, como la atracción de insectos que actúan como vectores para la polinización o la dispersión de semillas. Otras funciones se relacionan con la supervivencia en condiciones adversas, ya que aumentan la tolerancia a factores estresantes y protegen frente a patógenos. (Gould y Lister, 2006).

El papel de los flavonoides en la protección frente a los ataques por hongos puede producirse a partir de sustancias antifúngicas que se pueden encontrar ya presentes en los tejidos de las plantas. Este es el caso de muchos flavonoides de naturaleza lipofílica (flavonas, flavanonas e isoflavanonas polimetoxiladas y/o isopreniladas) que presentan una actividad antifúngica muy considerable y que constituyen verdaderas barreras frente a la penetración de los hongos patógenos (Cartaya y Reynaldo, 2001).

Se ha demostrado la actividad fungistática de cuatro flavonoides contra el hongo *Deuterophoma tracheiphila*, la cual produce desfoliación y desecación progresiva de las ramas y tronco finalizando con la muerte (Tournaire *et al.*, 1993).

Los flavonoides contienen en su estructura química un número variable de grupos hidroxilos fenólicos y presentan excelentes propiedades de quelación del hierro y otros metales de transición. Son compuestos de bajo peso molecular que comparten un esqueleto común de difenilpiranos (C6-C3-C6), con dos anillos aromáticos (A y B) ligados a través de un anillo pirano (C). La estructura básica de un núcleo flavonoide consiste en 15 átomos de carbono que en los anillos C y A se numeran del 2 al 8, mientras que en el anillo B desde 1' al 6' (Figura #). (Min *et al.*, 2008).



**Figura 2. Estructura básica de los flavonoides**

Los flavonoides forman un grupo de alrededor de 3,000 compuestos fenólicos que tienen una estructura química similar, dotándolos de propiedades funcionales. Se entiende por fenilpropanoides a compuestos de una amplia gama que biogenéticamente derivan del ácido shikímico en la llamada “ruta de los fenilpropanoides o del ácido shikímico”, a través de la cual las especies vegetales biosintetizan más de 8000 compuestos fenólicos y polifenólicos cuya característica más relevante es su comportamiento antioxidante (Jovanovic, 2006).

## 2.5. Mecanismos de defensa de plantas contra patógenos

El reconocimiento del patógeno dispara una gran gama de mecanismos inducibles de defensa que contribuyen a la resistencia total de la planta. Los mecanismos inducidos en el sitio de infección y asociados con la respuesta hipersensitiva incluyen la síntesis de enzimas hidrolíticas que atacan a hongos y bacterias, alteraciones en la síntesis de proteínas estructurales de la pared celular, activación de genes de defensa para reacciones de hipersensibilidad (RH), resistencia sistémica adquirida, producción de lignina, fitoalexinas y enzimas hidrolíticas que atacan la pared celular del patógeno (Camarena-Gutiérrez, 2006; Dangl *et al.*, 2000).

La explosión oxidativa es una respuesta de defensa de la planta después del reconocimiento del patógeno, lo que lleva a la reacción de hipersensibilidad (HR). Esta respuesta se debe a la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como  $\text{H}_2\text{O}_2$ ,  $\text{O}_2^-$  y  $\text{OH}^-$ . Las especies de oxígeno activo tienen varias funciones en la respuesta de defensa de la planta. El peróxido de hidrógeno ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) puede ser directamente tóxico para el patógeno y está involucrado con el fortalecimiento de la pared celular, ya que  $\text{H}_2\text{O}_2$  es necesario para la biosíntesis de lignina (Resende *et al.*, 2003).

La lignificación puede ser una característica constitutiva en algunas especies, pero también puede ocurrir como un proceso de refuerzo de los tejidos cuando están sujetos a daño físico. La lignificación también se manifiesta durante la defensa a patógenos. La acumulación de lignina en grandes cantidades puede ocurrir de forma localizada en los tejidos atacados por patógenos (González *et al.*, 2011).

La lignina se produce por la unión enzimática de unidades de fenilpropanoides formando largos polímeros que confieren impermeabilidad y resistencia mecánica; además, la lignina es resistente a la degradación producida por muchos patógenos (González *et al.*, 2011).

### 2.5.1. Peroxidasas

Las peroxidasas vegetales, son enzimas monoméricas que intervienen en una amplia gama de procesos fisiológicos, tales como: la lignificación, la suberización, el metabolismo de las auxinas, el ensamblado de las proteínas de la pared celular, la tolerancia a sales, el estrés hídrico (Ajithkumar y Panneerselvam, 2014) y la defensa contra el ataque de patógenos (Van Loon *et al.*, 2006).

El peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) producido por la planta, como respuesta de defensa en las interacciones planta-patógeno, induce la expresión de genes relacionados con las defensas de las plantas, las vías asociadas a la generación de la cascada oxidativa (Sofo *et al.*, 2015) y otros sistemas protectores celulares endógenos del hospedero, todo lo cual limita el tamaño de la lesión (Montoliu, 2010).

El incremento de la actividad peroxidasa, como consecuencia del incremento del  $H_2O_2$  en las plantas, podría actuar como un catalizador en la polimerización de compuestos fenólicos para la formación de lignina y suberina en la pared celular, que actúa como barrera para bloquear la diseminación del patógeno en la planta (Santiago *et al.*, 2009).

Después de la infección, la enzima peroxidasa también puede fortalecer la pared celular realizando uniones cruzadas de glicoproteínas ricas en hidroxiprolina (Bradley *et al.*, 1992).

Las propiedades de la matriz de la pared celular se pueden ver muy condicionadas por la existencia de una serie de entrecruzamientos intermoleculares; siendo numerosos los estudios que asignan a las peroxidasas un papel fundamental en la formación de estos enlaces. Las peroxidasas actuarían a nivel de la incorporación de proteínas ricas en hidroxiprolina a la matriz de la pared, pero también en la unión de diversos derivados del ácido p-cumárico, como pueden ser los ferulatos o los hidroxibenzoatos (Pomar, 2000). Algunos modelos de interacción hospedero-patógeno han aportado evidencias del papel de la enzima peroxidasa como parte de los mecanismos de defensa, por participar en la polimerización oxidativa de alcohol hidroxicinámico para formar lignina (Cuervo *et al.*, 2009).

### 2.5.2. Catalasas

La catalasa (CAT) es una enzima que contiene hierro en su estructura y cataliza la dismutación del  $H_2O_2$  en agua y oxígeno molecular. Esta enzima se encuentra en todos los organismos eucariota aeróbicos y constituye un mecanismo esencial para la eliminación del  $H_2O_2$  generado en los peroxisomas por oxidasas que participan en la  $\beta$ -oxidación de ácidos grasos, la fotorrespiración y el catabolismo de las purinas (Arora *et al.*, 2002).

Entre los antioxidantes enzimáticos se tiene a la catalasa (CAT) que elimina  $H_2O_2$  en los peroxisomas, superóxido dismutasa (SOD) que elimina el anión-radical superóxido, ascorbato peroxidasa (APX) que elimina  $H_2O_2$  en diversos compartimentos y el guaiacol peroxidasa (POX) (Moller *et al.*, 2007).

Es bien conocido que esta enzima participa en la construcción y lignificación de la pared celular, la biosíntesis de etileno a partir del ácido 1-aminociclopropanocarboxílico y peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), la regulación de niveles de auxina, la protección contra el deterioro de tejidos e infección por microorganismos patógenos (Krylov, 1996).

El estrés aumenta el estado de oxidación de la célula, lo cual induce un incremento en la síntesis de antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos para contrarrestar los efectos de dicha oxidación. Los principales antioxidantes enzimáticos son: peroxidasas, catalasas, superóxido dismutasa y glutatión S-transferasa. Los antioxidantes no enzimáticos más importantes son: ácido ascórbico (AA, vitamina C),  $\alpha$ -tocoferol (vitamina E), glutatión y  $\beta$ -carotenos (Scandalios, 2001).

La catalasa protege a la planta contra el estrés oxidativo ejercido por las especies reactivas de oxígeno (Camarena-Gutiérrez y Torre-Almaráz, 2007). El ácido salicílico se sintetiza por la vía del metabolismo fenilpropanoide desde ácido cinámico y ácido benzoico. Se acumula intracelularmente en un receptor específico o se une a la enzima catalasa (CAT). Normalmente la catalasa protege a la planta contra el estrés oxidativo ejercido por las especies reactivas de oxígeno. Sin embargo, esta actividad de la

catalasa es bloqueada por la unión del ácido salicílico. Así que, alterando la cantidad de ácido salicílico dentro de la célula, se puede regular el nivel de las especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (Chen *et al.*, 1993).

## **2.6. Control biológico**

El control biológico representa una estrategia innovadora para el manejo de enfermedades de plantas de importancia agrícola (Quiroz *et al.*, 2008). El uso concreto de organismos que interfieren con los patógenos y plagas de las plantas es un enfoque amigable con la naturaleza, ecológico para superar los problemas causados por métodos químicos estándar de protección de las plantas (Borkvich y Ebbole, 2010).

Con la aplicación del control biológico se intenta restablecer el perturbado equilibrio ecológico, mediante la utilización de organismos vivos o sus metabolitos, para eliminar o reducir los daños causados por organismos perjudiciales (Badii *et al.*, 2000).

Las enfermedades vegetales resultan de la interacción de un patógeno con un huésped susceptible en un ambiente favorable. En el triángulo clásico de la enfermedad (huésped, patógeno, ambiente), hay un cuarto factor que se tiene en cuenta al hablar de control biológico: los organismos antagonistas (Infante *et al.*, 2009).

En términos de control biológico, los antagonistas son agentes biológicos con potencial para interferir en cualquiera de los procesos vitales de los patógenos vegetales. Los antagonistas pueden ser de todo tipo de organismos: hongos, bacterias, nemátodos, protozoos, virus, viroides y plantas. Un microorganismo antagonista puede presentar cinco modos de acción frente a un patógeno: competencia, antibiosis, explotación, resistencia inducida en el huésped y lisis, ya sea de forma individual o asociada (Infante *et al.*, 2009).

El control con plantas se ha empleado con anterioridad y su funcionamiento se basa en repeler insectos y agentes vectores de enfermedades. Las plantas utilizadas con estos fines son hierbas aromáticas, malezas que, por los metabolitos secundarios y

principios activos, favorecen o desfavorecen condiciones de desarrollo de otras plantas o cultivos y previenen enfermedades (Celis *et al.*, 2008).

Entre las medidas de control biológico se han usado extractos de origen vegetal a partir de hojas y semillas como manera preventiva contra el ataque de hongos como: *Sclerotinia sclerotiorum*, *F. oxysporum* y *F. roseum* (Mendoza *et al.*, 2007).

### **2.6.1. *Beauveria bassiana***

El hongo *Beauveria bassiana* es conocido como un microorganismo de doble control biológico, atacando tanto a plagas de insecto como a fitopatógenos, y sumándole a esto su amplia distribución mundial, hacen de este microorganismo uno de los referentes más importantes para el control biológico (Ownley *et al.*, 2008; Vega *et al.*, 2009).

Se ha sugerido la competencia por espacio, el microparasitismo y resistencia inducida como posibles formas de antagonismo (Griffin, 2007; Ownley *et al.*, 2008). También ha sido sugerido la antibiosis como modo de antagonismo de *B. bassiana*, ya que se ha podido aislar metabolitos secundarios como beauvericina (Leckie *et al.*, 2008). De igual forma las enzimas son una de las principales moléculas utilizadas en este mecanismo, estas pueden hidrolizar la pared celular del fitopatógeno evitando su normal crecimiento y permitiéndole la introducción de sustancias tóxicas causándole la muerte (Aceves *et al.*, 2005; Ownley *et al.*, 2010).

*Beauveria bassiana* ha sido recuperado como un colonizador endofítico de varias especies de plantas, y se ha demostrado para proteger las plantas frente a patógenos de plantas (Ownley *et al.*, 2004). El desarrollo completo lo alcanza a los 21 días a 27°C en medio sólido; se caracteriza por presentar una apariencia polvosa de color blanco algodonoso o amarillento cremoso (Hernández-Velázquez *et al.*, 1996).

Se ha reportado que *B. bassiana* inhibe el crecimiento micelial *in vitro* de una gran variedad de patógenos de plantas transmitidas por el suelo y foliares, incluyendo

*Gaeumannomyces graminis* var. *Tritici*, *Armillaria mellea* y *necatrix Rosellina*, *F. oxysporum*, *Botrytis cinérea*, y *Rhizoctonia solani*. Además de la inhibición del crecimiento micelial, induce la lisis celular de las especies de patógenos de plantas, tales como *Pythium ultimum*, *P. debaryanum*, y *Septoria nodorum* (Ownley et al., 2004).

**Cuadro 3. Clasificación taxonómica de *Beauveria bassiana***

<b>Dominio</b>	<i>Eukaryota</i>
<b>Reino</b>	<i>Fungi</i>
<b>Subreino</b>	<i>Dikarya</i>
<b>División</b>	<i>Ascomycota</i>
<b>Subdivisión</b>	<i>Pezizomycotina</i>
<b>Clase</b>	<i>Sordariomycetes</i>
<b>Subclase</b>	<i>Hypocreomycetidae</i>
<b>Orden</b>	<i>Hypocreales</i>
<b>Familia</b>	<i>Cordycipitaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Beauveria</i>
<b>Especie</b>	<i>Beauveria bassiana</i>

Fuente: NCBI (2019)

### 2.6.1.1. Mecanismos de *Beauveria bassiana*

Presenta un ciclo dimorfo del crecimiento, cuando hay ausencia de hospedero específico, pasa a través de un ciclo vegetativo asexual que incluye germinación, crecimiento micelial y formación de conidias. Cuando se presenta un hospedero se cambia a un ciclo patógeno donde las conidiosporas germinan en la superficie de la cutícula y los tubos germinativos penetran el integumento del hospedero directamente. Una vez habiendo penetrado la cutícula, el hongo altera su morfología de crecimiento y produce cuerpos hifales que proliferan por gemación. En seguida de la muerte del hospedero, el crecimiento del hongo regresa a su etapa saprófita (Gillespie y Claydon, 1989).

La acción enzimática de los hongos entomopatógenos, aunque es muy compleja, fue posible relacionarla con la capacidad infectiva y la patogenicidad sobre los insectos (Smith *et al.*, 1981). La cutícula de los insectos es una estructura consistente en nanofibras de quitina cristalina integrada a una matriz de proteínas, polifenoles, agua y pequeñas cantidades de lípidos (Vincent y Wegst, 2004), que puede ser degradada por proteasas y quitinasas.

Por su parte, la pared celular de los hongos es una estructura compleja compuesta de quitina, glucanos y otros polímeros, formándose un entrecruzamiento entre estos componentes, creando una estructura reticular compleja (Adam, 2004). Debido a que las hidrolasas como quitinasas y glucanasas se han identificado como las responsables de la degradación de la pared celular de los hongos, las enzimas de los hongos entomopatógenos que hidrolizan estas estructuras pueden ser empleadas con fines de control biológico (Adam, 2004).

## **2.7. Mecanismos de hongos para el control de enfermedades**

Los hongos empleados como antagonistas de fitopatógenos presentan habilidades, tales como, la competencia por nutrimentos que es indispensable para la germinación de esporas o sitios de infección (Goldman *et al.*, 1994). El micoparasitismo, que hace referencia al papel de diferentes sustancias y la antibiosis con la producción de enzimas, así como los metabolitos secundarios, siendo estos últimos clave para muchas interacción que causan la destrucción del patógeno (Jensen y Wolffhechel, 1995).

El micoparasitismo consiste en un proceso complejo donde se encuentran involucrados una variedad de eventos, entre ellos; el reconocimiento del huésped, ataque y su subsecuente penetración y por último la muerte. En este proceso, los microorganismos antagonistas secretan enzimas degradadoras de la pared celular (CWDEs), estas enzimas están involucradas en la hidrólisis de la pared celular del

hongo huésped y posteriormente la liberación de oligómeros de la pared celular del patógeno (Howell, 2003; Woo *et al.*, 2006).

Las enzimas proteasas, quitinasas y glucanasas que sintetizan los hongos entomopatógenos degradan la cutícula del insecto y la pared celular de los hongos, por lo tanto, tienen actividad biológica contra algunos insectos y hongos; también algunos de los metabolitos secundarios que producen muestran actividad insecticida y fúngica (Franco *et al.*, 2011).

La pared celular de los hongos es una estructura compleja compuesta de quitina, glucanos y otros polímeros, se forma un entrecruzamiento entre estos componentes, creando una compleja estructura reticular. Identificándose a las quitinasas y glucanasas como las hidrolasas que degradan la pared celular de los hongos. Por lo que las enzimas de que hidrolizan estas estructuras pueden ser empleadas con fines de control biológico. Ambas proteasas son enzimas extracelulares, la síntesis de proteasas forma parte de los procesos infectivos en los hongos patógenos *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Coccidioides immitis* y *Aspergillus niger*, es posible utilizar de la misma manera las proteasas producidas por los hongos entomopatógenos en el control de insectos, de hongos fitopatógenos, bacterias y nemátodos (Franco *et al.*, 2011).

### **2.7.1. $\beta$ -1,3-glucanasas**

Los glucanos son polisacáridos que consisten en unidades de glucosa. Existen dos grupos de glucanos presentes en los hongos, los  $\alpha$ -glucanos y  $\beta$ -glucanos. El glucano es la parte estructural más importante de la pared y representa el 50-60% del peso seco de esta estructura. La mayoría de los polímeros de glucano están compuestos de unidades de glucosa con uniones  $\beta$ -1,3 (65-90%) y son insolubles en agua. El proceso de la síntesis de  $\beta$ -glucano se produce en los hongos filamentosos en la punta de las hifas y en los lados del crecimiento celular y de ramificación (Fesel y Zuccaro, 2016).

Las glucanasas son enzimas que degradan  $\beta$ -glucanos y se clasifican en dos grandes grupos según los mecanismos que utilizan para hidrolizar el sustrato, identificados por los productos de hidrólisis: (1) las *exo- $\beta$ -glucanasas*, las cuales intervienen hidrolizando las cadenas del polisacárido por ruptura secuencial en los extremos reductores y no reductores, liberando glucosa, y (2) las *endo- $\beta$ -glucanasas*, que rompen aleatoriamente los sitios de enlace  $\beta$  de la cadena polisacáridica, liberando pequeños oligosacáridos de diferentes longitudes. La degradación de los  $\beta$ -glucanos por los hongos se acompaña frecuentemente de la acción sinérgica de las *endo-* y *exo- $\beta$ -glucanasas* (González *et al.*, 2011; Gutiérrez *et al.*, 2015).

Las  *$\beta$ -1,3-glucanasas* degradan polisacáridos en la pared celular del patógeno invasor, y en la mayoría de los casos pueden ser categorizadas como proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), ya que su expresión a menudo está inducida por una infección (Rose *et al.*, 2002).

Las glucanasas degradan los  *$\beta$ -1,3 glucanos* que son los principales componentes de la pared celular de los hongos, debido a que se producen aberturas por las cuales los hongos obtienen nutrientes; en *Trichoderma harzianum* se han reportado múltiples glucanasas (Almeida *et al.*, 2007). La inducción de estas glucanasas se puede observar ante la presencia de glucanos de paredes celulares de hongos como *R. solani* (Bara *et al.*, 2003).

Wisniewski *et al.* (1991) evidenciaron la habilidad que tienen las células de *Pichia guilliermondii* de unirse a las hifas de los hongos *B. cinerea* y de *Penicillium* sp. y de degradarlas mediante la producción y actividad de enzimas hidrolíticas como  *$\beta$ -1,3-glucanasa* y quitinasa.

El hongo *Aureobasidium pullulans* cepa LS-30 ha demostrado control de patógenos poscosecha como *B. cinerea* y *P. expansum* en manzanas y de *A. niger* y *R. stolonifer* en uvas de mesa, mediante la producción de  *$\beta$ -1,3- glucanasa* y *exoquitinasa* (Castoria *et al.*, 2001). Asimismo, se ha demostrado lisis en las hifas de *B. cinerea* por  *$\beta$ -1,3-glucanasa* producida por *P. guilliermondii* en manzana (Arras *et al.*, 1998).

Estudios realizados por Infante *et al.* (2009), han demostrado los efectos positivos de *Trichoderma* sobre plantas, debido a que induce la resistencia sistémica o localizada debido a la producción de una rica mezcla de enzimas antifúngicas como quitinasas y  $\beta$ -1, 3 glucanasas, relacionadas a la lisis de la pared celular fúngica, las cuales actúan de forma sinérgica con otras enzimas para potenciar los efectos perjudiciales sobre los hongos fitopatógenos.

### **2.7.2. Quitinasas**

Con respecto a las quitinasas, la quitina es el segundo polímero más abundante en la naturaleza, compuesto de cadenas  $\beta$ -1,4 N-acetilglucosamina y funciona principalmente como polisacárido estructural, además de poseer una estructura cristalina, baja solubilidad y reactividad química (Green *et al.*, 2005).

El contenido en quitina de la pared fúngica varía según la fase morfológica del hongo. Representa el 1-2% del peso seco de la pared celular de las levaduras mientras que en los hongos filamentosos puede llegar al 10-20% (Pontón, 2008).

Muchas especies de hongos bacterias y plantas producen enzimas quitinolíticas clasificadas en: exoquitinasas, endoquitinasas y quitobiosas y varían de acuerdo con la especie, así como en número, tipo y posición de los dominios catalíticos y unión al sustrato (Kobayashi *et al.*, 2002), estas enzimas se encuentran en hongos filamentosos que incluyen géneros como el de *Beauveria* (Karthik *et al.*, 2014).

Las quitinasas son enzimas hidrolíticas de quitina que han ganado interés en diferentes aplicaciones biotecnológicas, esto es debido a su capacidad para degradar la quitina de los exoesqueletos de insectos y en la pared celular de hongos, como agentes antimicrobianos o insecticidas útiles como control biológico de patógenos en plantas (Karthik *et al.*, 2014).

En el caso de los hongos, la hidrólisis de la quitina se realiza a través de un sistema quitinolítico sinérgico y consecutivo conformado de la siguiente manera:

1. Endoquitinasas (EC 3.2.1.14): Cortan la quitina aleatoriamente en sitios internos, generando oligómeros de bajo peso molecular de N-acetil glucosamina, como: Quitotriosa, quitotetraosa y eventualmente diacetilquitobiosa como producto predominante.

2. Exoquitinasas, antes N-acetil glucosaminidasas, reclasificadas como  $\beta$ -1,4 N-acetil hexosaminidasas (EC 3.2.1.52): Dividen los productos oligoméricos de las endoquitinasas y las quitobiasas, generando monómeros de NAG, también pueden catalizar la liberación progresiva de diacetilquitobiosa por el lado no reductor de la molécula de quitina y, por tanto, poseer actividad quitobiasa (EC 3.2.1.52).

Las quitinasas pueden detener el crecimiento y proliferación del patógeno directamente por hidrólisis de quitina y  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos, componentes presentes en la pared celular de algunos microorganismos invasores, volviendo las células susceptibles a lisis, de igual forma juegan un papel defensivo indirecto sugerido por la observación de que oligosacáridos específicos de quitina y  $\beta$ -1,3/1,6-glucanos, liberados por la pared celular del patógeno, actúan como elicitores que pueden inducir otro rango amplio de respuestas de defensa en las plantas (Coté y Hanh, 1994; Ebel, 1994).

Las quitinasas se sintetizan en plantas como proteínas relacionadas con la patogénesis que son inducidas por el ataque de fitopatógenos y confieren a la planta la capacidad de auto-defensa contra dichos patógenos. Dichas enzimas inhiben el crecimiento de hongos a través de efectos sinérgicos con otras enzimas como la  $\beta$ -1,3 glucanasa (Karthik *et al.*, 2014).

Se ha demostrado que las quitinasas que actúan sinérgicamente con las proteasas y las  $\beta$ -1,3 glucanasas degradan la pared celular de los hongos fitopatógenos (Gohel *et al.*, 2006), además de estar implicadas en etapas de germinación, crecimiento hifal, morfogénesis, nutrición y defensa contra competidores (Seidl, 2008).

## 2.8. Uso de extractos vegetales como control biológico

Una de las alternativas es el uso de extractos vegetales que actúan como biocontroladores, debido a la presencia de metabolitos secundarios (Ducrot, 2005). Las plantas y sus derivados han mostrado efectos controladores contra ácaros, roedores, nematodos, bacterias, virus, hongos e insectos (Grainge y Ahmed, 1988).

Las plantas producen sustancias de bajo peso molecular conocidas como metabolitos secundarios. Estos son normalmente no esenciales para el proceso metabólico básico de la planta. Entre ellos se encuentran terpenos, lignanos, alcaloides, esteroides y ácidos grasos. Esta diversidad química es consecuencia del proceso evolutivo que ha llevado a la selección de especies con mejores defensas contra el ataque microbiano o la predación de insectos y animales (Dixon, 2001; Ducrot, 2005).

Los métodos alternativos para el control de enfermedades se han estudiado con énfasis en nuevos compuestos derivados de fuentes vegetales, como aceites esenciales y extractos vegetales, como en el principio de los tiempos, ya que son más seguros para los consumidores y el medioambiente, su uso eficaz es contra patógenos resistentes a los plaguicidas y enfermedades de poscosecha (Villa-Martínez *et al.*, 2015).

Las mezclas de compuestos con propiedad antifúngica encontrados en las plantas pueden afectar a patógenos diferencialmente, ya sea de manera individual o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones. Así mismo, diversos métodos de extracción son estudiados para salvaguardar las propiedades extraídas de la mejor y más viable manera posible (Villa-Martínez *et al.*, 2015).

Los extractos vegetales y aceites esenciales de cada planta pueden tener hasta más de sesenta componentes y de ellos puede haber varios con propiedades antifúngicas. Generalmente están presentes como mezclas de compuestos y los patógenos pueden ser afectados diferencialmente por los compuestos individuales o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones (Montes, 2009).

### 2.8.1 Neem (*Azadirachta indica* A. Juss.)

Es de las plantas medicinales más versátiles, teniendo un amplio espectro de actividad biológica (Biswas *et al.*, 2002). Es un árbol tropical siempre verde nativo de la zona Este de la India y Burma, crece al Sureste de Asia y Oeste de África (Girish *et al.*, 2008). Entre los usos y aplicaciones de los extractos de *A. indica* está su empleo como pesticida e insecticida, debido a las restricciones que existen por los químicos sintéticos que han sido identificados como altamente tóxicos o peligrosos, y por su alto espectro, ya que se sabe puede usarse como larvicida, acaricida y nematocida (Dunkel *et al.*, 1995).

Los principales compuestos que han sido aislados de *A. indica* son triterpenos y tetranortriterpenoide como ejemplo de ellos es la azadiractina y limonoides, entre otros (López y Angulo, 2007). Se ha demostrado que los extractos de *A. indica* poseen propiedades antibacteriana, antidiabética, antifúngica y antiviral (Firenzuoli y Gori, 2007). Los extractos del árbol de *A. indica* son de los más poderosos que se pueden encontrar en la farmacopea de la India para combatir varias enfermedades. Esto se ha demostrado a través de estudios con microorganismos patógenos que dan cuenta de su bioactividad. Natarajan *et al.* (2003) encontraron una concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos orgánicos de hojas y semillas de *A. indica* de 31 µg/mL, sobre los dermatofitos *T. rubrum*, *T. mentagrophytes* y *Microsporum nanum*. También reportan una distorsión en el patrón de crecimiento de estos hongos a una concentración 15 µg/mL.

Este mismo autor (Natarajan *et al.*, 2002) menciona que extractos de semillas de *A. indica* exhibieron una menor CMI en evaluaciones con *T. rubrum*, *T. mentagrophytes*, *T. violaceum*, *M. nanum* y *E. floccosum* que el extracto de hojas. La inhibición en el crecimiento de algunos dermatofitos como *T. rubrum* y *T. mentagrophytes* se atribuye a la mayor concentración de triterpenoides en estas partes de la planta.

Algunos autores han observado la existencia de efectos sinérgicos entre los diferentes compuestos presentes en los extractos de *A. indica*. Govindachari *et al.*, (1998)

observaron que la mezcla de fracciones obtenidas por HPLC de un extracto metanólico separado del aceite de semillas de *A. indica* resultó efectiva contra *Drechslera oryzae*, *Alternaria tenuis* y *Fusarium oxysporum* (26% – 72% de inhibición respecto al control).

La capacidad de algunos compuestos presentes en *A. indica* para inhibir el crecimiento de microorganismos se ha explicado desde el punto de vista bioquímico. Lyer Williamson (1991) atribuyeron las propiedades antifúngicas de los extractos orgánicos de *A. indica* a la inhibición en la actividad proteasa en dermatofitos. La repelencia de *A. indica* para *T. urticae* fue destacada por Sundaram y Sloane (1995) quienes comprobaron reducción significativa en la alimentación y oviposición de este ácaro en función de la concentración de azadiractina-A (uno de los compuestos activos de los extractos de *A. indica*).

La azadiractina ha sido el principal ingrediente activo de *Azadirachta indica* (A. Juss., Meliaceae), y sus derivados, del tipo limonoide, son responsables de diversas propiedades fisiológicas (inhibidor de crecimiento, repelente, actividad insecticida y antialimentaria) en diferentes familias de insectos (Pavela *et al.*, 2009).

**Cuadro 4. Clasificación taxonómica de *Azadirachta indica* A. Juss**

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Viridiplantae</i>
<b>Infrareino</b>	<i>Streptophyta</i>
<b>Superdivisión</b>	<i>Embryophyta</i>
<b>División</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Subdivisión</b>	<i>Spermatophytina</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Rosanae</i>
<b>Orden</b>	<i>Sapindales</i>
<b>Familia</b>	<i>Meliaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Azadirachta</i> A. Juss
<b>Especie</b>	<i>Azadirachta indica</i> A. Juss

Fuente: NCBI (2019)

### 2.8.2 Hierba santa (*Piper auritum* Kunth)

*Piper auritum* Kunth (Piperaceae), conocida como hoja santa o acuyo, es una especie aromática originaria de México y distribuida hasta Colombia; tiene propiedades insecticidas, repelentes y antialimentarias por la presencia de aceites esenciales (metabolitos volátiles) y las conocidas piperamidas (Olivero-Verbel *et al.*, 2009).

Esta planta ha sido objeto de muchos estudios tanto de su composición química como de la amplia gama de usos que posee. La mayoría de estos estudios están dirigidos a su aceite esencial del que se sabe que el componente mayoritario es el safrol en 71,8 % (Rodríguez *et al.*, 2013). Se distribuye en todo el mundo con aproximadamente 2300 especies. Este género tiene una gran importancia comercial y económica, para la industria de condimentos, farmacéutica, insecticida y se ha reportado un amplio uso tradicional en la alimentación y en el tratamiento de diversas enfermedades (Albiero *et al.*, 2005).

Los metabolitos secundarios encontrados en extractos de diferentes partes de plantas del género *Piper*, muestran actividad antifúngica, insecticida, antialimentaria, estimulante, bactericida y citotóxica (Scott *et al.*, 2008; Oliveira *et al.*, 2004). Scott *et al.*, (2008), señalan que el género *Piper*, representado por 700 especies, en particular se han efectuado estudios acerca de la composición química de varios aceites esenciales del género *Piper*, encontrándose como constituyentes principales fenilpropanoides, monoterpenoides y sesquiterpenoides. Los trabajos relacionados con la composición de *P. auritum* coinciden con la presencia de safrol como componente mayoritario (Oliveira *et al.*, 2004; Delgado y Cuca, 2007; Bottia *et al.*, 2007).

Sus aceites esenciales en particular inhiben el crecimiento de un amplio grupo de microorganismos que causan infecciones importantes en el hombre, las plantas y los animales, siendo particularmente útiles como antivirales, antimicóticos y antibacterianos (Delgado y Cuca, 2007).

**Cuadro 5. Clasificación taxonómica de *Piper auritum* Kunth**

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Viridiplantae</i>
<b>Infrareino</b>	<i>Streptophyta</i>
<b>Superdivisión</b>	<i>Embryophyta</i>
<b>División</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Subdivisión</b>	<i>Spermatophytina</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Magnolianaes</i>
<b>Orden</b>	<i>Piperales</i>
<b>Familia</b>	<i>Piperaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Piper</i> L.
<b>Especie</b>	<i>Piper auritum</i> Kunth

Fuente: NCBI (2019)

### **2.8.3 Cascabel (*Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum)**

Es una planta perteneciente a la familia Apocynaceae, originaria del centro y sur de América. Se encuentra distribuida desde México a Perú; sin embargo, se considera una especie nativa de estos países, propia de climas cálidos y medios. Es una planta ornamental frecuente en jardines que se propaga por esquejes o semillas (Stevens *et al.*, 2001; Ortiz y Argai 2006).

*Thevetia peruviana* produce varios compuestos en sus hojas, frutos, semillas y raíces, los cuales tienen aplicación farmacéutica y son considerados compuestos biológicamente activos como insecticidas, fungicidas y bactericidas (Zabala *et al.*, 2010; Bhoyar y Biradar, 2014). Se utiliza con fines ornamentales, aunque también se le atribuye usos medicinales con propiedades antibacterianas (de González *et al.*, 2003; Torres, 2003; Ravikumar *et al.*, 2007) y con efecto fungicida (Ambang *et al.*, 2010).

En las hojas se han aislado flavonoides, tales como glicósidos sinápicos de kaemferol y quercetina (Abe *et al.*, 1995), glucósidos flavonoles y flavanona (Tewtrakul *et al.*, 2002).

**Cuadro 6. Clasificación taxonómica de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum**

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Viridiplantae</i>
<b>Infrareino</b>	<i>Streptophyta</i>
<b>Superdivisión</b>	<i>Embryophyta</i>
<b>División</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Subdivisión</b>	<i>Spermatophytina</i>
<b>Clase</b>	<i>Magnoliopsida</i>
<b>Subclase</b>	<i>Asteranae</i>
<b>Orden</b>	<i>Gentianales</i>
<b>Familia</b>	<i>Apocynaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Thevetia</i>
<b>Especie</b>	<i>Thevetia peruviana</i> (Pers.) K. Schum.

Fuente: NCBI (2019)

#### **2.8.4. Matarratón (*Gliricidia sepium*)**

Es una planta de la familia Fabaceae, originaria de Centroamérica y se distribuye desde México hasta el norte de Sudamérica (Hoyos, 1992). Su nombre común ‘mata ratón’, es atribuido a que sus raíces producen una sustancia tóxica para estos roedores (Skerman *et al.*, 1988; Hoyos, 1992).

De los extractos de *G. sepium* se han aislado e identificado un gran número de metabolitos secundarios, entre los cuales se destacan fenoles (Hochman, 1966), alcaloides (Calle *et al.*, 1987; Skerman *et al.*, 1988), flavonoides (Manners y Jurd, 1979), aceites esenciales (Joji y Beena, 2010) y saponinas (Kaniampady *et al.*, 2007).

Gracias a las propiedades alelopáticas de estos compuestos, los extractos obtenidos de esta planta tienen un gran potencial como biofungicidas y han sido evaluados sobre hongos fitopatógenos tales como *Colletotrichum gloeosporioides*, aislado a partir de frutos de *Carica papaya* L. y de *Mangifera indica* L., con antracnosis (Loaiza y Rivera, 2000; Bolívar *et al.*, 2009).

Martin de la Guardia *et al.* (2003), reportaron el hongo *Corinespora cassiicola* con extracto acuoso de *G. sepium*, donde el micelio disminuyó respecto al testigo en un 91.4 % a los 7 días.

**Cuadro 7. Clasificación taxonómica de *Gliricidia sepium***

<b>Reino</b>	<i>Plantae</i>
<b>Subreino</b>	<i>Embryophyta</i>
<b>División</b>	<i>Tracheophyta</i>
<b>Subdivisión</b>	<i>Pteopsida</i>
<b>Clase</b>	<i>Angiospermae</i>
<b>Subclase</b>	<i>Dicotyledoneae</i>
<b>Orden</b>	<i>Leguminosa</i>
<b>Familia</b>	<i>Fabaceae</i>
<b>Género</b>	<i>Gliricidia</i>
<b>Especie</b>	<i>Gliricidia sepium</i>

Fuente: NCBI (2019)

### 3. JUSTIFICACIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es considerado una de las hortalizas de mayor importancia en muchos países del mundo, ocupando el segundo lugar solo superado por el cultivo de la papa, México ocupa el décimo lugar a nivel mundial en producción anual con 4,047,171 de toneladas y el estado de Chiapas ocupa la undécima posición nacional con 40,450 de toneladas; debido a la importancia de la comercialización de este producto, esta investigación se enfoca en la búsqueda de alternativas de control para la enfermedad causada por *Fusarium oxysporum*, métodos que sean amigables con el medio ambiente y que puedan ser elaborados con los recursos existentes del área para favorecer la disminución de los costos de producción.

La importancia del estudio es conocer el efecto de la combinación de extractos vegetales con *Beauveria bassiana* para determinar si existe un efecto antifúngico potencializado que beneficie a la producción de tomate, a través de una solución ecológica.

## 4. OBJETIVOS

### 4.1. Objetivo general

Evaluar el efecto de la aplicación de extractos vegetales y *Beauveria bassiana* sobre el desarrollo, la actividad enzimática y metabolitos secundarios de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

### 4.2. Objetivos específicos

1. Determinar el efecto *in vitro* de los extractos vegetales sobre el crecimiento de *Beauveria bassiana* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.
2. Evaluar la actividad enzimática (glucanasas, quitinasas, peroxidasas y catalasas) en respuesta a la aplicación de extractos vegetales y a *Beauveria bassiana* en cultivo de tomate (*Solanum lycopersicum* L.) infectados con *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.
3. Evaluar el efecto de los extractos vegetales y *Beauveria bassiana* sobre la producción de fenoles, flavonoides y el desarrollo de las plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.)

## 5. METODOLOGÍA

### 5.1. Ubicación del experimento

El proyecto se realizó en el invernadero y en el laboratorio N. 10 del Polo Tecnológico Nacional de Pruebas Analíticas en Biocombustibles del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas.

### 5.2. Colecta y elaboración de los extractos vegetales

Se colectaron hojas de cascabel (*Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum.), neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), hierba santa (*Piper auritum* Kunth) y matarratón (*Gliricidia sepium*) en el primer semestre del año 2019 de árboles del Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez.

Posteriormente, las hojas fueron retiradas del tallo, se lavaron con agua a contracorriente, seguido de una desinfección con hipoclorito de sodio comercial al 1% durante 5 min., se lavaron nuevamente con agua destilada estéril para eliminar residuos de cloro, después se realizó la pulverización de las hojas frescas hasta obtener un tamaño de 2 a 3 mm.

Para obtener los extractos se utilizaron 100 g de hoja fresca por cada litro de agua estéril. Finalmente se llevó a cabo la maceración de las hojas en un recipiente ámbar por 72 h a temperatura ambiente para la extracción de metabolitos secundarios (Montes *et al.*, 2014). El sobrenadante fue filtrado en una campana de UV de flujo laminar para evitar la contaminación, y se almacenó a -4°C. Por cada litro de mezcla se obtuvo 850 mL de extracto vegetal.

### 5.3. Material fúngico

Se utilizó la cepa de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, la cual se obtuvo de la colección micológica del Centro de Investigación en Alimentos y Desarrollo (CIAD., AC) en Culiacán, Sinaloa. La cepa de *Beauveria bassiana* se obtuvo del Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) Unidad General Terán, Nuevo León.

### 5.4. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos vegetales

Para determinar el efecto antifúngico de los diferentes extractos vegetales se llevó a cabo mediante la técnica del alimento envenenado (Rahman *et al.*, 2011; Pineda *et al.*, 2012; Escobar, 2015). Para ello se prepararon cajas Petri con agar papa dextrosa (PDA) y con cada uno de los extractos vegetales (2 mL). En el centro de cada caja se inoculó un disco micelial de 5 mm de diámetro y 20 días de edad, incubadas a 28±2°C. Durante seis días se midió el diámetro del crecimiento micelial del hongo (Prapagdee *et al.*, 2007)., con ello se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente fórmula:

$$\text{Inhibición \%} = \frac{C-T}{C} * 100$$

Dónde:

C= Diámetro de crecimiento del hongo de la muestra control.

T= Diámetro de crecimiento del hongo con cada tratamiento.

Para el análisis de los datos se utilizó el Software Statgraphics Centurion XVI, aplicando un análisis de varianza simple (ANOVA), empleando la prueba de Tukey para determinar diferencias estadísticas significativas entre tratamientos.

## **5.5. Prueba de antagonismo *in vitro***

Para evaluar el potencial antagonista de la cepa de *B. bassiana* contra el hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, las pruebas se efectuaron usando la técnica descrita por Annes *et al.* (2010).

La cepa antagonista y el fitopatógeno se mantuvieron en incubación por separado durante diez días en cajas Petri conteniendo medio sólido agar papa dextrosa (PDA). Transcurrido el período de incubación se procedió a realizar la extracción de discos miceliales (5 mm Ø) de cada una de las cepas antagonistas y patógenas utilizando un sacabocado; posteriormente, los discos se depositaron en otra caja Petri conteniendo 20 mL del medio sólido, en extremos opuestos. Para los tratamientos control se utilizaron cajas Petri con medio PDA y se colocó un disco micelial del hongo fitopatógeno en el centro de la caja; las cajas Petri empleadas se mantuvieron en incubación a  $28 \pm 2^{\circ}\text{C}$ . La habilidad del hongo antagonista para reducir la expansión de las colonias de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* fue medida para determinar el momento del primer contacto entre los hongos y la zona de inhibición que se logró observar.

### **5.5.1. Microscopía del halo de inhibición entre *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Beauveria bassiana***

Se realizó un corte en el halo de inhibición de las muestras de antagonismo *in vitro*, los cortes se colocaron en cajas Petri y se ingresaron a un horno a  $65^{\circ}\text{C}$  durante 12 h, para su posterior análisis en un microscopio electrónico de barrido de emisión de campo para observar el comportamiento de las estructuras microscópicas de los hongos.

## 5.6. Evaluación *in vivo* al cultivo de *Solanum lycopersicum* L.

### 5.6.1. Material vegetal

Las plántulas fueron obtenidas a partir de semillas comerciales de tomate Saladette (*Solanum lycopersicum* L.) -Río Grande ®. Éstas fueron germinadas en un almácigo agrícola de poliestireno expandido con 200 cavidades utilizando composta como sustrato.

### 5.7. Unidades experimentales y tratamientos

Las unidades experimentales consistieron en plántulas sembradas en una bolsa de polietileno negro (35 cm alto x 20 cm ancho), con 4 Kg de composta como sustrato. Las plántulas fueron trasplantadas 25 días después de la emergencia.

Los tratamientos evaluados fueron los siguientes (Cuadro 8):

**Cuadro 8. Nomenclatura empleada para los tratamientos**

Tratamiento	Descripción del tratamiento
C	Control negativo (Agua)
Q	Químico positivo (Fungicida: Captan ultra 50 WP)
Be	<i>Beauveria bassiana</i>
Fu	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
NH	Neem + Hierba santa
FuQ	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> + Químico
BeFu	<i>Beauveria bassiana</i> + <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i>
BeNH	<i>Beauveria bassiana</i> + Neem + Hierba santa
FuNH	<i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> + Neem + Hierba santa
BeFuNH	<i>Beauveria bassiana</i> + <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> + Neem + Hierba santa

### **5.8. Preparación de solución fúngica de *Beauveria bassiana***

La preparación de la suspensión conidial se realizó acorde al método descrito por Rajeswari (2015). En matraces Erlenmeyer de 250 mL se colocaron 50 mL de medio (0.5 g/L de sulfato de magnesio, 0.5 g/L de cloruro de potasio, 3g/L de nitrato de sodio, 1 g/L de fosfato dipotásico, 0.01 g/L de sulfato de hierro, 200 mL de jugo V8, y 1000 mL de agua destilada), además se suplementó con quitina coloidal 1% (p/v). Los matraces se mantuvieron en incubación en un agitador rotatorio durante ocho días a 28°C a 180 rpm. El medio líquido se inoculó con discos miceliales de la cepa de *Beauveria bassiana* con crecimiento activo sobre PDA (Idris *et al.*, 2007).

Posteriormente en campana de flujo laminar con luz UV se filtró el sobrenadante con una gasa estéril en un matraz Erlenmeyer de 250 mL para eliminar las hifas y obtener la solución madre. Se realizó el conteo de esporas mediante una cámara de Neubauer y se ajustó la solución con agua destilada estéril hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^7$  conidios/mL (Akanmu *et al.*, 2014).

### **5.9. Preparación de solución fúngica de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici***

Se preparó una solución de conidios, *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* se cultivó en matraces Erlenmeyer con medio líquido Papa Dextrosa. Se inoculó un disco micelial del hongo en un matraz Erlenmeyer el cual se dejó en crecimiento durante cinco semanas a una temperatura de  $28 \pm 2^\circ\text{C}$ . A continuación, en campana de flujo laminar con luz UV se filtró el sobrenadante con una gasa estéril en un matraz Erlenmeyer de 250 mL para eliminar las hifas y obtener la solución madre. Se realizó el conteo de esporas mediante una cámara de Neubauer y se ajustó la solución con agua destilada estéril hasta obtener una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/mL.

#### **5.10. Aplicación de *Beauveria bassiana* en cultivos de *Solanum lycopersicum* L.**

La primera inoculación se realizó a los 10 días después del trasplante (ddt) con 10 mL de una suspensión de esporas  $1 \times 10^7$  conidios/mL directo en el sustrato; esto se repitió cada siete días por un periodo de 114 ddt (Akanmu *et al.*, 2014).

#### **5.11. Aplicación de extractos vegetales en cultivos de *Solanum lycopersicum* L.**

Se aplicó en el suelo a los 10 ddt al mismo tiempo que *Beauveria bassiana*, se agregó 5 mL de extracto de neem y 5 mL de hierba santa; esta aplicación se realizó cada siete días por un periodo de 114 ddt.

#### **5.12. Inoculación de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en cultivos de *Solanum lycopersicum* L.**

Se realizó una inoculación directa en el sustrato a los 25 ddt con 10 mL de una suspensión de esporas  $1 \times 10^6$  conidios/mL del hongo fitopatógeno *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*, (Akanmu *et al.*, 2014).

#### **5.13. Efecto de *B. bassiana* y los extractos vegetales sobre *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en las variables morfométricas de las plantas de *Solanum lycopersicum* L.**

La altura de la planta fue medida con un flexómetro, desde la base de la planta hasta la parte apical (Jiménez *et al.*, 2011). El diámetro del tallo se midió con la ayuda de un calibrador vernier en la base del tallo (Jiménez *et al.*, 2011). Las lecturas se tomaron semanalmente a partir de los 7 ddt por un periodo de 114 ddt.

La longitud de la raíz fue medida con un flexómetro. Las lecturas se tomaron a los 50, 66, 82, 98 y 114 ddt

Para determinar el contenido de clorofila, se realizaron tres mediciones por planta utilizando un medidor de clorofila marca Minolta SPAD 502 plus, reportando en unidades SPAD (mide directamente la intensidad de la clorofila presente en la hoja) (González *et al.*, 2016). Las lecturas se tomaron semanalmente a partir de los 7 ddt por un periodo de 114 ddt.

El peso de la raíz y el peso total de las plantas se midió con una balanza granataria. Las lecturas se tomaron a los 50, 66, 82, 98 y 114 ddt.

#### **5.14. Evaluación de la actividad enzimática en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L.**

Se trituraron las raíces de plantas de tomate con nitrógeno líquido, el material vegetal se lavó tres veces con acetona fría por 1 min en una relación 1:2 (p/v), por cada lavado se centrifugó a 1,000 rpm por 5 min a 4°C; se resuspendió en buffer de fosfatos 100 mM pH 6.5 manteniendo la misma relación 1:2 (p/v), se agitó sobre hielo por 1 h. Finalmente, la mezcla se centrifugó a 4,500 rpm por 30 min a 4°C y el sobrenadante se depositó en tubos Eppendorf, la muestra se mantuvo en congelación a -20°C para hacer las posteriores determinaciones (Ardila *et al.*, 2005).

Las raíces fueron colectadas a los 50, 66, 82, 98 y 114 ddt, tomándose cinco plantas por cada tratamiento, la concentración de proteína total se determinó con el kit de Bio-Rad (Bio-Rad Laboratories) basado en el método de Bradford (Bradford 1976), la lectura se realizó en un espectrofotómetro UV/VIS a una absorbancia de 595 nm. Para la curva patrón se realizó a partir de una solución madre de albúmina sérica bovina (BSA) a 1 mg/mL. Se realizaron tres réplicas por cada tratamiento.

### 5.15. Cuantificación de quitinasas

Se realizó la cuantificación de acuerdo con la metodología propuesta por Boller *et al.*, (1983). Se utilizó como sustrato quitina coloidal obtenida a partir de quitina grado reactivo (Sigma-Aldrich) con la que se preparó una solución madre a una concentración de 10 mg/mL de quitina en agua destilada.

A cada uno de los tubos de ensayo se le agregó quitina coloidal, 300 µL; solución enzimática, 600 µL; se procedió a colocarlos en agitación en un vórtex para homogenizar la muestra. Posteriormente, se agregó buffer de tetraborato de sodio 0.8 M a pH 9.1, 150 µL y se llevó a incubación en baño María durante 60 min a 37°C para después centrifugarse a 1000 rpm durante 5 min a 4°C; pasado el tiempo de la centrifugación se recuperó 600 µL del sobrenadante y se llevó a incubación por 3 min en ebullición. Finalmente, se dejó enfriar los tubos en baño de hielos y se agregó 1,500 µL de p-dimetilaminobenzaldehído (Sigma ®), se homogenizaron los tubos en vórtex, posteriormente se incubó en baño María durante 20 min a 38°C y la absorbancia de cada tubo se midió a 585 nm en un espectrofotómetro. Para cuantificar la actividad de las quitinasas, se determinó la actividad específica y la cantidad de N-acetilglucosamina liberada (Reissing *et al.*, 1955. El cálculo de la actividad enzimática se realizó según la siguiente ecuación (Solórzano *et al.*, 2001):

$$\text{Actividad enzimática} = \frac{\text{DO} * \text{Cot} * \text{V}_{\text{ensayo}}}{\text{T}_{\text{incub}} * \text{V}_m}$$

Donde:

DO= Densidad óptica

Cot= Cotangente del ángulo de la curva patrón

$\text{V}_{\text{ensayo}}$  = Volumen de la prueba (en celda)

$\text{T}_{\text{incub}}$  = Tiempo de incubación

$\text{V}_m$  = Volumen de la muestra (enzima)

La actividad específica se determinó según la expresión:

$$\text{Actividad específica} = \frac{\text{Actividad enzimática}}{\text{Concentración de proteína total (mg}\cdot\text{mL}^{-1})}$$

La actividad específica se expresó en pkat/mg de proteína.

### **5.15.1 Cuantificación de $\beta$ -1,3-glucanasas**

La producción de las  $\beta$ -1,3-glucanasas se determinó acorde al método de Nelson (1944) y Somogyi (1952). Se empleó como sustrato laminarina (polisacárido  $\beta$ -1,3 glucano) (Sigma-Aldrich) del cual se preparó una solución madre con una concentración de 2 mg/mL disuelto en buffer de acetato de sodio 0.5 M a pH 5.5.

Para la reacción se utilizaron 150  $\mu$ L de laminarina, extracto total proteico y del reactivo de Somogyi, posteriormente se incubó en baño María durante 40 min a 110°C, la reacción se detuvo en hielo. Posteriormente se agregó 150  $\mu$ L de reactivo de Nelson, se agitó suavemente y se agregó 1500  $\mu$ L de agua destilada. La velocidad de la reacción se calculó a partir de una lectura a 610 nm.

La curva patrón se preparó a partir de una solución madre de D-glucosa a 0.008 mM/mL realizando el mismo procedimiento antes descrito. El cálculo de la actividad enzimática y la actividad específica se realizó de la misma manera como lo descrito para la actividad enzimática de quitinasas. Los resultados de la actividad específica de la enzima  $\beta$ -1,3-glucanasa fue en pkat/mg de proteína.

### **5.15.2 Cuantificación de peroxidasas**

La actividad de POX (EC1.11.1.7) se realizó mediante el método de Hammerschmidt *et al.* (1982). La mezcla de reacción (3 mL) consistió en 0.25% (v/v) de guaiacol en buffer de fosfato de sodio 10 mM (pH 6 que contenía peróxido de hidrógeno a 10 mM). Se añadió un volumen de 100  $\mu$ L del extracto total proteico, para iniciar la reacción que

se midió por espectrofotometría UV/VIS. La actividad se calculó midiendo la relación a 470 nm/min = 0,01, que se define como 1 unidad de actividad. La actividad específica expresada como U/mg de proteína.

### **5.15.3 Cuantificación de catalasas**

La actividad de CAT (EC 1.11.1.6) fue determinada por Aebi (1974). Se añadió 100 µL de extracto total proteico a 2,900 µl de una mezcla de reacción que contenía peróxido de hidrógeno 20 mM y buffer de fosfato de sodio 50 mM a pH 7. Se midió la actividad de CAT controlando la reducción de la absorbancia a 240 nm como resultado del consumo de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. La actividad catalasa se expresó como U/mg de proteína. Una unidad de actividad enzimática se definió como la descomposición de 1 µmol de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto.

## **5.16. Evaluación de metabolitos secundarios en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L.**

### **5.16.1. Cuantificación de fenoles totales**

Primeramente, se tomó 20 µL de extracto total proteico, 1,500 µL de agua destilada, 100 µL de reactivo de Folin-Ciocalteu, después de 5 min se agregan 300 µL de solución de carbonato de sodio al 20%, se dejó reposar por 2 h a temperatura ambiente. Posteriormente se midió la absorbancia a 765 nm. Se realizó una curva estándar de ácido gálico a diferentes concentraciones a partir de una solución patrón de 1 mg/mL. El contenido de fenoles totales se expresa como mg equivalentes de ácido gálico/mL.

### **5.16.2. Cuantificación de flavonoides**

Se tomó 100 µL de extracto total proteico, 1000 µL de metanol y 50 µL de una solución de 2-aminoetildifenilborato al 1% en metanol, se dejó reposar a temperatura ambiente por 30 min. Posteriormente se midió la absorbancia a 404 nm en un espectrofotómetro. Los resultados se expresan en mg equivalentes de rutina/mL, para lo cual se realizaron una curva estándar a diferentes concentraciones (0, 10, 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80 y 100 µg/mL) a partir de una solución patrón de rutina (Sigma-Aldrich) 0.1 mg/mL en metanol.

### **5.17. Diseño experimental y análisis estadístico**

Para el experimento de las variables morfométricas de las plantas de tomate se utilizó un diseño experimental completamente al azar, con 10 tratamientos y cinco repeticiones con cinco evaluaciones dando un total de 300 unidades experimentales, las cuales consistieron en una bolsa negra de polietileno (4 Kg composta) con una planta de tomate. Las variables fueron: altura de planta, diámetro de tallo, contenido de clorofila, longitud de raíz, peso fresco de raíz y peso fresco de la planta.

Para la actividad enzimática de  $\beta$ -1,3-glucanasas y quitinasas se utilizó un diseño completamente al azar con 10 tratamientos y tres repeticiones con cinco evaluaciones. La variable fue la actividad específica de cada enzima (pkat/mg de proteína). Para la actividad enzimática de peroxidasas y catalasas se utilizó un diseño completamente al azar con 10 tratamientos y tres repeticiones con una evaluación. La variable fue la actividad específica de cada enzima (U/mg de proteína). Para la cuantificación de fenoles y flavonoides se utilizó un diseño completamente al azar con 10 tratamientos y tres repeticiones con dos evaluaciones. La variable fue el contenido de mg equivalentes de ácido gálico/mL y mg equivalentes de rutina/mL respectivamente. Para el análisis de los datos se utilizó el software Statgraphics Centurion XVI, aplicando un análisis de varianza simple (ANOVA), empleando la prueba de Tukey para determinar diferencias estadísticas significativas entre tratamientos.

## 6. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 6.1. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de los extractos vegetales en presencia de *Beauveria bassiana*

Los resultados de la figura 3, muestran que los tratamientos con extracto de neem y hierba santa tienen un crecimiento micelial similar al tratamiento sin extracto vegetal (testigo), por lo cual los tratamientos con estos extractos vegetales no generan ninguna actividad antifúngica para la cepa de *B. bassiana* y permiten el crecimiento de la cepa, sin embargo, los tratamientos con extracto de cascabel y matarratón presentaron diferencia estadística significativa con respecto al testigo a las 144 h ya que existe una inhibición en el crecimiento micelial de la cepa, por lo tanto se encuentra presente una actividad antifúngica.

Se ha reportado la actividad antifúngica de *G. sepium* (Jacq.) Kunth, contra el hongo *Sclerotium rolfsii* (Torrealba y Rodríguez, 2006), al igual que Pérez *et al.*, (2000) con un extracto acuoso de *G. sepium* a una concentración del 25%, observaron una disminución del 91% en el crecimiento micelial de *Corynespora cassiicola*.

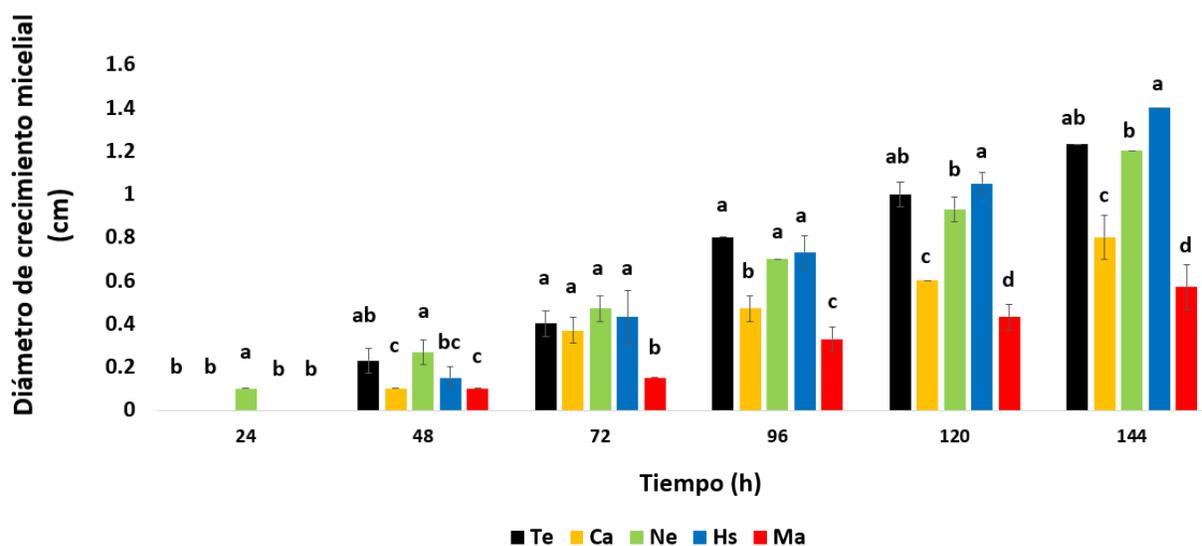
Por otro lado, es pertinente destacar que al igual que ciertos metabolitos causan la muerte de algunos microorganismos, también existen otros patógenos que son capaces de sobrevivir y, por tanto, adaptarse (Shivanna y Mallikarjunaswamy 2009), esto para el caso de los extractos de *A. indica* y *P. auritum* que no inhibieron el crecimiento de *B. bassiana*.

Químicamente los constituyentes de la familia *Piper* más comunes de este género son alcaloides, amidas como isobutilamina, piperidina y pirrolidina, propenilfenoles, lignanos, neolignanos, terpenos, flavonoides, kawalactonas, butenólidos y epóxidos del ciclohexano entre otros (Celis *et al.*, 2008).

Se han efectuado estudios acerca de la composición de varios aceites esenciales del género *Piper*, encontrándose como constituyentes principales en un 70 a 85% de safrol 2 en *P. auritum* (Castro y Poveda, 1983).

Estudios previos en los que se evaluó la actividad fungicida de los aceites de *P. aduncum*, *P. tuberculatum* y *P. arboreum* evidenciaron una correlación directa entre el alto contenido de hidrocarburos monoterpenicos y sus derivados con la actividad fungicida (Navickiene *et al.*, 2006).

Los aceites esenciales extraídos de *P. aduncum* L. y *P. tuberculatum* Jacq han mostrado actividad antifúngica contra *Cladosporium sphaerospermum* y *Cladosporium cladosporoides* (Navickiene *et al.*, 2006).



**Figura 3. Efecto en el crecimiento micelial de *Beauveria bassiana* en presencia de los extractos vegetales.** Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Te: Testigo, Ca: Cascabel, Ne: Neem, Hs: Hierba santa, Ma: Matarratón.

## 6.2. Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de los extractos vegetales en presencia de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*

Los resultados del cuadro 9, indican que los tratamientos con extracto de neem y matarratón tienen un mayor efecto antifúngico ya que presentaron diferencia estadística significativa en el crecimiento del micelio de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* con respecto al tratamiento sin extracto vegetal (testigo), siendo estos extractos los más efectivos.

Los extractos de cascabel y hierba santa presentaron diferencia estadística significativa con respecto a los tratamientos Ne y Ma, ya que tuvieron un menor efecto antifúngico para disminuir el diámetro del micelio de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

**Cuadro 9. Efecto de los extractos sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici***

Tratamiento	Diámetro de micelio <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (cm por horas)				
	48 h	72 h	96 h	120 h	144h
Te	1.8± 0.01 <b>a</b>	2.5± 0.01 <b>a</b>	2.9± 0.01 <b>a</b>	3.7± 0.01 <b>a</b>	4.3± 0.01 <b>a</b>
Ca	0.4± 0.07 <b>bc</b>	1.1± 0.08 <b>c</b>	1.8± 0.05 <b>b</b>	2.5± 0.08 <b>b</b>	3.2± 0.10 <b>b</b>
Ne	0.3± 0.01 <b>c</b>	0.8± 0.0 <b>d</b>	1.1± 0.07 <b>d</b>	1.5± 0.08 <b>d</b>	2.5± 0.01 <b>c</b>
Ma	0.3± 0.02 <b>c</b>	0.9± 0.04 <b>cd</b>	1.4± 0.06 <b>c</b>	1.8± 0.03 <b>c</b>	2.7± 0.03 <b>c</b>
Hs	0.7± 0.14 <b>b</b>	1.5± 0.10 <b>b</b>	1.9± 0.08 <b>b</b>	2.4± 0.07 <b>b</b>	3.2± 0.10 <b>b</b>
dms	0.34	0.30	0.29	0.30	0.31

Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Te: Testigo, Ca: Cascabel, Ne: Neem, Ma: Matarratón, Hs: Hierba santa.

Agbenin y Marley (2006) utilizaron extractos de hojas frescas de *A. indica* con una concentración del 10, 20 y 30 %, las cuales redujeron el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

La bioactividad de los extractos de *A. indica* ha sido atribuido por varios compuestos como nimbin, nibbidin y salannin y lo más importante, el compuesto antifúngico es azadiractina (Cherkupally *et al.*, 2017), (AZA), un tetranortriterpenoide natural (Board, 2004). Los principales terpenoides identificados en *A. indica* son azadiractina, melantriol, nimbina y salannina, cuya importancia radica en su efectividad como fungicida, bactericida e insecticida. A lo que se atribuye su efecto antifúngico (Sharma *et al.*, 2003).

Azadiractina es el principal ingrediente activo de *Azadirachta indica* (A. Juss., Meliaceae), y sus derivados, del tipo limonoide, son responsables de diversas propiedades fisiológicas (inhibidor de crecimiento, repelente, actividad insecticida y antialimentaria) en diferentes familias de insectos (Pavela *et al.*, 2009).

El extracto acuoso de *G. sepium* al 10 %, controló el crecimiento micelar del hongo *Corynespora cassicola* en un 91.4 % a los siete días (Martin de la Guardia *et al.*, 2003). Marcano y Hasegawa (2002), indican que los efectos fungistáticos y fungicidas están relacionados con los diferentes metabolitos secundarios presentes en las plantas, en mayor o menor grado.

En el extracto etanólico de hojas de *G. sepium* se detectaron los grupos de metabolitos secundarios: alcaloides, flavonoides, fenoles, aceites esenciales y saponinas, mostrando *in vitro* un efecto fungicida sobre *Colletotrichum acutatum* a dosis muy bajas (2 %), mientras que *in vivo*, logró reducir la severidad de la enfermedad sólo a la concentración del 20 %.

Se observa en el cuadro 10, que los tratamientos con extracto de neem y matarratón obtuvieron los mayores porcentajes de inhibición en presencia del hongo fitopatógeno, tuvieron diferencia estadística significativa con respecto a los tratamientos de cascabel y hierba santa ya que hasta las 120 h presentaron un porcentaje de inhibición mayor del 50 %, a diferencia de los tratamientos con extracto de cascabel y hierba santa que presentaron un menor porcentaje de inhibición al finalizar la experimentación (144h).

**Cuadro 10. Efecto de los extractos sobre el porcentaje de inhibición de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici***

Tratamiento	Porcentaje de inhibición de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>lycopersici</i> (%)					
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144h
Te	0±0 a	0±0 a	0±0 a	0±0 a	0±0 a	0±0 a
Ne	100.0±0 a	81.69±0.81 a	70.3±0 a	65.54±2.42 a	57.82±2.35 a	42.10±0.33 a
Ma	100.0±0 a	80.0±1.65 a	65.36±1.72 a	54.30±1.93 b	53.68±0.86 a	37.25±0.78 a
Hs	100.0±0 a	60.0±8.25 b	44.05±3.96 b	38.71±2.79 c	38.26±1.87 b	26.43±2.37 b
Ca	100.0±0 a	60.52±7.59 b	40.0±4.94 b	32.69±2.21 c	21.26±2.72 c	11.64±2.76 c
dms	0	23.6559	13.6793	9.84855	8.64541	7.8031

Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ). Te: Testigo, Ca: Cascabel, Ne: Neem, Ma: Matarratón, Hs: Hierba santa.

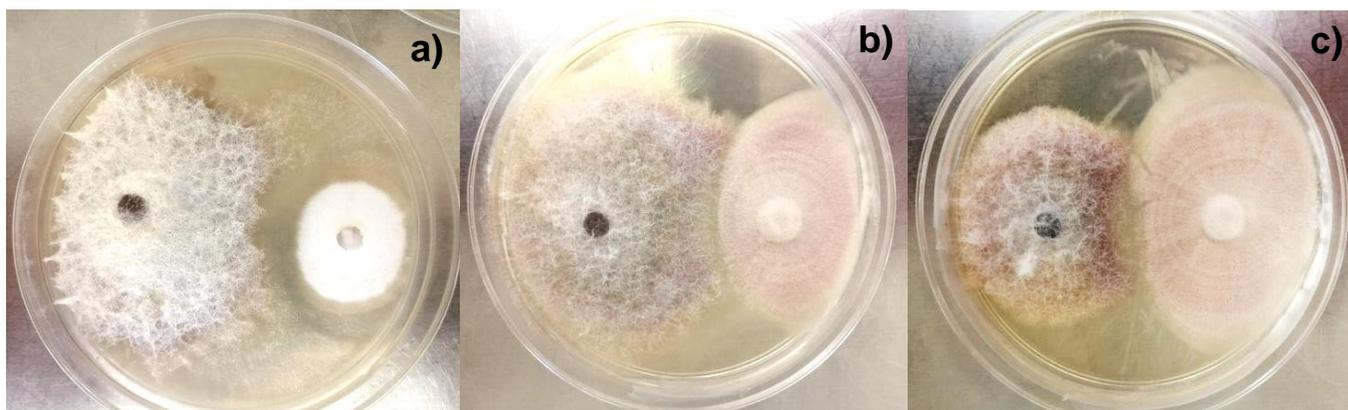
Los resultados del efecto antifúngico del extracto de neem obtenidos en este trabajo coinciden con lo reportado por Carolina Vega (2014) que empleó extractos de hojas de neem (*A. indica*) para disminuir el crecimiento micelial de *Fusarium* spp, donde obtuvo un porcentaje de inhibición del 25 % después de cinco días de la inoculación del hongo. Sin embargo, en este trabajo después de cinco días se obtuvo un porcentaje de inhibición del 57.8 %.

Sharma y Trivedi (2002), evaluaron por la técnica de alimento envenenado el efecto antifúngico de extractos de hojas de *A. indica* contra *F. oxysporum* f.sp. *cumini*, donde obtuvieron un 62.82 % de inhibición contra el hongo patógeno. Ramaiah y Garampalli (2015), utilizaron extractos al 60 % de *A. indica*, contra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, el extracto tuvo un porcentaje de inhibición del 75 %.

Azadiractina, azadiradiona, nimonol y azadradiona epoxy se obtuvieron del extracto orgánico de hojas de *A. indica* (Moslem & El-Kholie, 2009). Todos estos componentes extraídos y también han sido reportados como antifúngicos, antibacterianos, antiinsecticidas (Dai *et al.*, 2001; Jarvis y Morgan, 2000; Nathan *et al.*, 2005).

### 6.3. Antagonismo *in vitro* por confrontación de *Beauveria bassiana* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*

En la figura 5, se observan cajas Petri donde el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* fue disminuyendo conforme esta cepa se inoculaba a más días posteriores a la inoculación de *Beauveria bassiana*.



**Figura 4. Efecto de *Beauveria bassiana* sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*.** a) Inoculación de *Beauveria bassiana* y *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* en el mismo día, b) Inoculación de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* dos días después de la inoculación de *Beauveria bassiana*, c) Inoculación de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* cinco días después de la inoculación de *Beauveria bassiana*.

El antagonismo es un fenómeno que se observa en microorganismos de suelo y en rizósfera, los antagonistas producen antibióticos, los cuales actúan en competencia por nutrientes o inducen resistencia en el hospedero (Infante *et al.*, 2009).

Se ha demostrado el antagonismo de *B. bassiana* por fitopatógenos como *Rhizoctonia solani* (Lartey y Caesar, 2004) y *Pythium myriotylum* (Clark, 2006). Se ha sugerido como posibles formas de antagonismo, la competencia por espacio, el microparasitismo y resistencia inducida (Griffin, 2007; Ownley *et al.*, 2008); sin embargo, los resultados varían con los distintos fitopatógenos.

Robinson y Park (1966) mencionaron que existen compuestos volátiles como el acetaldehído, propionaldehído, n-butiraldehído, n-propanol, isobutanol, etilacetato, isobutil acetato y acetona; estos compuestos tienen la capacidad de detener el crecimiento de otros hongos logrando un mecanismo conocido como fungistasis (Robinson y Garret, 1969). Se ha evidenciado que *Trichoderma* siendo un hongo antagonista, coloniza la epidermis de la raíz y capas externas corticales, liberando compuestos volátiles como etileno, alcoholes, aldehídos, cetonas, y compuestos no volátiles como péptidos, destacando la molécula  $\lambda$ -aminoácido-oxidasa, de la cual se ha comprobado que inhibe el crecimiento del micelio de *Rhizoctonia solani* (Yang *et al.*, 2011). Actualmente se halla descrito que los hongos asociados a las plantas intervienen en la ecología bioquímica de la planta-huésped, a través de las diversas tensiones bióticas y abióticas como antagonismo, parasitismo o mutualismo, los cuales promueven directamente metabolitos funcionales o estimulantes (Singh *et al.*, 2016).

#### 6.4. Microscopía del halo de inhibición

En la figura 5, se logra observar las estructuras morfológicas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y una acumulación de los conidios de la cepa en un sitio del halo de inhibición.

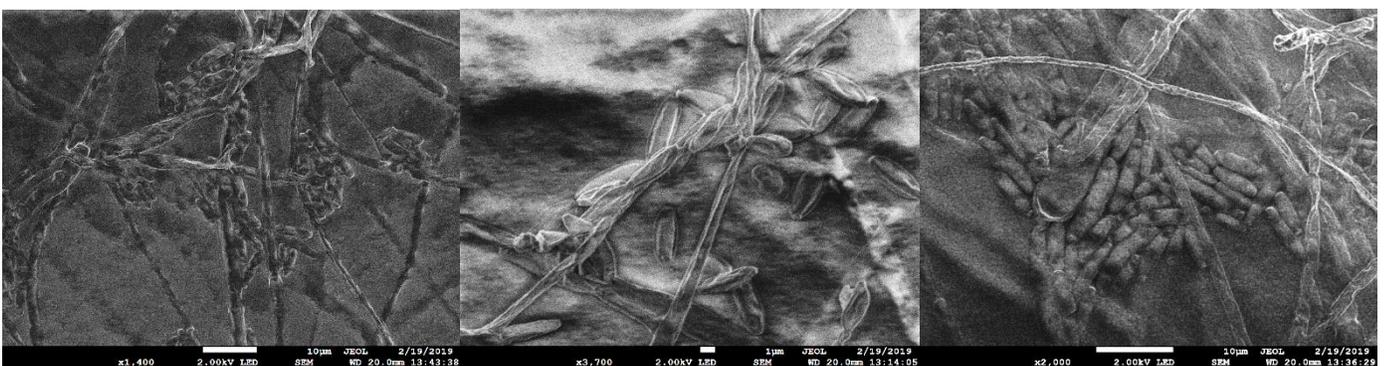


Figura 5. Interacción de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y *Beauveria bassiana*.

Como se ha descrito anteriormente que *B. bassiana* por su amplia distribución en el mundo y su actividad para el control biológico, actualmente se ha sugerido que posiblemente sea un microorganismo de doble propósito, por su efecto contra insectos y contra hongos fitopatógenos.

Donde probablemente el antagonismo sea realizado por la antibiosis donde se encuentren involucradas enzimas hidrolíticas como las glucanasas y quitinasas contra estos patógenos de plantas (Montoya *et al.*, 2016).

#### **6.5. Efecto de *Beauveria bassiana* y extractos vegetales en las plantas de *Solanum lycopersicum* L. inoculadas con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici***

Se observa en el cuadro 11, que existió diferencia estadística significativa en todas las variables de crecimiento de las plantas de *Solanum lycopersicum* L. que fueron inoculadas con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, con respecto a aquellos tratamientos que no fueron inoculadas con el hongo fitopatógeno, con ello se evidenció la enfermedad y el efecto negativo que tiene en el desarrollo de las plantas de *Solanum lycopersicum* L.

Se observa que a los 144 ddt los tratamientos C, Q, Be, Ne y BeNH no tuvieron diferencia estadística significativa en las variables de crecimiento de las plantas, por lo que se puede sustituir la aplicación de un fungicida químico por *B. bassiana* y los extractos de neem y hierba santa.

Existe diferencia estadística significativa a los 144 ddt en el peso fresco de las plantas de *S. lycopersicum* L. con el tratamiento Fu con respecto a los tratamientos BeFu y FuNH, evidenciando que existe un efecto antifúngico contra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* al utilizar *B. bassiana* y los extractos vegetales de neem y hierba santa en las plantas de *S. lycopersicum* L. ya que mitiga el daño causado por el hongo patógeno.

**Cuadro 11. Efecto de *Beauveria bassiana* y extractos vegetales en las variables morfométricas de las plantas de *Solanum lycopersicum* L.**

Tratamiento	Altura de planta (cm)			Diámetro de tallo (mm)		
	Tiempo posterior al trasplante (Días)					
	50	82	114	50	82	114
C	77.8±5.7 a	107.8±6.5 a	144.8±3.9 ab	4.6±0.2 a	4.6±0.4 a	5.7±0.5 ab
Q	78.8±3.8 a	104.0±8.4 a	161.4±11.4 a	4.0±0.5 a	4.6±0.5 a	5.6±0.2 abc
Be	77.8±4.6 a	97.9±6.1 ab	163.6±5.7 a	4.6±0.4 ab	4.6±0.2 a	5.7±0.2 ab
Fu	33.4±13.7 b	77.6±8.2 b	64.2±27.5 d	3.2±0.0 b	3.5±0.1 b	3.7±0.2 a
NH	77.4±2.3 a	100.3±8.4 ab	152.8±3.3 ab	4.3±0.4 ab	4.5±0.5 a	6.2±0.2 a
FuQ	67.1±6.6 a	93.2±3.0 ab	125.2±6.0 bc	4.2±0.5 ab	4.4±0.4 ab	4.8±0.2 cd
BeFu	74±3.0 a	93.2±3.7 ab	138.6±5.0 ab	4.2±0.4 ab	4.2±0.4 ab	5.3±0.3 bcd
BeNH	72.8±7.1 a	92.2±4.4 a	159.0±7.6 a	4.1±0.3 ab	4.5±0.1 a	6.1±0.3 a
FuNH	74.6±8.0 a	107.6±2.3 a	127.4±7.8 bc	4.5±0.4 a	4.5±0.4 ab	5.1±0.3 bcd
BeFuNH	70.1±2.6 a	77.6±5.5 ab	107.8±5.1 c	3.7±0.2 ab	3.7±0.2 ab	4.7±0.2 d
dms	31.15	24.23	6.18	1.04	1.00	0.82

Tratamiento	Índice de clorofila (SPAD)			Longitud de raíz (cm)		
	Tiempo posterior al trasplante (Días)					
	50	82	114	50	82	114
C	35.4±1.9 ab	36.8±1.1 a	45.2±1.9 a	21.8±4.9 ab	38.8±3.6 bc	54.8±3.9 ab
Q	32.8±1.4 abc	34.4±1.2 ab	45.9±1.2 a	26.6±4.0 a	56.0±15.7 ab	57.6±10.9 a
Be	31.4±1.4 bc	35.9±2.0 ab	43.4±0.5 a	13.6±2.1 ab	40.6±11.3 abc	50.2±2.4 ab
Fu	28.5±0.4 c	23.7±6.6 b	27.9±7.0 b	10.8±4.4 b	28.6±0.6 c	21.0±8.6 c
NH	33.1±1.9 abc	33.9±1.6 ab	44.8±1.1 a	17.6±2.6 ab	42.6±7.7 abc	44.8±2.9 abc
FuQ	35.7±0.8 ab	33.5±2.3 ab	38.4±1.8 ab	12.9±5.4 b	40.6±2.3 abc	40.8±4.2 abc
BeFu	38.0±1.8 a	41.6±1.2 a	35.3±0.6 ab	19.2±4.9 ab	39.0±4.0 bc	43.6±0.9 abc
BeNH	34.5±0.8 abc	36.0±1.0 ab	44.4±1.0 a	20.8±3.9 ab	60.6±6.7 a	55.4±3.8 ab
FuNH	32.3±1.1 abc	37.2±2.1 a	38.5±1.0 ab	14.6±6.9 ab	33.2±2.3 c	40±4.2 abc
BeFuNH	35.4±0.8 ab	35.6±1.9 ab	38.4±0.9 ab	23.3±5.9 ab	39.4±6.3 abc	32.4±1.1 bc
dms	6.33	12.41	11.76	13.55	21.35	24.75

Tratamiento	Peso fresco de planta (g)			Peso fresco de raíz (g)		
	Tiempo posterior al trasplante (Días)					
	50	82	114	50	82	114
C	21.0±3.5 a	45.6±6.5 abc	113.6±12.2 a	2.4±0.3 a	6.9±1.1 ab	11.4±2.0 ab
Q	19.4±2.9 a	57.1±8.4 a	98.9±10.4 a	1.8±0.3 ab	7.3±2.0 abc	13.4±0.9 a
Be	24.1±3.0 a	40.8±6.1 abc	99.4±5.2 a	1.4±0.4 ab	4.1±0.3 abc	10.1±0.4 abc
Fu	16.0±6.8 a	29.8±8.2 c	32.6±8.2 d	0.9±0.4 b	1.4±0.6 c	2.7±1.2 d
NH	17.9±3.8 a	54.4±8.4 ab	110.9±10.2 a	1.6±0.1 ab	7.1±1.2 ab	10.7±0.7 abc
FuQ	18.8±7.9 a	42.3±3.0 abc	43.7±12.1 cd	1.6±0.2 ab	5.1±0.9 abc	5.5±2.7 bcd
BeFu	21.0±3.1 a	48.4±3.7 ab	68.2±1.9 b	1.8±0.3 ab	4.6±0.9 abc	7.1±0.9 bcd
BeNH	25.3±2.6 a	54.9±4.4 ab	100.0±6.6 a	1.9±0.3 ab	7.7±0.5 a	11.4±0.7 ab
FuNH	23.7±4.1 a	37.7±2.3 ab	60.0±6.7 bc	2.1±0.3 ab	3.1±0.5 bc	4.7±1.1 cd
BeFuNH	26.0±7.0 a	42.6±5.5 abc	47.0±1.2 bcd	2.4±0.2 a	5.6±0.1 abc	4.6±0.4 cd
dms	22.92	17.3	6.18	1.38	4.49	6.18

Datos obtenidos de cinco réplicas. Los datos en cada columna con letras similares no presentan diferencia significativa acorde a la prueba de Tukey ( $P \leq 0.05$ ).

Estos resultados sugieren que la aplicación de la combinación de *B. bassiana* y los extractos vegetales no tienen un efecto perjudicial en el desarrollo de las plantas de *Solanum lycopersicum* L. y de igual forma que el tratamiento con fungicidas químicos puede ser sustituido por uno ecológico ya que no existió diferencias estadísticas en las variables de crecimiento de las plantas de *Solanum lycopersicum* L.

Lo anterior hace referencia al trabajo de Islam *et al.* (2010) ya que realizaron una combinación integrada de *B. bassiana* con neem (*A. indica*) en plantas de berenjena (*Solanum melongena* L.), el cual causó un 27.6 % y un 20.5 % más de mortalidad de ninfas de la mosca blanca del camote (*B. tabacion*) que los tratamientos individuales de *B. bassiana* y neem (*A. indica*), respectivamente. Por lo tanto, una aplicación combinada de un hongo entomopatógeno y un insecticida botánico puede beneficiarse de ambos y ha demostrado ser eficaz para el control de la berenjena.

De la misma manera Tiwari *et al.* (2017), observaron que *Trichoderma hamatum* redujo la incidencia de marchitez en plantas de berenjena (*Solanum melongena* L.) causada por *Fusarium solani* en un 100, 89.47 y 73.68 % en combinación con extractos acuosos de *Rauvolfia serpentina*, *Azadirachta indica* y *Ocimum sanctum* a una concentración del 75 %.

En la figura 6 se puede observar marchitez, amarillamiento en hojas causados por el hongo fitopatógeno en las plantas de *S. lycopersicum* L. Estos síntomas coinciden con lo reportado por Fasio *et al.* (2003) donde *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* ocasionó achaparramiento, amarillamiento de las hojas inferiores y marchitez de las hojas en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Al igual que el trabajo de Akrami y Yousefi (2015), quienes reportaron mayor incidencia de marchitez y clorosis de las hojas en plantas de *S. lycopersicum* infectadas por *F. oxysporum*.



**Figura 6. Efectos en plantas de *S. lycopersicum* L. infectadas con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici***

En la figura 7a) se observa que las plantas de *S. lycopersicum* L. sin inoculación de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* presentaron mayor proporción en el follaje, mayor volumen y longitud de raíz y mayor contenido de clorofila en comparación a las plantas que se infectaron con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Figura 7b).

Se puede observar en la figura 7b) el tratamiento con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* (Bandera rosa), presentó achaparramiento y volumen de follaje y raíz mucho menor a todos los tratamientos, evidenciando la enfermedad causado por el hongo patógeno.



**Figura 7. Efecto de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* en la raíz y follaje de plantas de *S. lycopersicum* L.** a) Bandera amarilla: Químico. Bandera azul: Control. Bandera morada: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. Bandera naranja: Neem + Hierba santa. Bandera rosa: *B. bassiana*. b) Bandera amarilla: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Bandera verde: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Químico. Bandera rosa: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Bandera celeste: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. Bandera negra: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa.

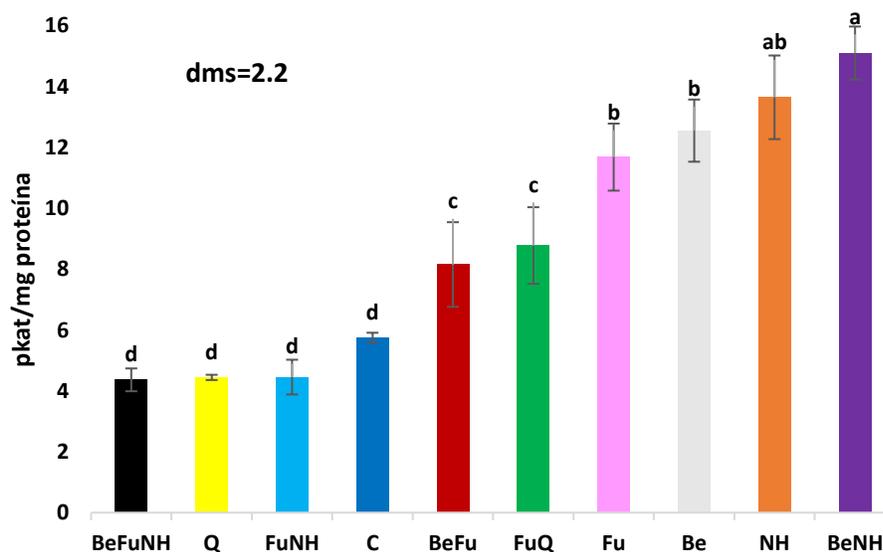
## 6.6. Actividad enzimática en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L.

### 6.6.1. Actividad de $\beta$ -1,3-glucanasas

Como resultados se observa (Figura 8) que a los 50 ddt, los tratamientos BeNH y NH presentaron los valores más altos en la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas (15.10 pkat·mg<sup>-1</sup> proteína) y (13.65 pkat·mg<sup>-1</sup> proteína) respectivamente, estos valores fueron los más altos a lo largo de todo el experimento, teniendo diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento C.

Se observa de igual forma que los tratamientos BeNH, NH y Be presentaron diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento FuQ, esto sugiere que los tratamientos con *B. bassiana* y los extractos de neem y hierba santa tienen una mayor actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas, que el tratamiento con fungicida químico contra el patógeno, por lo tanto, la aplicación de un hongo entomopatógeno y extractos

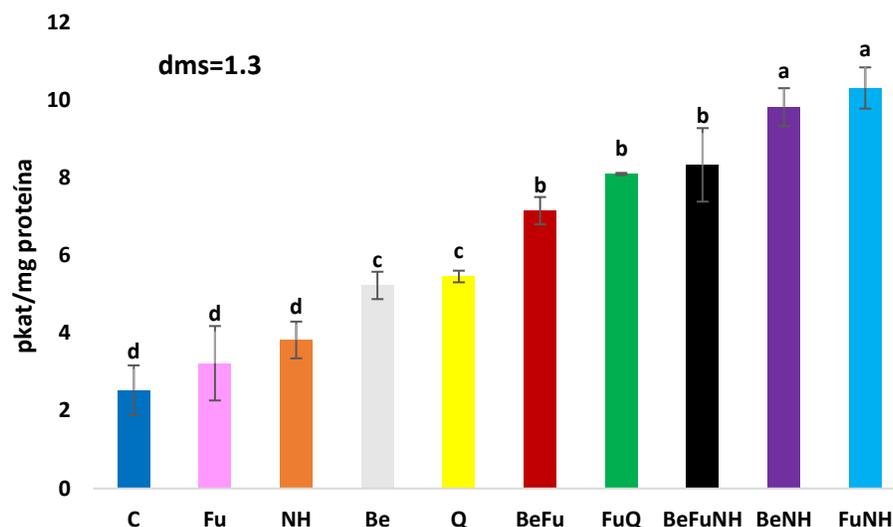
vegetales a las plantas de *S. lycopersicum* L. tiene un efecto benéfico para contrarrestar los efectos provocados por la infección de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.



**Figura 8. Actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L. a los 50 ddt.** BeFuNH: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. Q: Químico. FuNH: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. C: Control. BeFu: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. FuQ: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Químico. Fu: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Be: *B. bassiana*, NH: Neem + Hierba santa. BeNH: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

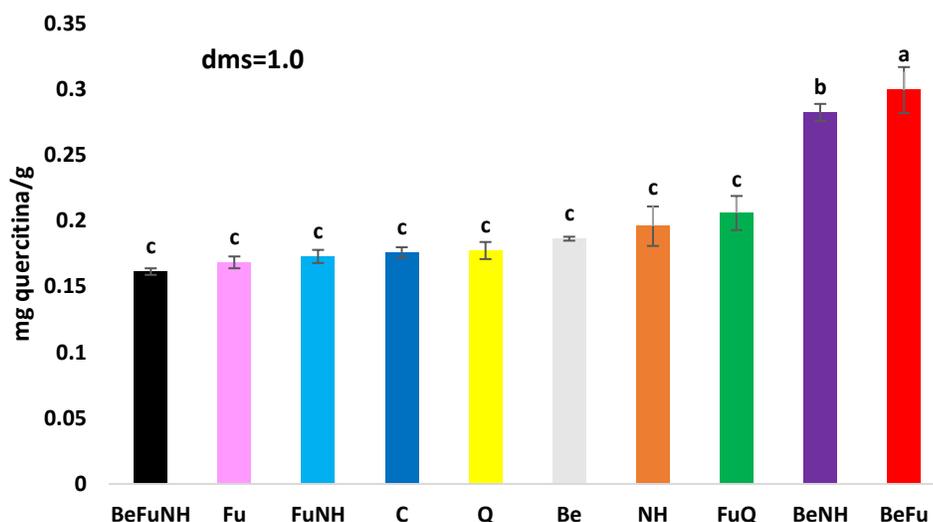
Se observa (Figura 9) que a los 82 ddt, los tratamientos FuNH y BeNH, presentaron los mayores valores en la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas, ( $10.31 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$ ) y ( $9.82 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$ ) respectivamente, teniendo diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento C, eso comprueba que en esos tratamientos existía infección por parte de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* debido a la mayor producción enzimática en las plantas de *S. lycopersicum* L.

Se observa también que los tratamientos FuNH, BeNH y BeFuNH presentaron diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento Q.



**Figura 9. Actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L. a los 82 ddt.** C: Control, Fu: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. NH: Neem + Hierba santa. Be: *B. bassiana*. Q: Químico. BeFu: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. FuQ: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Químico. BeFuNH: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. BeNH: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. FuNH: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Se observa en la figura 10 que a los 114 ddt, los tratamientos BeFu y BeNH, presentaron los mayores valores en la actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas, ( $0.83 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína) y ( $0.35 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína) respectivamente teniendo diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento C y FuQ. Con ello se comprueba que la aplicación de un hongo entomopatógeno y extractos vegetales inducen el incremento de enzimas  $\beta$ -1,3-glucanasas para protección de la planta de *S. lycopersicum* L.



**Figura 10. Actividad de  $\beta$ -1,3-glucanasas en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L. a los 114 ddt.** BeFuNH: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. Fu: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. FuNH: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. C: Control. Q: Químico. Be: *B. bassiana*. NH: Neem + Hierba santa. FuQ: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Químico. BeNH: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. BeFu: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

En este estudio se observó que los tratamientos con extractos vegetales de neem (*A. indica*) y hierba santa (*Piper auritum*), así como el hongo entomopatógeno *B. bassiana*, presentaron los mayores valores en la actividad de la enzima  $\beta$ -1,3-glucanasas en todas los tratamientos durante todo el experimento.

La azadiractina es el principal metabolito secundario encontrado en la *Azadiracta indica* A. Juss. Otros estudios han demostrado actividad medicinal e insecticida, atribuidas a limonoides como azadiractina, que tiene una acción antialimentaria en los insectos, éste compuesto es clasificado como uno de los compuestos promisorios que se pueden extraer, no solo de *M. azederach*, sino también de *A. indica*. Los limonoides son tetratriterpenos que tienen como precursor un triterpeno, estos compuestos son capaces de inhibir el crecimiento o la alimentación de insectos.

Las plantas que tienen limonoides, además de la actividad insecticida, poseen otras aplicaciones, como antitumorales, antifúngicos, bactericidas y antivirales, lo que sugiere su papel en la defensa de la planta contra ciertos microorganismos (De Araujo *et al.*, 2009). Azadiractina es un tetraterpenoide característico de la familia Meliaceae especialmente del árbol Neem (*Azadirachta indica*). Este compuesto se encuentra en la corteza, hojas, frutos y, principalmente, en la semilla del árbol (Valladares *et al.*, 1997).

Al respecto estudios previos han revelado que la actividad enzimática incrementa como mecanismo de defensa contra estrés ambiental como por ejemplo ante una infección fúngica (Jetiyanon, 2007; Shanmugam y Kanoujia, 2011).

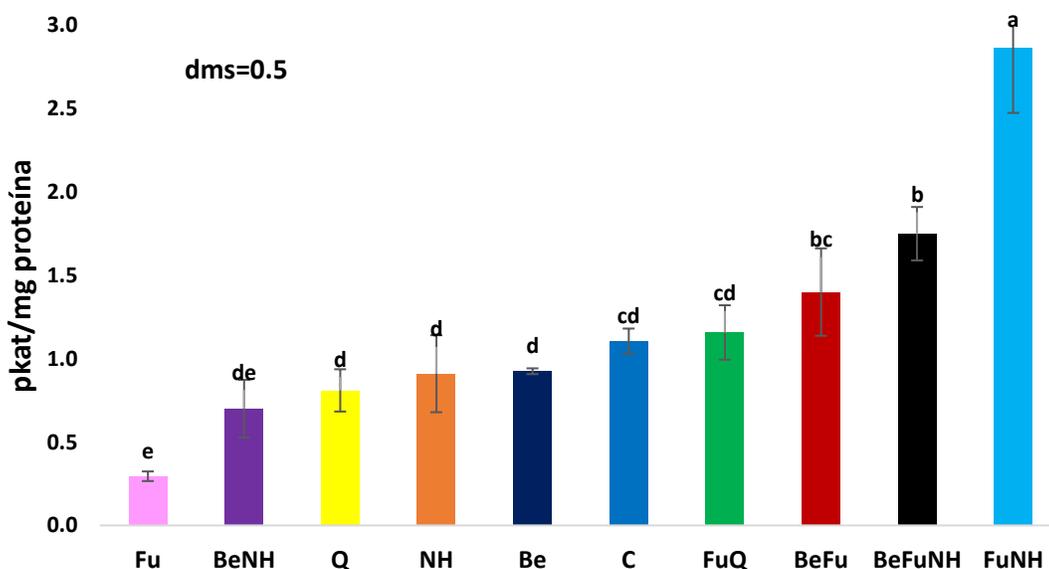
El antagonismo de *Beauveria bassiana* ha sido definido en los últimos años demostrándose la inhibición de enfermedades de plantas causadas por fitopatógenos de origen de suelo como *Rhizoctonia solani* (Lartey y Caesar, 2004) y *Pythium myriotylum* (Clark, 2006). *Beauveria bassiana* actúa como parásito oportunista de hábitos patogénicos y saprófitos sobre diversos fitopatógenos limitando su actividad mediante la producción de enzimas quitinasas, glucanasas, proteasas y lipasas que son importantes para la invasión y degradación del blanco fitopatógeno (Peteira *et al.*, 2011; Flórez *et al.*, 2005). El principal interés en la  $\beta$ -1,3 glucanasa es su posible función en la respuesta de plantas a patógenos microbianos, por ejemplo, durante el crecimiento de plantas de pepino (*Cucumis sativus*) en presencia de quitosana se controló el daño causado por *Pythium aphanidermatum* y se estimuló la producción de  $\beta$ -1,3 glucanasa en raíces y hojas (El Ghaouth *et al.*, 1994).

Fernández-Herrera *et al.* (2012) evaluaron la actividad de las glucanasas y peroxidadas en las raíces de las plantas de chile testigo (no inoculadas), las cuales se mantuvieron constante a lo largo de los cuatro tiempos evaluados, en contraste, en las raíces de plantas de chile inoculadas con *Phytophthora capsici*, la actividad de las enzimas se incrementó desde las 6 hpi y fue acrecentándose a medida que transcurrió el tiempo. Para ambas enzimas el incremento de su actividad fue significativo.

### 6.6.2. Actividad de quitinasas

Se observa en la figura 11 que a los 50 ddt, el tratamiento FuNH presentó el valor más alto en la actividad de quitinasas ( $2.86 \text{ pkat}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína), teniendo diferencia estadística significativa con el tratamiento C. Esto puede atribuirse al empleo de los extractos vegetales de neem y hierba santa contra *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

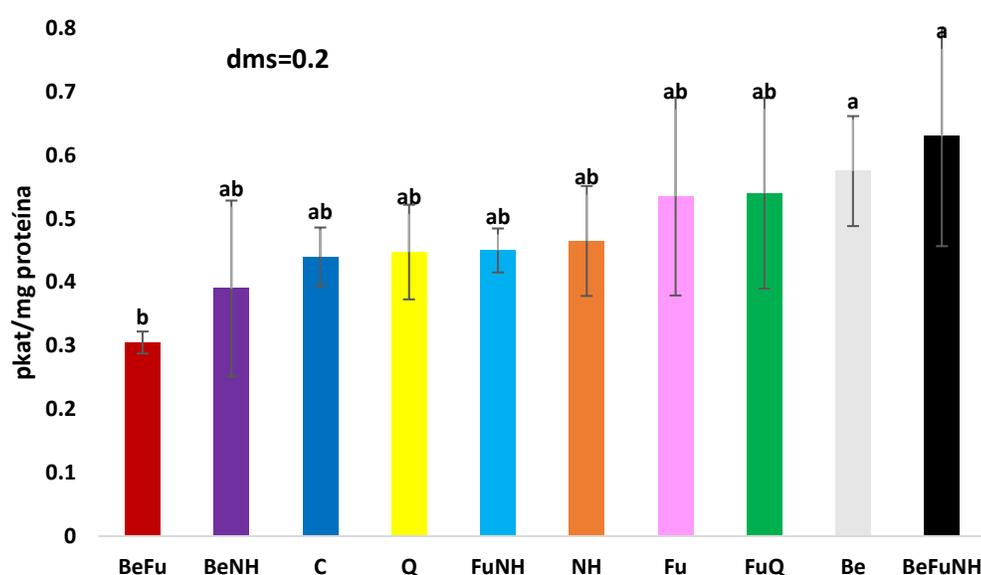
El tratamiento de BeFuNH presentó diferencia estadística significativa con el tratamiento C, evidenciando que las plantas se encontraban infectadas por el hongo patógeno. Los tratamientos de FuNH, BeFuNH y BeFu presentaron diferencia estadística significativa con el tratamiento Fu, eso demuestra que la presencia de *B. bassiana* y los extractos vegetales de neem y hierba santa producen una mayor actividad enzimática para combatir el estrés biótico en la planta por la presencia de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.



**Figura 11. Actividad de quitinasas en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L. a los 50 ddt.**  
Fu: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. BeNH: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. Q: Químico. NH: Neem + Hierba santa. Be: *B. bassiana*. C: Control. FuQ: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Químico. BeFu: *B.*

*bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. BeFuNH: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. FuNH: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Se observa en la figura 12 que a los 82 ddt, no hubo diferencia estadística significativa entre todos los tratamientos.

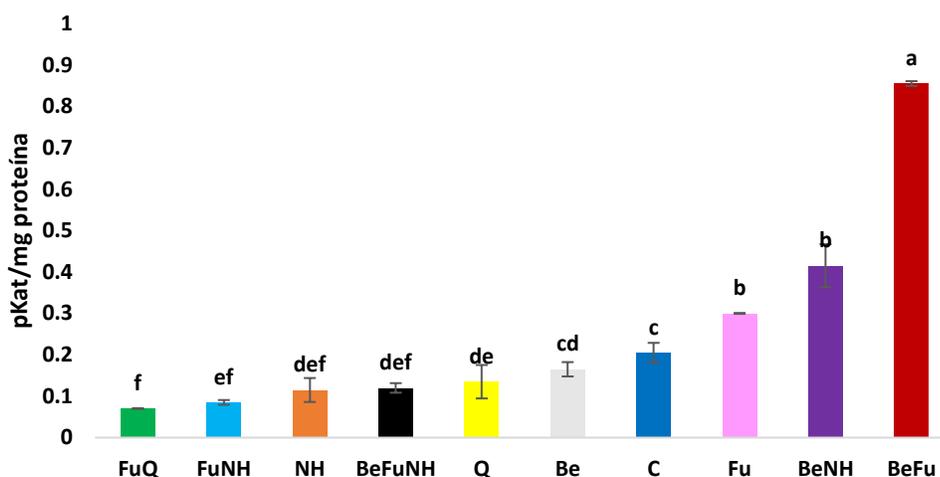


**Figura 12. Actividad de quitinasas en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L. a los 82 ddt.** BeFu: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. BeNH: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. C: Control. Q: Químico. FuNH: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. NH: Neem + Hierba santa. Fu: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. FuQ: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Químico. Be: *B. bassiana*. BeFuNH: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Se observa en la figura 13 que a los 114 ddt, el tratamiento BeFu tuvo el valor más alto en la actividad de quitinasas ( $0.85 \text{ pkat} \cdot \text{mg}^{-1} \text{ proteína}$ ), teniendo diferencia estadística significativa con el tratamiento C.

El tratamiento de BeFu presentó diferencia estadística significativa con el tratamiento Fu, evidenciando que la presencia de *B. bassiana* genera una mayor actividad enzimática para combatir el estrés por *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.

Los tratamientos de BeFu y BeNH presentaron diferencia estadística significativa con el tratamiento Q.



**Figura 13. Actividad de quitinasas en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L. a los 114 ddt.** FuQ: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Químico. FuNH: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. NH: Neem + Hierba santa. BeFuNH: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. Q: Químico. Be: *B. bassiana*. C: Control. Fu: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. BeNH: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. BeFu: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

En este estudio se observó que los tratamientos con extractos vegetales de neem y hierba santa, así como el hongo entomopatógeno *B. bassiana*, presentaron los mayores valores en la actividad de la enzima quitinasa a lo largo de la experimentación.

*Beauveria bassiana* infecta al hongo patógeno por la penetración directa de la cutícula o pared celular empleando diferentes enzimas. Las quitinasas son importantes para

facilitar cada etapa de la infección del hongo, desde el proceso de germinación de la conidia, crecimiento de la hifa y hasta la penetración de esta en el organismo afectado (Ownley *et al.*, 2010; González *et al.*, 2010).

*Beauveria bassiana* produce numerosos metabolitos secundarios incluyendo beauvericina, bassianina, beauverolidas, bassianolidas, oosporeina, y bassianolona, entre otros (Ownley *et al.*, 2010). De estos compuestos, la beauvericina, secretada por los géneros *Beauveria* e *Isaria*, es particularmente interesante por sus propiedades antimicrobianas (Wang y Xu, 2012).

Existe evidencia de que la pared celular de fitopatógenos induce la expresión de enzimas como la  $\beta$ -1,3-glucanasas en ensayos de laboratorio, como la  $\beta$ -1,3-glucanasa Glu1 de *Clonostachys rosea* y exo- $\beta$ -1,3-glucanasa de *Trichoderma asperellum* tag83 (Chatterton y Punja, 2009; Marcello *et al.*, 2010).

El trabajo de Pérez *et al.* 2001b, consistió en la inducción de quitinasas y de glucanasas, también se evaluó en plántulas de *Solanum lycopersicum* L., luego de inocularlas con *Fusarium solani*, o con *Trichoderma harzianum*, o con ambos. Se estableció que ambos microorganismos inducían quitinasas en la planta, pero a tiempos diferentes.

Las quitinasas inducidas luego de la inoculación conjunta, correspondían solamente a las relacionadas con la inoculación con *T. harzianum*, situación en la que las plántulas de *S. lycopersicum* L. se mantenían sanas. Sin embargo, los ensayos de antagonismo directo de *T. harzianum* enfrentado a *F. solani* mostraron una inhibición parcial del desarrollo del patógeno, sugiriendo la necesidad de contar con microorganismos con una mayor capacidad antagónica.

Las quitinasas son enzimas que hidrolizan la quitina (polímero de  $\beta$ -1,4 N-acetil glucosamina); el cual es el principal carbohidrato de la pared celular de los hongos. Por esto, dichas enzimas cobran un papel importante en el control biológico de fitopatógenos. Esto ha sido ilustrado por Cotes (1994), quien determinó la importancia de estas enzimas en el control biológico de *Pythium splendens* y de *Rhizoctonia solani*

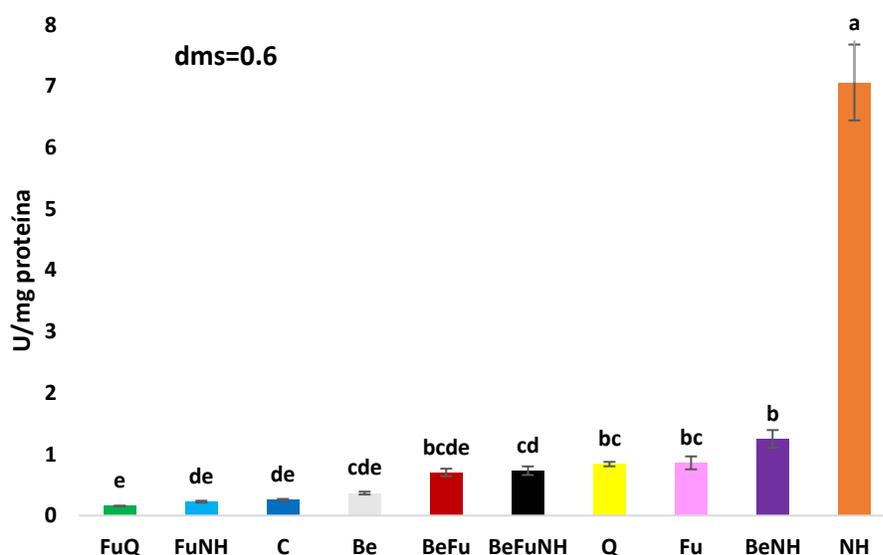
en frijol y Mattieu *et al.*, (1989), quienes les atribuyeron a estas enzimas la reducción del efecto de *Cladosporium fulvum* (Syn: *Fulvia fulva*) en plantas de tomate (*S. lycopersium* L.)

En plantas de pepino (*Cucumis sativus*) creciendo en presencia de quitosana, se controló el daño radicular causado por *Pythium aphanidermatum* y se indujeron varias respuestas de defensa de la planta incluyendo el aumento de la actividad de quitinasas en hojas (El Ghaouth *et al.*, 1994).

### 6.6.3. Actividad de peroxidadas

Se observa en la figura 14 que a los 144 ddt, el tratamiento NH tuvo la mayor actividad de peroxidadas ( $7.06 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$  proteína), presentando diferencia estadística significativa con respecto a los tratamientos C y Q, evidenciando el efecto en la actividad enzimática cuando se empleó extracto de neem en las plantas de *Solanum lycopersicum* L.

El tratamiento Fu presentó diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento C, comprobando que existía un estrés de la planta por la presencia de *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*.



**Figura 14. Actividad de peroxidadas en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L. a los 114 ddt.** FuQ: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Químico. FuNH: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. C: Control. Be: *B. bassiana*. BeFu: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. BeFuNH: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. Q: Químico. Fu: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. BeNH: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. NH: Neem + Hierba santa. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

En este estudio se observó que el tratamiento que consistió en la combinación de los extractos vegetales de neem y hierba santa (NH) presentó la mayor actividad enzimática de peroxidasa comparado con los demás tratamientos evaluados. De igual manera el tratamiento con *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, presentó mayor actividad de la enzima peroxidasa con respecto al tratamiento control, comprobando la infección de las plantas de *S. lycopersicum* L.

Villa-Martínez *et al.* (2015) reporta que las mezclas de extractos vegetales, con propiedad antifúngica encontrados en las plantas pueden afectar a patógenos diferencialmente, ya sea de manera individual o por las mezclas en determinadas concentraciones y proporciones.

Pérez *et al.* (2004), reportan que las peroxidasa han sido estudiadas en tejidos infectados. Generalmente, después de daños o infección, se detectan incrementos en sus actividades. Hanaa *et al.*, (2011) realizaron una aplicación de extracto acuoso de neem (*A. indica*) a plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*) infectadas con *Fusarium*, el extracto redujo el porcentaje de incidencia de la enfermedad al nivel de 25.5%, de igual manera redujo significativamente el nivel de peroxidación lipídica e indujo altas actividades antioxidantes de enzimas defensivas, tales como peroxidasa (POX), catalasa (CAT) y superóxido dismutasa (SOD), después de la infección.

Entre los procesos que involucran la enzima peroxidasa (POX) se encuentran: regulación hormonal, mecanismos de defensa, control de elongación celular, polimerización de extensina, entrecruzamiento de los polisacáridos de la pared celular, biosíntesis de lignina y procesos de suberización (Ayyappan *et al.*, 1996). Una de las respuestas de plantas a patógenos es la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), evento para el cual se han postulado diversos sistemas enzimáticos y con mucha frecuencia, el correspondiente a peroxidasa de la pared celular (Tian *et al.*, 2005).

Por otro lado, Luhová *et al.* (2006), realizaron un análisis de actividades enzimáticas, entre ellas la de peroxidasa (POX), en raíces de 2 genotipos de *Pisum sativum* con

diferente susceptibilidad a *F. oxysporum* y *F. solani*, y encontraron un aumento de actividad para esta enzima en raíces infectadas a partir del día dos y hasta el 28 pos-inoculación. Existen reportes en los que la enzima peroxidasa está involucrada en las interacciones hospedero – patógeno. En frutos de manzana se reportó aumento en su actividad, así como en el contenido de lignina, y a su vez, una disminución en la incidencia de la enfermedad frente al ataque de *Penicillium expansum* (Valentines *et al.*, 2005). Mientras en el fruto de pera se reportó un aumento en la actividad peroxidasa cuando los frutos fueron inoculados con *Alternaria alternata* (Tian *et al.*, 2005).

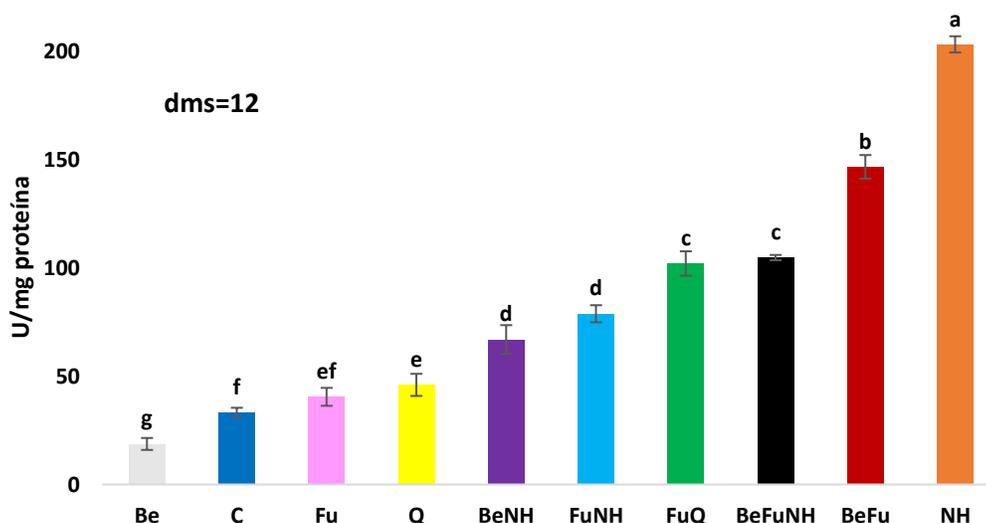
Higuera *et al.* (2009) evaluaron la inducción de peroxidasa en frutos de lulo (*Solanum quitoense* L.) infectados con el patógeno *Colletotrichum acutatum*. Los resultados mostraron un aumento en la actividad enzimática de peroxidasa muy notable, correspondiente a cuatro veces el valor obtenido para el control, inducción que se puede atribuir a la presencia del patógeno. Dicho aumento se ha correlacionado con frecuencia con el incremento en el contenido de compuestos fenólicos y de lignina, la cual forma parte de la defensa pasiva del hospedero, ya que es un mecanismo mediante el cual se refuerza la pared celular para impedir la invasión del patógeno y que conlleva la intervención de diversas peroxidases.

La interacción simbiótica del tomate con otros microorganismos puede contribuir con la inducción de resistencia en la planta. El tratamiento de semillas con cepas de rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal como *Pseudomonas fluorescens* Migula (cepa Pf-04), su aplicación al suelo o ambos tratamientos, indujeron la síntesis de peroxidases (POX) y polifenol oxidasas (PPO) cuando se expusieron a *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Usharani *et al.*, 2008).

#### 6.6.4. Actividad de catalasas

En la figura 15 se observa que el tratamiento NH presentó la mayor actividad de catalasas a los 114 ddt ( $203 \text{ U}\cdot\text{mg}^{-1}$  proteína), tuvo diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento C, por lo que la presencia de los extractos vegetales es de ayuda para el mecanismo de defensa de la planta. Los tratamientos de NH, BeFu, BeFuNH y FuNH, tuvieron diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento Fu, demostrándose así que la aplicación de *B. bassiana* y los extractos de neem y hierba santa producen una mayor actividad enzimática, por lo tanto, un mecanismo de defensa para las plantas de *Solanum lycopersicum* L.

El tratamiento BeFu presentó diferencia estadística significativa en la actividad catalasa con respecto al tratamiento FuQ, por lo tanto, el hongo entomopatógeno *B. bassiana* induce una mayor actividad en la producción enzimática de catalasas para la protección de las plantas de *S. lycopersicum* L. en comparación a un tratamiento químico.



**Figura 15. Actividad de catalasas en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L. a los 114 ddt.** Be: *B. bassiana*. C: Control. Fu: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Q: Químico. BeNH: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. FuNH: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. FuQ: *F. oxysporum* f.sp.

*lycopersici* + Químico. BeFuNH: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. BeFu: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. NH: Neem + Hierba santa. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

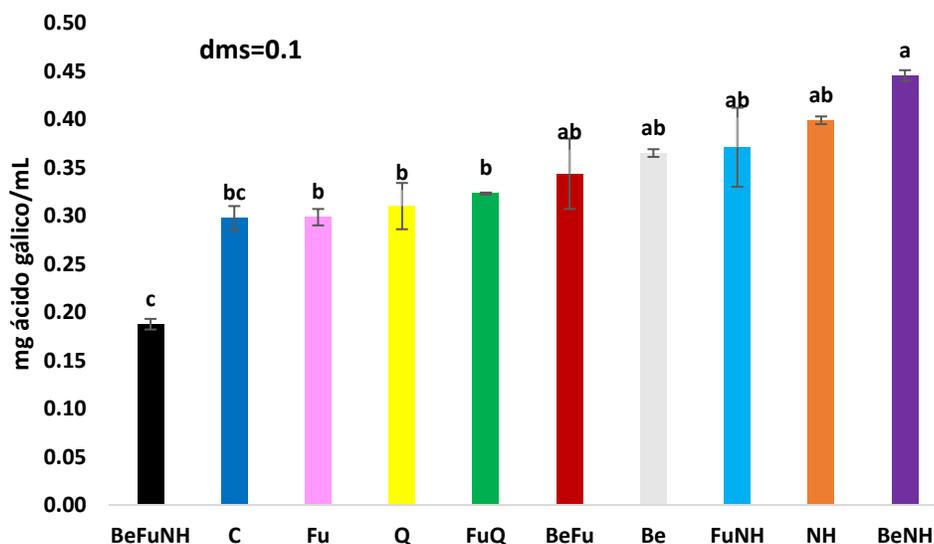
En este estudio se observaron que el tratamiento que consistió en la combinación de los extractos vegetales de neem y hierba santa presentaron la mayor actividad enzimática comparado con los demás tratamientos evaluados. Hanaa *et al.* (2011) emplearon extractos acuosos de neem (*Azadirachta indica*) y sauce (*Salix babylonica*) en plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum*); estos redujeron la incidencia de la enfermedad de la marchitez por *Fusarium oxysporum* en plántulas de *Solanum lycopersicum* L. hasta casi un 30%, mediante el aumento de las actividades de las enzimas defensivas antioxidantes secretadas por la planta de *Solanum lycopersicum* L., como la peroxidasa (POX), la catalasa (CAT) y la súper óxido dismutasa (SOD). Normalmente la catalasa protege a la planta contra el estrés oxidativo ejercido por las especies reactivas de oxígeno (Chen *et al.*, 1993). La catalasa (CAT) es la principal enzima antioxidante que participa en el control intracelular de las concentraciones de  $H_2O_2$  generado por el metabolismo u otras fuentes, es capaz de degradar  $H_2O_2$  sin consumir equivalentes reductores celulares. Por lo tanto, la catalasa (CAT) provee a la célula de un mecanismo eficiente de degradación sin comprometer procesos energéticos al tener una ganancia neta de reductores y energía, su función primaria es proteger a las células del daño al DNA, proteínas y lípidos (Levine *et al.*, 1994). El aumento de la actividad de enzimas catalasas (CAT) y peroxidasas (POX), también coincide con la acumulación de ácido salicílico (AS); una molécula señal involucrada en la vía de transducción de señales activadas en las reacciones planta-patógeno (Blilou *et al.*, 2000). Van Camp *et al.* (1998), reportaron que el aumento en la actividad de la catalasa (CAT) y peroxidasa (POX), se puede deber a la función que tienen como antioxidantes, para cualquier molécula activa de oxígeno que ha sido generada durante los estados iniciales de la penetración del hongo. El  $H_2O_2$  y otras especies reactivas de oxígeno están involucradas en la cascada de transducción de señales en las interacciones planta-patógeno.

## 6.7. Metabolitos secundarios en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L.

### 6.7.1. Cuantificación de fenoles totales

De acuerdo con la figura 16, se puede observar que el tratamiento BeNH tuvo la mayor concentración de fenoles totales (0.45 mg ácido gálico/mL) a los 82 ddt y presentó diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento C, Q y Fu, evidenciando que *B. bassiana* y los extractos vegetales de neem y hierba santa promueven una mayor producción de fenoles totales, por lo tanto, protección a las plantas de *S. lycopersicum* L.

El tratamiento de NH presentó diferencia estadística significativa en la producción de fenoles totales, con respecto al tratamiento químico contra el patógeno (FuQ), por lo que la combinación de los extractos de neem y hierba santa es más efectivo en la producción de fenoles totales.

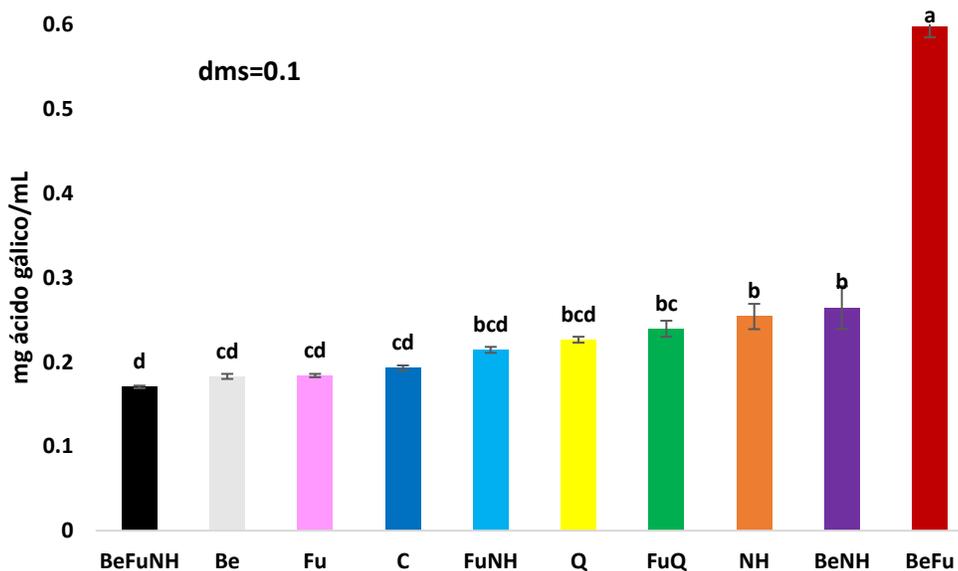


**Figura 16. Cuantificación de fenoles totales en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L. a los 82 ddt.** BeFuNH: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. C: Control. Fu: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Q: Químico. FuQ: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Químico. BeFu:

*B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Be: *B. bassiana*. FuNH: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. NH: Neem + Hierba santa. BeNH: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Se observa en la figura 17 que el tratamiento BeFu tuvo la mayor concentración de fenoles totales (0.59 mg ácido gálico/mL) a los 114 ddt y presentó diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento C, Q y Fu.

Los tratamientos de BeFu, BeNH y NH presentaron diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento C, lo que evidencia que la aplicación de *B. bassiana* y los extractos de neem y hierba santa en las plantas de *S. lycopersicum* L. es benéfico por la mayor producción de metabolitos secundarios.



**Figura 17. Cuantificación de fenoles totales en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L. a los 114 ddt.** BeFuNH: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. Be: *B. bassiana*. Fu: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. C: Control. FuNH: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. Q: Químico. FuQ: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Químico. NH: Neem + Hierba santa.

BeNH: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. BeFu: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Los compuestos fenólicos son necesarios para la supervivencia de las plantas ante situaciones de estrés impuestas por factores tanto bióticos como abióticos (Broun, 2005; Nascimento, 2010). Se sabe que los compuestos fenólicos tienen funciones protectoras contra los microorganismos patógenos (Osorio *et al.*, 2010). Existen reportes sobre el uso de compuestos fenólicos como inhibidores de distintos patógenos; por ejemplo, Mendoza (2013) reporta el potencial de estos compuestos contra *Botrytis cinérea*.

Higuera *et al.* (2009) evaluaron la inducción de peroxidasa en frutos de lulo (*Solanum quitoense* L.) infectados con el patógeno *Colletotrichum acutatum*. Los resultados permitieron establecer que hubo incremento significativo en la producción de fenoles totales en los lulos inoculados con el hongo patógeno, la acumulación de compuestos fenólicos es una de las respuestas típicas de defensa de las plantas frente al ataque de patógenos. De la misma manera compuestos aislados de *Veratrum álbum*, fueron reportados por sus efectos contra los hongos *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola* y *B. cinerea* en el cultivo de la vid (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011; Adrian y Jeandet, 2012; Wu *et al.*, 2013).

Los antioxidantes se incrementan ante condiciones de estrés debido al papel crucial que juegan para inactivar las especies reactivas de oxígeno, además de que influyen en la expresión génica asociada con las respuestas de estrés biótico y abiótico (Tokunaga *et al.*, 2005). De acuerdo con Pavarini (2012), la concentración de los compuestos fenólicos se ve modificada por estrés biótico y abiótico al que se somete la planta. Siendo la temperatura, la radiación, la nutrición y el riego, factores de estrés abiótico que afectan la concentración de fenoles. Las principales funciones de este tipo de metabolito en las células vegetales han sido actuar como metabolitos esenciales para el crecimiento y reproducción de las plantas, y como agentes protectores frente a la acción de patógenos, siendo secretados como mecanismos de defensa (Butler, 1992; Ferreres *et al.*, 2008).

La acumulación rápida y temprana de compuestos fenólicos en los sitios de la infección es una característica de las respuestas basadas en la defensa. Esta acumulación de fenoles tóxicos puede dar lugar al aislamiento eficaz del patógeno en el sitio original de la entrada (De Ascensao y Dubery, 2003).

### 6.7.2. Cuantificación de flavonoides

De acuerdo con la figura 18, el tratamiento NH tuvo la mayor concentración de flavonoides (0.459 mg quercitina/g) a los 82 ddt y presentó diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento C y Fu. Estos resultados demostraron que el empleo de los extractos vegetales de neem y hierba santa causan una mayor producción de metabolitos secundarios, lo cual es de ayuda a la planta de *S. lycopersicum* L.

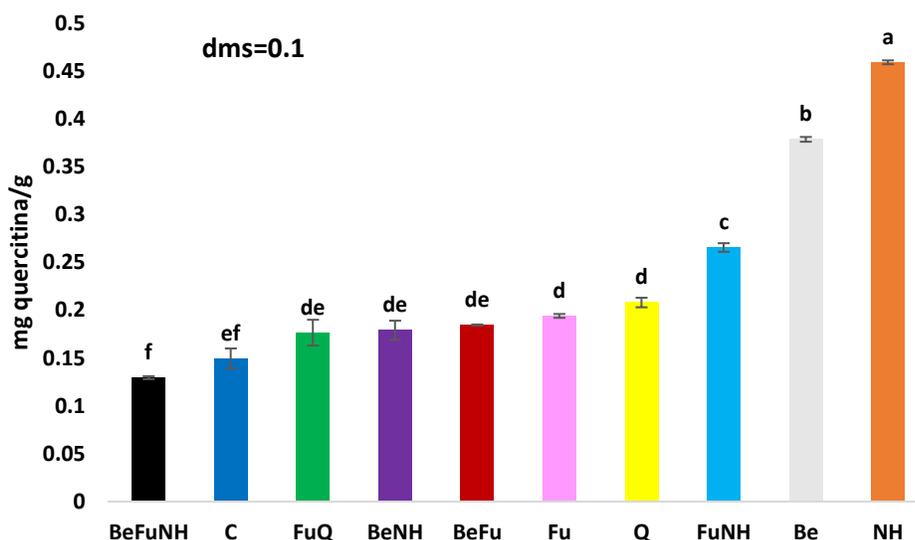
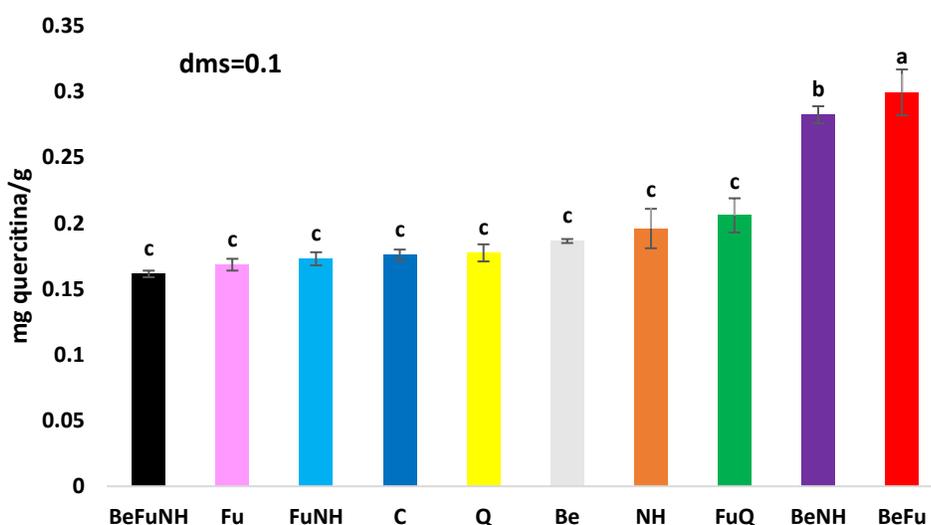


Figura 18. Cuantificación de flavonoides en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L. a los 82 ddt. BeFuNH: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. C: Control. FuQ:

*F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Químico. BeNH: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. BeFu: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Fu: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Q: Químico, FuNH: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. Be: *B. bassiana*, NH: Neem + Hierba santa. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Se observa en la figura 19 que el tratamiento BeFu tuvo la mayor concentración de flavonoides (0.299 mg quercitina/g) a los 114 ddt y presentó diferencia estadística significativa con respecto al tratamiento C y Fu.

Los tratamientos BeFu y BeNH presentaron diferencia estadística significativa en la concentración de flavonoides con respecto al tratamiento FuQ.



**Figura 19. Cuantificación de flavonoides en raíces de plantas de *Solanum lycopersicum* L. a los 114 ddt.** BeFuNH: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. Fu: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. FuNH: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Neem + Hierba santa. C: Control. Q: Químico. Be: *B. bassiana*, NH: Neem + Hierba santa. FuQ: *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici* + Químico. BeNH: *B. bassiana* + Neem + Hierba santa. BeFu: *B. bassiana* + *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Letras diferentes indican promedios estadísticamente diferentes según prueba de Tukey ( $p \leq 0.05$ ).

Los flavonoides ejercen su efecto antioxidante por neutralización de todo tipo de radicales por oxidación incluyendo peróxidos y radicales hidroxilos por quelación. La potente actividad antioxidante de flavonoides, su habilidad para capturar radicales hidroxilos puede ser la función más importante de los flavonoides (Merfort *et al.*, 1996). Los flavonoides retiran oxígeno reactivo, especialmente en forma de aniones superóxidos, radicales hidroxilos, hidroperóxidos y peróxidos lipídicos. (Merfort *et al.*, 1996).

Pedroso *et al.* (2012) obtuvieron extractos vegetales de *Acacia farnesiana* y evaluaron *in vitro* el efecto antifúngico sobre el hongo *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, la inhibición del crecimiento micelial fue del 90 %, atribuyéndole el efecto antifúngico a la presencia de flavonoides, que son un grupo de compuestos con amplio rango de actividad biológica, que incluye la actividad antimicrobiana, antiviral, atrayente de polinizadores, protectora de las plantas contra la luz ultravioleta, antioxidantes y antibacterial (Maneemegali y Naveen, 2010). Autores como Seigler (2003) y Sánchez *et al.* (2010) han identificado a los flavonoides presentes en plantas de la misma familia como responsables de la actividad antimicrobiana sobre otros microorganismos fitopatógenos.

Zhou *et al.* (2009) evaluaron los flavonoides de *Sophora flavescens* sobre el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*, se estudió el efecto de resistencia a la enfermedad y la fisiología de la resistencia con diferentes concentraciones. Los resultados de la prueba de prevención indicaron que los flavonoides de *Sophora flavescens* aumentaron la resistencia a la enfermedad del pepino (*Cucumis sativus*) y frenó el crecimiento micelial de *F. oxysporum* f.sp. *cucumerinum*.

## 7. CONCLUSIONES

Los extractos vegetales de *Azadirachta indica* y *Piper auritum* inhiben el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* y no así el de *Beauveria bassiana*.

*Beauveria bassiana* tiene efecto fungistático contra *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* por lo que puede ser utilizado como agente de control biológico para mitigar la enfermedad de plantas de *Solanum lycopersicum* L.

Los tratamientos con *Beauveria bassiana* y extractos vegetales presentaron concentraciones más altas de metabolitos secundarios y actividades enzimáticas contribuyendo a que la planta genere mecanismos de defensa para una mayor protección.

La aplicación al suelo de *Beauveria bassiana* y extractos vegetales de *Azadirachta indica* y *Piper auritum* mitiga el daño por *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* a las plantas de *Solanum lycopersicum* L. y no tuvo diferencia significativa en los parámetros morfométricos de las plantas comparado con la aplicación de un tratamiento químico, es una innovadora estrategia de control para el cultivo de *Solanum lycopersicum* L.

## 8. REFERENCIAS

- Abe, F., Chen, R.F., Yamauchi, T. (1996). Dinomonoterpenoids and Their apiosylglycosides from *Thevetia peruviana*. *Phytochemistry* 43(1): 161-164.
- Aceves, M., Otero-Sánchez, M.A., Rebolledo-Domínguez, O., Lezama-Gutiérrez, R., Ochoa-Moreno, M.E. (2005). Producción y efecto antagónico de quitinasas y glucanasas por *Trichoderma* spp., en la inhibición de *Fusarium subglutinans* y *Fusarium Oxysporum in vitro*. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 11: 273- 278.
- Adrian, M. & Jeandet, P. (2012). Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia* 83:1345-1350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2012.04.004>.
- Aebi, H., (1974). Catalase. In: Bergmeyer, H.U. (Ed.), *Methods of Enzymatic Analysis*. Verlag Chemie/Academic Press Inc, Wein-heim/NewYork, USA, pp. 673–677.
- Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. 5 TH ED. 948 p. ISBN 0-12-044565-4.
- Agbenin, O.N. & Marley, P.S. (2006). *In vitro* assay of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* causal agent of tomato wilt. *Journal of plant protection research*, 46(3), 215-220
- Ajithkumar, I.P. & Panneerselvam, R. (2014). ROS scavenging system, osmotic maintenance, pigment and growth status of *Panicum sumatrense* roth under drought stress. *Cell Biochemistry and Biophysics*. 68 (3):587-595.

- Akanmu, A.O., Odebode, A.C., Abiala, M.A., Aiyelaagbe, O.O., Olaoluwa, O.O. (2014). Inhibition of *Fusarium* Pathogens in Millet by Extracts of *Jatropha Curcas* and *Mangifera Indica*. International Journal of Plant Biology & Research.
- Akrami, M., & Yousefi, Z. (2015). Biological control of *Fusarium* wilt of tomato (*Solanum lycopersicum*) by *Trichoderma* spp. as antagonist fungi. In Biological Forum (Vol. 7, No. 1, p. 887). Research Trend.
- Albiero, A. L. M., de Souza, L. A., Mourao, K. S. M., de Almeida, O. J. G., Lopes, W. A. L. (2005). Morfo-anatomia do caule e da folha de *Piper gaudichaudianum* Kuntze (Piperaceae). acta farmacéutica bonaerense, 24(4), 550.
- Almeida, B., Cerqueira, F., Silva, R., Ulhoa, C., Lima, A. (2007). Mycoparasitism studies of *Trichoderma harzianum* strains against *Rhizoctonia solani*: evaluation of coiling and hydrolytic enzyme production, Biotechnology Letters 29: 1189-1193.
- Alonso-Villaverde, V., Voinesco, F., Viret, O., Spring, J.L., Gindro, K. (2011). The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. Plant Physiology and Biochemistry 49:265-274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.12.010>.
- Alvarado, C.L.O., Ochoterena, H. (2007). A Phylogenetic Analysis of the *Cascabela-Thevetia* Species Complex (Plumeriaceae, Apocynaceae) Based on Morphology, Annals of the Missouri Botanical Garden 94 (2): 298-323, EE. UU.
- Ambang, Z., Ngoh Dooh, J.P., Essono, G., Bekolo, N., Chewachong, G., Asseng, C. C. (2010). Effect of *Thevetia peruviana* Seeds Extract on *in vitro* Growth of Four Strains of *Phytophthora megakarya*. Plant Omics, 3(3), 70.

- Ardila, H.D., Higuera, B.L., (2005). Inducción diferencial de Polifenol oxidasa y -1,3-glucanasa en clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante la infección por *Fusarium oxysporum* f.sp.*dianthi* raza 2. Acta Biológica Colombiana. 2005. 10: 65-78.
- Arora, A., Sairam, R.K., Srivastava, G.C. (2002). Oxidative stress and antioxidative system in plants. Current science, 1227-1238.
- Arras, G., De Cicco, V., Arru, S., Lima, G. (1998). Biocontrol by yeasts of blue mould of citrus fruits and the mode of action of an isolate of *Pichia guilliermondii*. Journal of Horticultural Science and Biotechnology, 73(3), 413-418. doi:10.1080/14620316.1998.11510993.
- Ávalos García, A. & Pérez-Urria Carril, E. (2009) Metabolismo secundario de plantas. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145.
- Ayyappan, R., Showalter, N., Showalter, A. (1996). Purification and characterization of a wound-inducible cell wall cationic peroxidase from carrot roots. Biochemical and biophysical research communications, 226(1), 254-260.
- Badii, M.H., Tejada, L.O., Flores, A.E., Lopez, C.E., Quiróz, H. (2000). Historia, fundamentos e importancia. Fundamentos y Perspectivas de Control Biológico. UANL, Monterrey, 3-17.
- Bakan, B., Bily, A.C., Melcion, D., Cahagnier, B., Regnault-Roger, C., Philogène, B. J., Richard-Molard, D. (2003). Possible role of plant phenolics in the production of trichothecenes by *Fusarium graminearum* strains on different fractions of maize kernels. Journal of agricultural and food chemistry, 51(9), 2826-2831.
- Bandara, V., Weinstein, S.A., White, J., Eddleston, M. (2010). A review of the natural history, toxinology, diagnosis and clinical management of Nerium oleander (common

oleander) and *Thevetia peruviana* (yellow oleander) poisoning. *Toxicon*. Vol. 56: 273–281.

- Bara, T., Lima, A., Ulhoa, C. (2003). Purification and characterization of an exo-beta-1,3- glucanase produced by *Trichoderma asperellum*. *FEMS Microbiology Letters* 219: 81-85.
- Benavides, J., (1983). Investigación en árboles forrajeros. Reporte del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Turrialba, Costa Rica.
- Bhoyar, S. & Biradar S.D. (2014). Antibacterial activity of root extract of *Thevetia peruviana* (Pers.) Schum. *International Research Journal of Pharmacy*. 5(6):468-470.
- Bilton, R., Gerber, M., Grolier, P., Leoni, C. (2001). The white book on antioxidants in tomatoes and tomato products and their health benefits. Final report of the Concerted Action Fair CT97-3233. CMITI Sarl: Avignon, Francia.
- Blilou, I., Bueno, P., Ocampo, J.A., García-Garrido, J.M. (2000). Induction of catalase and ascorbato peroxidase activities in tobacco roots inoculated with the arbuscular mycorrhizal fungus *Glomus mosseae*. *Mycological Research*, 104, 722-725.
- Biswas, K., Chattopadhyay, I. Banerjee, R.K., Bandyopadhyay, U. (2002). Biological activities and medicinal properties of Neem (*Azadirachta indica*) *Current Science* 82(11):1336-1345.
- Boller, T., Gehri, A., Mauch, F., Vogeli, U. (1983). Chitinase in bean leaves: induction by ethylene, purification, properties and possible function. *Planta* 157: 22-31.

- Bolívar, K., Sanabria, M., Rodríguez, D., de Camacaro, M., Ulacio, D., Cumana, L., Crescente, O. (2009) Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo in vitro del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Penz. & Sacc y de la antracnosis en frutos de mango. Revista Científica UDO Agrícola, 9(1), 175-181.
- Borkvich, K. A. & Ebbole, D. J. (2010). Cellular and Molecular Biology of Filamentous Fungi. Section 42: Mycoparasitism: 676-693. Ed. American Society for Microbiology (ASM). ISBN 978-1-55581-473-1.
- Bosland, P.W. (1988). *Fusarium oxysporum* a pathogen of many plant species. Advances in plant pathology. Vol. 6: 281- 289.
- Bottia, E.J.S., Díaz, O.L.F., Mendivelso, D.I., Martínez, J.R., Stashenko, E.E. (2007). Comparación de la composición química de los metabolitos secundarios volátiles de cuatro plantas de la familia *Piperaceae* obtenidos por destilación extracción simultáneas. Scientia et Técnica. XIII(033):193-195.
- Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Analytical biochemistry, 72(1-2), 248-254.
- Bradley, D.J., Kjellbom, P., Lamb, C.J. (1992). Elicitor-induced and wound-induced oxidative cross-linking of a proline-rich plant cell wall protein-a novel, rapid defense response cell 70: 21-30.
- Broun, P. (2005). Transcriptional control of flavonoid biosynthesis: a complex network of conserved regulators involved in multiple aspects of differentiation in *Arabidopsis*. Current opinion in plant biology. 8: 272-279. DOI: 10.1016/j.pbi.2005.03.006.

- Butler, L.G. (1992). Antinutritional effects of condensed and hydrolyzable tannins. Plant Polyphenols, Plenum Press, New York. pp 693.
- Cai, G., Gale, I.R., Scheider, R.W., Kistler, H.C., Davis, R.M., Elias, K.S., Miyao, E.M. (2003). Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* at a single site in California. Phytopathology 93: 1014–1022.
- Calle, J., Rivera, A., Joseph, P. (1987). Pinitol from the leaves of *Gliricidia sepium*. Planta Med. 53: 303.
- Camarena-Gutiérrez, G. (2006). Las especies reactivas de oxígeno en defensa de las plantas contra patógenos. Revista Chapingo. Serie ciencias forestales y del ambiente, 12(1), 25-30.
- Camarena-Gutiérrez, G., & Torre-Almaráz, R.D.L. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente, 13(2), 157-162.
- Campbell, J. K.; Canene-Adams, K., Lindshield, B. L.; Boileau, T. W.; Clinton, S. K.; Erdman Jr. J. W. (2004). Tomato phytochemicals and prostate cancer risk. The Journal of Nutrition 134, 3486S-3492S.
- Cartaya, O. & Reynaldo, I. (2001). Flavonoides: Características químicas y aplicaciones. Cultivos tropicales, 22(2), 5-14.
- Castoria, R., De Curtis, F., Lima, G., Caputo, L., Pacifico, S., De Cicco, V. (2001). *Aureobasidium pullulans* (LS-30) an antagonist of postharvest pathogens of fruits: study on its modes of action. Postharvest Biology and Technology, 22(1), 7-17. doi:10.1016/S0925-5214(00)00186-1.
- Castro, O. & Poveda, L.J. (1983). *Piper auritum* (H.B.K.) familia Piperaceae. Estudio preliminar del aceite esencial de sus hojas. Ingeniería y Ciencia Química 7, 24-25.

- Celis, A., Mendoza, C., Pachón, M., Cardona, J., Delgado, W., Cuca, L. (2008). Extractos Vegetales Utilizados como Biocontroladores con Énfasis en la Familia Piperaceae. Una Revisión. *Agronomía Colombiana*. 26 (1): 97-106.
- Chatterjee, A. & Pakrashi, S. (1994). *The Treatise on Indian Medicinal Plants* 3:76.
- Chatterton, S. & Punja, Z.K. (2009). Chitinase and  $\beta$ -1,3- glucanase enzyme production by the mycoparasite *Clonostachys rosea* f. *catenulata* against fungal plant pathogens. *Canadian Journal of Microbiology* 55: 356- 367.
- Chen, Z., Silva, H., Klessig, D.F. (1993). Active oxygen species in the induction of plant systemic acquired resistance by salicylic acid. *Science* 262: 1883-1886.
- Cherkupally, R., Kota, S.R., Amballa, H., Reddy, B.N. (2017). *In vitro* antifungal potential of plant extracts against *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina*. *Annals of Plant Sciences*, 6(9), 1676-1680.
- Chopra, R.N., Nayer, S.L., Chopra, I.C. (1956). *Glossary of Indian Medicinal Plants*, CSIR, New Delhi.
- Clark, M.M. (2006). Biological control methods for damping-off of tomato seedlings caused by *Pythium myriotylum*. Tesis de maestría, Universidad de Tennessee, Knoxville, USA.
- Collinge, D.B., Borch, J., Madriz-Ordeñana, K., Newman, M.A. (2001). The responses of plants to pathogens. In Hawkesford, MJ; Buchner, P. *Molecular analysis of plant adaptation to the environment*. Dordrecht, Holanda, Kluwer Academic Publishers.
- Coté, F., & Hanh, M.G. (1994). Oligosaccharins: Structures and signal transduction. *Plant Molecular Biology* Vol. 26, pp. 1379-1411.

- Cotes, A.M., Thonart, P., Lepoivre, P. (1994). Relationship Between the Protective Activities of Several Strains of *Trichoderma* against damping-off Agents and their Ability to Produce Hydrolitic Enzymes Activities in Soil or in Synthetic Media. Mededelingen van de Faculteit Landbouwkundige en Toegepaste Biologische Wetenschappen. 59; 931-941.
- Cruz, M. (2004). El árbol de nim establecimiento y aprovechamiento en la huasteca potosina.
- Cuervo, D.C., Martínez, S.T., Ardila, H.D., Higuera, B.L. (2009). Inducción diferencial de la enzima peroxidasa y su relación con lignificación en los mecanismos de defensa del clavel (*Dianthus caryophyllus* L.) durante su interacción con *Fusarium oxysporum* f.sp. *Dianthi*. Revista Colombiana de Química, 38(3), 379-393.
- Culebro-Ricaldi, J.M., Ruiz-Valdiviezo, V.M., Rodríguez-Mendiola, M.A., Ávila-Miranda, M.E., Miceli, F.G., Cruz-Rodríguez, R.I., Montes-Molina, J.A. (2017). Antifungal properties of *Beauveria bassiana* strains against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in tomato crop. Journal of Environmental Biology, 38(5), 821.
- Dai, J., Yaylayan, V.A, Raghavan, G.S.V, Pare, J.R., Liu, Z. (2001). Calibración multivariada para la determinación de limonoides totales relacionados con azadiractina y terpenoides simples en extractos de neem utilizando el ensayo de vainillina. Journal of Agricultural and Food Chemistry., 49: 1169-1174.
- Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., Van Breusegem, F. (2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. Cell and Molecular Life Sciences 57:779-795.

- De Ascensao, A.R.F.D.C. & Dubery, I.A. (2003). Soluble and wall-bound phenolics and phenolic polymers in *Musa acuminata* roots exposed to elicitors from *Fusarium oxysporum* f.sp. *cubense*. *Phytochemistry*. 63, 679-686.
- de Albuquerque Gil, D.M. (2011). Biosensor evaluation of the Antioxidant activity of wines and teas. Interference studies and comparison with other methods, Universidad de Lisboa (Portugal).
- de González, Y.A., Peña, M., Ágreda, J.P., Diaz, M. (2003). Intoxicación por la administración de tabletas de *Thevetia peruviana* como tratamiento para bajar de peso: presentación de un caso. *Revista de Toxicología*, 20(3), 221-223.
- De Sain, M. & Rep, M. (2015). The Role of Pathogen-Secreted Proteins in Fungal Vascular Wilt Diseases. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (10), 23970–23993 doi: 10.3390/ijms161023970.
- Delgado, A.W. & Cuca S.E. (2007). Composición química del aceite esencial de *Piper hispidum*. *Revista de Productos Naturales*, 1(1):5-8.
- Diego, S. (2011). Evaluación del rendimiento en la obtención del aceite “*Piper auritum* Kunth” mediante la hidrodestilación asistida por microondas (pp. 12-15). Tesis de licenciatura no publicada, Universidad Veracruzana, Veracruz, México.
- Dixon, R. 2001. Natural products and plant disease resistance. *Nature*. 411, 843 – 847.
- Ducrot, P.H. (2005). Organic chemistry’s contribution to the understanding of biopesticida activity of natural products from higher plants. pp. 47–58. En: Regnault, R.C., B.J.J. Philogene y C. Vincent (eds.). *Biopesticides of plant origin*. Lavoiser and Intercept, Ltd., Paris and Andover. 313 p.

- Dunkel, F.V., Serugendo, A., Breene, W.M., Sriharan, S. (1995). Influence of insecticidal plant materials used during storage on sensory attributes and instrumental hardness of dry edible beans (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant foods for human nutrition*, 48(1), 1-16.
- Ebel, J. (1998). Oligoglucoside elicitor-mediated activation of plant defense. *Bioessays* 20: 569-576.
- El Ghaout, A., Arul, J., Grenier, J., Benhamou, N., Asselin, A., Bélanger, R. (1994). Effect of chitosan on cucumber plants: Suppression of *Pythium aphanidermatum* and induction of defense reactions. *Phytopathology* 84: 313-320.
- Fasio, J.A.C., Rodríguez, T.D.J.M., Estrada, R.S.G., Ortega, J.E.C., Zequera, I.M., Barajas, A.J.S. (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 123-127.
- Fernández-Herrera, E., Martínez, R.I.R., Rodríguez, O.G., Olvera, L.G., Dávila, M.E.R., Moctezuma, E.V., Zavaleta-Mejía, E. (2012). Genes de defensa, actividad enzimática y contenido de capsidiol en chile CM-334 inoculado con *Phytophthora capsici*. *Interciencia*, 37(5), 370-376.
- Ferreres, F., Pereira, D.M., Valentão, P., Andrade, P.B., Seabra, R.M., Sottomayor, M. (2008). New phenolic compounds and antioxidant potential of *Catharanthus roseus*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 56:9967– 9974.
- Fesel, P.H. & Zuccaro A. (2016).  $\beta$ -glucan: Crucial component of the fungal cell wall and elusive MAMP in plants. *Fungal Genetics and Biology* 90. Pp 53–60 doi: 10.1016/j.fgb.2015.12.004.

- Firenzuoli, F. & Gori, L. (2007). Flavonoid composition of citrus juices molecules. Massina, Italia. Dipartimento di chimica orgánica e biología, Universita di Messina, Salita Sperone. Pp 1641-1673.
- Flórez, M.; López, J.; Valencia, A. (2005). Actividad de  $\alpha$ -amilasas del hongo entomopatógeno *Beauveria bassiana* cultivado en medio líquido. Revista Colombiana de Entomología 31 (2):123 – 126.
- Franco C.K.G., Rodríguez, N.S., Cervantes, M.J.F., Barranco, F.J.E. (2011). Enzimas y toxinas de hongos entomopatógenos, su aplicación potencial como insecticidas y fungicidas. Sociedades rurales, producción y medio ambiente año 2011 vol.11 núm 22. Pp 143-160. Recuperado de: <https://publicaciones.xoc.uam.mx/Recurso.php>.
- Gálvez, G.M. (2015). Producción de Tomate Saladette (*Lycopersicon escolentum Mill.*) con soluciones nutritivas orgánicas en invernadero. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Unidad Laguna. División Agronomía. Tesis licenciatura. Torreón, Coahuila, México. Pp. 2 .
- Garcés, E., Orozco, A.M., Bautista, H., Valencia, G. R. (2001). *Fusarium oxysporum* el hongo que nos falta conocer. Departamento de Biología, Facultad de Ciencias. Universidad Nacional de Colombia. Acta Biológica Colombiana. Vol. 6 (1):7-25.
- Gillespie, A.T. & Claydon, N.C. (1989). The use of entomogenous fungi for pest control and the role of toxins in pathogenesis. Pesticides Science 27: 203-215.
- Girish, K. & Shankara Bhat, S. (2008). Neem- A Green Treasure Electronic Journal of Biology, 2008, 4(3):102-111.

- Gohel, V., Singh, A., Vimal, M., Ashwini, P., Chhatptar, H.S. (2006). Bioprospecting and antifungal potential of chitinolytic microorganisms. *African Journal of Biotechnology*. 5: 54-72.
- Goldman, G.H., Hayes, C., Harman, G.E. (1994). Molecular and cellular biology of biocontrol by *Trichoderma* spp. *Biotechnology Tibtech* 12: 478-482.
- González, B.M.L., Fortis H.M., Preciado R.P., Segura C.M.A., Salazar S.E., Gracia H.J.L., Esparza R.J.R. (2016). Calidad fitoquímica de tomate Saladette producido con sustratos orgánicos bajo condiciones de invernadero. *Phyton (Buenos aires)*, 85(I), 71-78. ISSN 1851-5657.
- González, I., Arias, Y., Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium Oxysporum* f.sp. *Lycopersici*-TOMATE. *Rev. Protección Vegetal* 27 (I): 1-7.
- González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González N., Miranda I. (2011). Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. Promisorios como agentes de control biológico. ii. expresión de actividad glucanasa. *Rev. Protección Vegetal*. Vol. 26 No. 1 (2011): 23-29.
- González, I., Infante, D., Peteira, B., Martínez, B., Arias, Y., González, N., Miranda, I. (2010). Caracterización bioquímica de aislamientos de *Trichoderma* spp. promisorios como agentes de control biológico. I. expresión de actividad quitinasa. *Revista Protección Vegetal [online]* 25(1): 58-63.
- Gould, K.S. & Lister, C. (2006). Capítulo 8: Flavonoids functions in plant. En: *Flavonoids: chemistry, biochemistry and applications*. Editado por Andersen, Ø.M., Markham, KR. Taylor and Francis Group, p. 398.

- Govindachari, T.R., Suresh, G., Gopalakrishnan, G., Banumathy, B., Masilamani, S. (1998). Identification of antifungal compounds from the seed oil of *Azadirachta indica*. *Phytoparasitica*. 26(2): 109-116.
- Grainge, M. & Ahmed, S. (1988). Handbook of plant with pest-control properties. John Wiley and sons, Nueva York. 470 p.
- Granados-Sánchez, D., Ruíz-Puga P., Barrera-Escorcía, H. (2008). Ecología de la herbivoría. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales y del Ambiente* 14(1): 51-63.
- Green, A.T, Healy, M.G, Healy, A. (2005). Production of chitinolytic enzymes by *Serratia marcescens* QMB1466 using various Chitinous substrates. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology* 80: 28–34.
- Griffin, M.R. (2007). *Beauveria bassiana*, a cotton endophyte with biocontrol activity against seedling disease. Tesis de Ph.D., Universidad de Tennessee, Knoxville, USA.
- Gutiérrez, R.I., Moreno, S.N., Montoya, D. (2015). Mecanismos de regulación de la hidrólisis enzimática de celulosa en hongos filamentosos: casos clásicos y nuevos modelos. *Rev. Iberoam Micol* 32:(1) Pp 1-12 doi: 0.1016/j.riam.2013.10.009.
- Hammerschmidt, R., Nuckles, E., Kuc, J. (1982). Association of enhanced peroxidase activity with induced systemic resistance of cucumber to *Colletotrichum lagenarium*. *Physiology and Plant Pathology* 20, 73–82.
- Hanaa, R.F., Abdou, Z.A., Salama, D.A., Ibrahim, M.A., Srour, H.A.M. (2011). Effect of neem and willow aqueous extracts on *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. *Annals of Agricultural Sciences*, 56(1), 1-7.

- Heath, M.C. (2000a). Nonhost resistance and nonspecific plant defenses. *Current Opinion in Plant Biology* 3:315-319.
- Hernández-Velázquez, V., Padilla, A.B., Domínguez, J.P., González, E.G. (1996). Aislamiento de hongos patógenos de plagas de suelo en Jalisco y Nayarit, pp: 5-7. In: Memoria del XIX Congreso Nacional de Control Biológico, Culiacán, Sin. p. 202.
- Higuera, B.L., Martínez, S., Caicedo, O. (2009). Inducción de actividad peroxidasa y de fenoles totales como respuesta del fruto de lulo (*Solanum quitoense* L.) al patógeno causal de la antracnosis. *Revista Colombiana de Química*, 38(1), 25-42.
- Hochman, H. (1966). Mechanism of rodenticidal activity of *Gliricidia sepium*. Abstract. Defense Technical Information Center (DTIC). National Technical Information Service. AD0631002.
- Hoyos, J. (1992). Árboles Tropicales Ornamentales Cultivados en Venezuela. Monografía N° 38. Sociedad de Ciencias Naturales La Salle. Caracas, Venezuela. 272 pp.
- Howell, C.R. (2003). Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. *Plant Disease* 87, 4-10.
- Idris, H.A., Labuschagne, N., Korsten, L. (2007). Screening rhizobacteria for biological control of *Fusarium* root and crown rot of sorghum in Ethiopia. *Biological control*, 40(1), 97-106.
- Infante, D., Martínez, B., González, N., Reyes, Y. (2009). Mecanismos de acción de *Trichoderma* frente a hongos Fitopatógenos. *Revista de Protección Vegetal*. Vol. 24 No. 1 (2009): 14-21.

- Islam, M.T., Castle, S.J., Ren, S. (2010). Compatibility of the insect pathogenic fungus *Beauveria bassiana* with neem against sweetpotato whitefly, *Bemisia tabaci*, on eggplant. *Entomologia Experimentalis et Applicata*, 134(1), 28-34.
- Jaramillo, J., Rodríguez, V.P., Guzmán, M., Zapata, M., Rengifo, T. (2007). Manual Técnico: Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Tomate Bajo Condiciones Protegidas. ISBN 978-92-5-305833-4.
- Jarvis, A.P. & Morgan, E.D. (2000). Análisis de pequeñas muestras de limonoides de neem (*Azadirachta indica*) utilizando extracción en fase sólida del cultivo de tejidos. *Photochemistry. Anal.*, 11: 184-189.
- Jensen, D.F. & Wolffhechel, H. (1995). Biological Control: Benefits and Risks. (Series: Plant and microbial biotechnology research. En: M.T.H., Heikki y J.M. Lynch (Eds.). The use of fungi, particularly *Trichoderma* spp. and *Gliocladium* spp., to control root rot and dampingoff diseases. Cambridge: Cambridge University Press. pp. 177-189.
- Jetiyanon, K. (2007). Defensive-related enzyme response in plants treated with a mixture of *Bacillus* strains (IN937a and IN937b) against different pathogens. *Biological Control* 42: 178-185.
- Joji, L. & Beena, J. (2010). Chemical composition and antibacterial activity of the volatile oil from the bark of *Gliricidia sepium*. *Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*. 2: 177-179.
- Jovanovic, L. (2005). New synthetic approaches to 8, 5'-neolignans, PhD thesis, Universität Potsdam, Germany.

- Kaniampady, M., Muhammed, M., Jirovetz L., Mohamed, P. (2007). Essential composition of *Gliricidia sepium* (Leguminosae) leaves and flowers. Indian Journal of Chemistry. 46B: 1359-1360.
- Karthik, N., Akanksha, K., Binod, P., Pandey, A. (2014). Production, purification and properties of fungal chitinases a review. Indian Journal of Experimental Biology. Vol 54. Pp 1025-1035.
- Kim, D.O., Chun, O.K., Kim, Y.J., Moon, H.Y., Lee, C.Y. (2003). Quantification of polyphenolics and their antioxidant capacity in fresh plums. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 51(22), 6509-6515.
- Kobayashi, Y. Reedy, R., Bick, J., Oudemans, P. (2002). Characterization of a chitinase gene from *Stenotrophomonas maltophilia* strain 34S1 and its involvement in biological control. Applied and Environmental Microbiology 68: 1047-1054.
- Krylov, S.N. & Dunford, H.B. (1996). Reaction of horseradish peroxidase with indole-3-acetic acid. Plant Peroxidases. Biochemistry and Physiology, Univ. Agriculture, Vienna & Univ. Geneva: Geneva - Vienna, 59.
- Lam-Gutiérrez, A. (2011). Efecto antimicótico de aceites esenciales y extracto metanólicos de plantas de uso tradicional (pp. 1-26). Tesis de maestría, Instituto Tecnológico de Tuxtla Gutiérrez, Chiapas, México.
- Lartey, R.T. & Caesar, A.J. (2004). Emerging Concepts in Plant Health Management. Research Signpost. Trivandrum, India. 298 pp.
- Leckie, B.M., Ownley, B.H., Pereira, R.M., Klingeman, W.E., Jones, C.J., Gwinn, K.D. (2008). Mycelia and spent fermentation broth of *Beauveria bassiana* incorporated into synthetic diets affect mortality, growth and development of larval

*Helicoverpa zea* (Lepidoptera: Noctuidae). *Biocontrol Science and Technology* 18: 697-710.

- Leos, M.J. & Salazar R.P. (2002). The insecticide Neem tree *Azadirachta indica* A. Juss in México. Universidad Autónoma de Nuevo León. Agronomy Faculty. Tech. Brochure 3. Marín, N.L. México.
- Leslie, J.F., Summerell, B.A., Bullock, S. (2006). *The Fusarium Laboratory Manual*. Wiley-Blackwel. 388 pp.
- Levine, A., Tenhhaaken, R., Dixon, R., Lamb, C. (1994). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. *Cell* 79:583- 593.
- Loaiza, J. & Rivera, G. (2000). Potencial biocida de extractos de *Gliricidia sepium*, contra organismos fitopatógenos del cultivo de la papaya (*Carica papaya*). *Agron. Costarric.* 24: 29-36.
- López, P.Y., Angulo, E.M., Martínez, R.C., Soto, B.J., Chaidez, Q.C. (2007). Efecto antimicrobiano de extractos crudos de Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22. *Bioquímica* 32 (4): 117-125.
- Luhová, L., Lebeda, A., Kutrová, E., Hedererová, D., Pec, P. (2006). Peroxidase, catalase, amine oxidase, and acid phosphatase activities in *Pisum sativum* during infection with *Fusarium oxysporum* and *F. solani*. *Biologia Plantarum.* 50 (4): 675-682.
- Lyer, SR., Williamson, D. (1991). Efficacy of some plant extracts to inhibit the protease activity of Trichophyton species. *Geobios.* 18: 3-6.

- Madriz Ordeñaña, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) No. 63 p . 22 - 32
- Maneemegalai, S. & Naveen, T. (2010). Evaluation of antibacterial activity of flower extracts of *Cassia auriculata* L. Ethnobotanical Leaflets 14:182-92.
- Manners, G., Jurd, L. (1979). Additional flavanoids in *Gliricidia sepium*. Phytochemistry 18: 1037-1042.
- Marcano, D. & Hasegawa, M. (2002). Fitoquímica orgánica. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico, Universidad Central de Venezuela, Caracas, Venezuela, pp. 588.
- Marcello, C.M., Steindorff, A.S., da Silva, S.P., do Nascimento-Silva, R., Bataus, L.A.M., Ulhoa, C.J. (2010). Expression analysis of the exo- $\beta$ -1, 3-glucanase from the mycoparasitic fungus *Trichoderma asperellum*. Microbiological Research 165: 75-81.
- Martín de la Guardia, A., Morera, G., Talce, A., Marrero Terrero, A.A., Milián Hernández, V., Campañá Castellanos, H., Iglesias Rodríguez, G. (2003). Obtención de un extracto plaguicida de *Gliricidia sepium* (Jaq.) Steud bajo la irradiación con microondas. Revista Cubana de Plantas Medicinales, 8(3), 0-0.
- Martínez-Valverde, I. Periago, M.J., Ros, G. (2000). Significado nutricional de los Compuestos fenólicos de la dieta.50(1):5-18.
- Martino, V. (2000). Los flavonoides como promisorios agentes preventivos y terapéuticos. Acta Farmacéutica Bonaerense, 19(4), 303-308.
- Matthieu H.A., Joosten J., Pierre J.G. (1989). Identification of several pathogenesis-related proteins in tomato leaves inoculated with *Cladosporium fulvum* (syn. *Fulvia fulva*) as 1,3 b-glucanases and chitinases. Plant physiology. 89:945-951.

- Mendoza, C., Moreno, M., Elango, W. (2007). Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora palmivora* Bult. y *Collectotrichum gloeosporioides* (Penz.). *Tierra Tropical*. 3 (1): 81 – 89.
- Mendoza, L, Yáñez, K, Vivanco, M, Melo R., Cotoras M. (2013). Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products* 43:360-364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.048>.
- Merfort I., Heilmann J., Weiss M., Pitti P., Gadana C. (1996). Radical scavenger activity of three flavonoids metabolites studied by inhibition of chemiluminescence in human PMNS. *Planta Medica*. 62, 289.
- Min, K. & Ebeler, S.E. (2008). Flavonoid effects on DNA oxidation at low concentrations relevant to physiological levels. *Food and Chemical Toxicology* 46, 96-104.
- Moller, I.M., Jensen P.E., Hansson, A. (2007). Oxidative modifications to cellular components in plants. *Annual Review of Plant Biology*. 58: 459-481.
- Montes, B.R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29, 73-82.
- Montes-Molina, J.A., Nuricumbo-Zarate I.H., Hernández-Díaz J., Gutiérrez-Miceli F.A, Dendooven L., Ruíz-Valdiviezo V.M. (2014). Characteristics of tomato plants treated with leaf extracts of neem (*Azadirachta indica* A. Juss. (L.)) and mata-raton (*Gliricidia sepium* (Jacquin)): A greenhouse experiment. *Journal of Environmental Biology*. 35, 935-942.
- Montoliu, A. (2010). Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico: Aspectos comunes y específicos. Tesis en opción al

grado de Doctor en Ingeniería Agrónoma. Castellón de la Plana, España:Universitat Jaume.

- Montoya, E.W.J., Nolasco, C.O.P., Acuña, P.R.K., Gutiérrez A.I.F. (2016). Expresión de  $\beta$ -1,3-Glucanasas de *Beauveria bassiana* en cultivo con extracto de los fitopatógenos *Peronospora variabilis* y *Fusarium oxysporum*. *Scientia Agropecuaria* 7 (3): 253 – 257 doi: 10.17268/sci.agropecu.2016.03.13.
- Moslem, M.A. & El-Kholie, E. M. (2009). Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds and leaves extract on some plant pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(14), 1045.
- Mysore, K.S., Ryu, C.M. (2004). Nonhost resistance: how much do we know?. *Trends Plant Science*. 9: 97-104.
- Nascimento, N.C. & Fett-Neto, A.G. (2010). Metabolismo secundario de la planta y desafíos para modificar su funcionamiento: una visión general. *Métodos en biología molecular*, 1-13. doi: 10.1007 / 978-1-60761-723-5\_1.
- Nathan, S.S., K. Kalaivani y K. Murugan, (2005). Efectos de los limonoides de neem en el vector de la malaria *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). *Acta Trop.*, 96: 47-55.
- Natarajan, V., Pushkala, S., Karuppiyah, V.P., Prasad, P.V. (2002). Anti dermatophytic activity of *Azadirachta indica* (neem) by *in vitro* study. *Indian Journal of Pathology and Microbiology*. 45(3): 311-3.
- Natarajan, V., Venugopal, P.V., Menon, T. (2003). Effect of *Azadirachta indica* (neem) on the growth pattern of dermatophytes. *Indian Journal of Medical Microbiology*. 21(2): 98-101.

- Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., & Vázquez-Montoya, E.L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3), 17-29.
- Navickiene, H.M.D., Morandim, A.D.A., Alécio, A.C., Regasini, L.O., Bergamo, D.C. B., Telascrea, M., Marques, M.O. (2006). Composition and antifungal activity of essential oils from *Piper aduncum*, *Piper arboreum* and *Piper tuberculatum*. *Química Nova*, 29(3), 467-470.
- Nelson, N. (1944). A photometric adaptation of the Somogyi method for determination of glucose. *Journal of Biological Chemistry* 153: 375-380.
- Nicholson, R.L. & Hammerschmidt, R. (1992). Phenolic compounds and their role in disease resistance. *Annual review of phytopathology*. 30, 369-389.
- Nirmaladevi, D., Srivastava M., Uppalapati, S.R., Gupta, V.K., Yli-Mattila, T., Chandra, N.S. (2006). Molecular phylogeny, pathogenicity and toxigenicity of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Lycopersici*. VL 6, DO - 10.1038/srep21367, JO - Scientific Reports, ER.
- Oku, H. (1994). *Plant Pathogenesis and Disease Control*. Ed. CRC Press. Florida.
- Oliveira, L.H.W., Ehringhausm, Ch., Yoshio, P.K. (2004). Genetic diversity of *Pimenta longa* genotypes (*Piper* spp., *Piperaceae*) of the Embrapa Acre germplasm collection. *Genetics and Molecular Biology*. 27(1):74-82.
- Olivero-Verbel, J., Gueette-Fernandez, J., Stashenko, E. (2009). Acute toxicity against *Artemia franciscana* of essential oils isolated from plants of the genus *Lippia* and *Piper* collected in Colombia. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromaticas*, 8(5), 419-427.

- Ortiz, J.J. & Argaiz, D.V. (2006). Plantas tóxicas de interés veterinario: Casos clínicos. Elsevier. Barcelona, España. 179 pp.
- Osorio, E., Flores, M., Hernández, D., Ventura, J., Rodríguez, R., Aguilar, C. (2010). Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*. 31(1):153-157.
- Ownley, B.H., Pereira, R.M., Klingeman, W.E., Quigley, N.B., Leckie, B.M. (2004). *Beauveria bassiana*, a dual purpose biocontrol organism, with activity against insect pest and plant pathogens (Eds.: R.T. Lartey and A.J. Caesar). *Emerging Concepts in Plant Health Management*. Research Signpost, Kerala, India, pp. 256–269.
- Ownley, B.H., Griffin, M.R., Klingeman, W.E., Gwinn, K.D., Moulton, J.K., Pereira, R.M. (2008). *Beauveria bassiana*: Endophytic colonization and plant disease control. *Journal of invertebrate pathology* 98: 267-270.
- Ownley, B.H., Gwinn, K.D., Vega, F.E. (2010). Endophytic fungal entomopathogens with activity against plant pathogens: ecology and evolution. *BioControl* 55: 113-128.
- Pal, K.K. & McSpadden, G.B. (2006). Biological Control of Plant Pathogens. *The Plant Health Instructor* 1117-02.
- Pedroso, A.T.R., Arrebato, M.A.R., Baños, S.B., Triana, A.C., González, D.R. (2012). Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(1), 91-96.
- Pérez, E., Rodríguez, Y., Hernández, M.D.L.A., Blanca, M. (2004). Dinámica de inducción de algunos sistemas de defensa en la interacción HMA-tomate

(*Lycopersicon esculentum* Mill.) var. Amalia. II. Inducción y expresión de peroxidasas y polifenoloxidasas en raíces de tomate. Cultivos Tropicales, 25(2), 45-52.

- Pérez, L.M., Gajardo, A., Silva, P. (2001b). Expression of chitinases and -1,3-glucanases in tomato seedlings inoculated with *Fusarium solani* and/or bioantagonists. Abstracts MPMI Symposium, Madison, Wisconsin, USA.
- Peteira, B., Gonzáles, I., Arias, Y., Fernández, A., Miranda, I., Martínez, B. (2011). Caracterización bioquímica de seis aislamientos de *Beauveria bassiana* (BALSAMO) Vuillemin. Revista de Protección Vegetal 26(1): 16 – 22.
- Pavarini, D.P., Pavarini, S.P., Niehues, M., Lopes, N.P. (2012). Exogenous influences on plant secondary metabolite levels. Animal Feed Science and Technology, 176 (1-4), 5-16.
- Pavela, R., Kazda, J., Herda, G. (2009). Effectiveness of neem (*Azadirachta indica*) insecticides against Brassica pod midge (*Dasineura brassicae* Winn). Journal of Pest Science 82: 235-240.
- Pomar, F. (2000). Caracterización de la actividad peroxidasa implicada en los procesos de lignificación y su estudio en la interacción: *Capsicum annuum* L. var *annuum*-*Verticillium dahliae* Kleb.
- Pontón, J. (2008). La pared celular de los hongos y el mecanismo de acción de la anidulafungina. Revista Iberoamericana de Micología. 25:78-82.
- Puentes, L.N.D. (2009). Interacciones moleculares entre plantas y microorganismos: saponinas como defensas químicas de las plantas y su tolerancia a los microorganismos. Una revisión. RET. Revista de estudios transdisciplinarios, 1(2), 32-55.

- Quesada, M.E., Lopez, D.C, Landa, B.B. (2014). The Hidden Habit of the Entomopathogenic Fungus *Beauveria bassiana*: First Demonstration of Vertical Plant Transmission. PLoS ONE 9(2): e89278 doi:10.1371/journal.pone.0089278.
- Rajeswari, P. (2015). *In vitro* inhibition of Pectinolytic enzymes of *Fusarium oxysporum* by *Trichoderma* spp. and *Pseudomonas fluorescens* on *Arachis hypogaea* L. International Journal of Current Microbiology Applied Science 4: 604-613.
- Ramaiah, A. K. & Garampalli, R.K.H. (2015). *In vitro* antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici*. Asian Journal of Plant Science and Research, 5(1), 22-27.
- Ravikumar, P.H., Makari, H.K., Gurumurthy, H. (2007). *In vitro* Antimicrobial Activity of Ethanol Extract of *Thevetia peruviana*», Electronic Journal of Environmental, Agricultural and food Chemistry 6 (9): 2318-2322, España.
- Reissing, J.L., Strominger, J.L., Letair, L.L. (1955). A modified colorimetric method for the stimulation of N-acetyl amino sugar. Journal of Biological Chemistry 217: 959-966.
- Resende, M.L.V., Salgado, S.M., Chaves, Z.M. (2003). Espécies ativas de oxigênio na resposta de defesa de plantas a patógenos. Fitopatologia Brasileira, 28(2), 123-130.
- Robinson, P.M. & Garret, M.K. (1969). Identification of volatile sporostatic factors from cultures of *Fusarium oxysporum*. Transactions of the British Mycological Society 52: 293-299.
- Robinson, P.M. & Park, D. (1966). Volatile inhibitors of spore germination produced by fungi. Transactions of the British Mycological Society 49: 639-649.

- Rodríguez, A.T., Morales, D., Ramírez, M.A. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos. Cultivos tropicales, 21(2), 79-82.
- Rodríguez, A., Villasana, R., Fernandez, J., Sanchez, P., Perez, D. (1994). Efecto alelopático del extracto de hojas de piñón florido (*Gliricidia sepium* Jacq. Steud.). Resúmenes. VII Jornada Científica. INIFAT. La Habana, Cuba. 59 p.
- Rodríguez, E.J., Saucedo-Hernández, Y., Vander-Heyden Y., Simó-Alfonso, E.F., Ramis-Ramos, G., Lerma-García, M.J. (2013). Chemical analysis and antioxidant activity of the essential oils of three Piperaceae species growing in the central region of Cuba. Natural product communications. 8(9):1325-8.
- Rose, J.K., Kyung-Sik H., Darvill, A., Albersheim, P. (2002). Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: Coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. The Plant Cell, Vol. 14 pp. 1329-1345.
- Sablón, M. (2006). Dendrología. Biblioteca Facultad de Montaña de Guantánamo. Intranet.MES. 115 p.
- Sánchez, E., García, S., Heredia, N. (2010). Extracts of edible and medicinal plants damage membranes of *Vibrio cholera*. Applied and Environmental Microbiology 76 (20): 6888-6894.
- Sánchez, G.R., Mercado, E.C., Peña, E.B., de la Cruz, H.R., Pineda, E.G. (2013). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. Revista de la DES Ciencias Biológico Agropecuarias. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, 12, 90-95
- Santiago, R., De Armas, R., Legaz, M.E., Vicente, C. (2009). Changes in phenolic acids content, phenylalanine ammonia-lyase and peroxidase activities in sugarcane

leaves induced by elicitors isolated from *Xanthomonas albilineans*. Australas. Plant Path. 38 (4):357-365.

- Scalbert, A., Manach, C., Morand, C. (2005). Dietary polyphenols and the prevention of diseases, Critical Reviews in Food Science and Nutrition, Vol. 45, 297-306.
- Scandalios J.G. & Guan L.M. (2001). Factores de transcripción que regulan la expresión de genes antioxidantes en respuesta a señales bióticas y abióticas. En: Familias de genes: estudios de ADN, ARN, enzimas y proteínas. World Scientific, Singapur, 287-301.
- Scott, I.M, Jensen, H.R., Philogene, B.J., Arnason, J.T. (2008). A review of *Piper* spp. (*Piperaceae*) phytochemistry, insecticidal activity and mode of action. Phytochem Reviews. 7(1):65-75.
- Seidl, V. (2008). Chitinases of filamentous fungi: a large group of diverse proteins with multiple physiological functions. Fungal Biology Research 22: 36-42.
- Seigler, D.S. (2003). Phytochemistry of *Acacia*-sensu lato. Biochemical systematics and ecology. 31: 845-873.
- Sepúlveda, G., Porta-Ducoing H., Rocha-Sosa M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. Revista Mexicana de Fitopatología 21(3): 355- 363.
- Sgarbi, E., Fornasiero, R.B., Lins, A.P., Bonatti, P.M. (2003). Phenol metabolism is differentially affected by ozone in two cell lines from grape (*Vitis vinifera* L.) leaf, Plant Science. 165 pp. 951–957.

- Shanmugan, V. & Kanoujia, N. (2011). Biological management of vascular wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* by plant growth promoting rhizobacterial mixture. *Biological Control* 57: 85-93.
- Sharma, N. & Trivedi, P.C. (2002). Screening of leaf extracts of some plants for their nematocidal and fungicidal properties against *Meloidogyne incognita* and *Fusarium oxysporum*. *Asian Journal of Experimental Sciences*. 16(1&2), 21-28.
- Sharma, V, Walia, S., Kumar, J., Nair, M.J., Parmar, B.S. (2003). An efficient method for the purification and characterization of nematocidal azadirachtins A, B, and H, using MPLC and ESIMS. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(14), 3966-3972.
- Shivanna, M. & Mallikarjunaswamy, G. (2009). Fungal diseases and their effect on phytochemical constituents of medicinally important *Terminalia* species in Bhadra Wildlife Sanctuary, Karnataka, India. *J. Indian Phytopathology*. 62(1):37-43.
- Shixiang, X., Fujie, Y., Zhendan, N., Qianru, Ch., Hui, Z., Xiaodong, Z., (2013). *In vitro* and *in vivo* control of *Alternaria alternata* in cherri tomato by essential oil from *Laurus nobilis* of Chinese Origin. *Journal of the Science of Food and Agriculture*. Vol. 94 (7):1403–1408.
- Singh, D.S., Son Y.S., Lee, C.H. (2016). Perplexing Metabolomes in Fungal-Insect Trophic Interactions: A Terra Incognita of Mycobiocontrol Mechanisms. *Frontiers in Microbiology*. 7 (1678): 1-13 doi: 10.3389/fmicb.2016.01678.
- Skerman, P., Cameron, D., Riveros, F. (1988). Tropical Forage Legumes. FAO Plant Production and Protection Series N° 2. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Roma. Italia. 431 pp.

- Smith, R.J., Pekar, S., Gula, E. (1981). Requirement for sequential enzymatic activities for penetration of the integument of entomopathogenic hyphomycetes. *Journal of Invertebrate Pathology* 38: 335-344.
- Sofo, A., Scopa, A., Nuzzaci, M, Vitti, A. (2015). Ascorbate peroxidase and catalase activities and their genetic regulation in plants subjected to drought and salinity stresses. *International Journal of Molecular Sciences*. 16 (6):13561- 13578.
- Solecka, D. & Kacperska, A. (2003). Phenylpropanoid deficiency affects the course of plant acclimation to cold, *Physiologia Plantarum* 119 pp. 253–262.
- Solórzano, E., Meneses, A.R., Rodríguez, Y., Pérez, E., Fernández, A., Peteira, B., León O. (2001). Inducción de cinco sistemas enzimáticos en la simbiosis tomate-micorriza arbuscular (MA). *Revista Protección Vegetal* Vol. 16 No. 1. Pp 30-39.
- Somogyi, M. (1952). Notes on sugar determination. *Journal of Biological Chemistry* 195: 19-23.
- Stevens, W.D., Ulloa, C., Pool, A., Montiel, O.M. (2001). *Flora de Nicaragua* (Vol. 85, No. 1, p. 943). St. Louis: Missouri Botanical Garden Press.
- Tewtrakul, S., Nakamura, N., Hattori, M., Fujiwara, T. Supavita, T. (2002). Flavanona y glucósidos de flavonol de las hojas de *Thevetia peruviana* y sus actividades inhibitoras de la transcriptasa inversa del VIH-1 y de la integrasa del VIH-1. *Boletín Químico y Farmacéutico* , 50 (5), 630-635.
- Thordal-Christensen, H. (2003). Fresh insights into processes of nonhost resistance, *Current opinion in plant biology*. 6: 351-357.

- Tian, S., Wan, Y., Qin, G., Xu, Y. (2005). Induction of defense responses against *Alternaria rot* by different elicitors in harvested pear fruit. *Applied Microbial and Cell Physiology*. 18: 115 – 119.
- Tiwari, V., Singh, R., Pandey, A. K. (2017). Efficacy of some antagonistic fungi and botanicals against *Fusarium solani* causing damping-off disease in eggplant (*Solanum melongena* L.). *Journal of Applied Biosciences*. 43(1), 47-56.
- Tokunaga, T., Miyahara, K., Tabata, K., Esaka, M. (2005). Generation and properties of ascorbic acid-overproducing transgenic tobacco cells expressing sense RNA for Lgalactono-1,4-lactone dehydrogenase. *Planta*. 220:854-863.
- Torrealba, S. & Rodríguez, D. (2006). Cuantificación de metabolitos secundarios en extractos etanólicos de *Gliricidia sepium* (Jacq.) Steud y *Calotropis procera* (Ait.) Ait. F. y su efecto sobre el desarrollo *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*. F. y el efecto de dichas plantas sobre el desarrollo *in vitro* de *Sclerotium rolfsii*. Trabajo de conclusión de curso, Agronomía, Universidad Centroccidental “Lisandro Alvarado”, Barquisimeto, Venezuela.
- Torres, N. (2003). Actualización sobre intoxicación con *Thevetia peruviana*, Retel, *Revista de Toxicología en Línea*, [http://www.sertox.com.ar/img/item\\_full/19001.pdf](http://www.sertox.com.ar/img/item_full/19001.pdf) Argentina, pp. 2-19.
- Tournaire, C., Croux, S., Maurette, M.T., Beck, I., Hocquaux, M., Braun, A.M., Oliveros, E. (1993). Actividad antioxidante de los flavonoides: eficiencia del enfriamiento de oxígeno singlete ( $1\Delta g$ ). *Revista de Fotoquímica y Fotobiología B: Biología* , 19 (3), 205-215.
- Turlier, M.F., Epavier, A., Alabouvette, C. (1994). Early dynamic interactions between *Fusarium oxysporum* f.sp. lini and the roots of *Linus usitatissimum* as

revealed by transgenic GUS-marked hyphae. Canadian Journal of Botanical 72: 1605-1612.

- Usharani, S., Sujaritha, A., John, C.D. (2008). Effect of PGPR on *Fusarium oxysporum* f.sp. *lycopersici* infection through elicitation of defense enzymes. Annals of Plant Protection Sciences. 16(2). ISSN: 0971-3573.
- Valencia, G.M.F., Quevedo, H.B., Franco, C.M., Diez, O.H., Parra, G.C.M. Rodriguez, B.M.X. (2011). Evaluación de actividades enzimáticas de *Fusarium* spp., aislados de lesiones en humanos, animales y plantas. Universitas Scientiarum, 2011, Vol. 16 N° 2: 147-159.
- Valentines, M., Vilaplana, R., Torres, R., Usall, J., Larrigaudiere, C. (2005). Specific roles of enzymatic browning and lignification in apple disease resistance. Postharvest Biology and Technology. 36: 227 – 234.
- Valladares, G., Defago, M.T., Palacios, S., Carpinella M.C. (1997). Laboratory evaluation of *Melia azedarach* (Meliaceae) extracts against the elm leaf beetle (Coleoptera: Chrysomelidae). Journal of Economic Entomology. 90(3): 747- 750.
- Van Camp, W., Van Montagu, M., Inzé, D. (1998). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y NO: Redox signals in disease resistance. Trends in Plant Science, 3, 330-334.
- Van Loon, L.C., Rep M., Pieterse, C.M.J. (2006). Significance of inducible defense-related proteins in infected plants. Annual Review of Phytopathology. 44:135-162.
- Vega, F.E., Goettel, M.S., Blackwell, M., Chandler, D., Jackson, M.A., Keller, S., Roy, H.E. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. Fungal Ecology 2: 149–159.
- Vincent, F. & Wegst, G. (2004). Design and mechanical properties of insect cuticle. Arthropod Structure and Development 33: 187-199.

- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H.A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J.M., Martínez-Escudero, E. (2015). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194-205.
- Vivanco, J.M., Cosio, E., Loyola-Vargas, V.M., Flores, H.E. (2005). Mecanismos químicos de defensa en las plantas. *Investigación y ciencia*, 341 (2), 68-75.
- Vlot, A.C., Dempsey, D.A., Klessig, D.F. (2009). Salicylic acid, a multifaceted hormone to combat disease. *Annual Review of Phytopathology*. 47: 177-206.
- Wang, Q. & Xu, L. (2012). Beauvericin, a bioactive compound produced by fungi: a short review. *Molecules* 17: 2367–2377.
- Wisniewski, M., Biles, C., Droby, S., McLaughlin, R., Wilson, C., Chalutz, E. (1991). Mode of action of the postharvest biocontrol yeast, *Pichia guilliermondii*. I. Characterization of attachment to *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 39(4), 245- 258. doi:10.1016/0885-5765(91)90033-E.
- Woo, S.L., Scala, F., Ruocco, M., Lorito, M. (2006). The molecular biology of the interactions between *Trichoderma* spp., phytopathogenic fungi and plants. *Phytopathology* 96: 181–185.
- Wu, C.F., Yang, J.Y., Wang, F., Wang, X. (2013). Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. *Chinese Journal of Natural Medicines* 11:1-15. [http:// dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60001-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60001-1).
- Yang, C.A., Cheng, C.H., Lo, C.T., Liu, S.Y., Lee, J.W., Peng, K.C. (2011). A novel L-amino acid oxidase from *Trichoderma harzianum* ETS 323 associated with antagonism of *Rhizoctonia solani*. *Journal of agricultural and food chemistry*. 59:4519-26.

- Zabala, M.A., Angarita, M., Restrepo, J.M., Caicedo, L.A., Perea, M. (2010). Elicitation with methyl-jasmonate stimulates peruvoside production in cell suspension cultures of *Thevetia peruviana*. *In vitro cellular & developmental biology-plant*. Vol. 46 (3): 233-238.
- Zhou, B.L., Yao, T., Zhang, J., YE, X.L. (2009). Effects of flavonoids of *Sophora flavescens* to *Fusarium* Wilt and Resistance Physiology of Cucumber [J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 6, 018.