



Dirección de Investigación

Subdirección de Programación y Evaluación



Proyecto de Investigación 2018

Unidad:	3612	División:	Agronomía	Departamento:	Horticultura
Programa de Investigación:	Hortalizas				
Línea de investigación:	Biocontrol de patógenos del Suelo				
Título del proyecto:	Biocontrol de <i>Fusarium sp</i> en el suelo con crucíferas				
Presupuesto solicitado (Máximo \$100,000)	\$	El proyecto es:	Nuevo	Continuación	X
Tipo de investigación:	Básica	Aplicada	X	Tecnológica	e-mail del responsable
Vinculación:	Si	X	No	Fondos concurrentes:	alberto.sandoval@uaaan.mx
Cooperante(s):	Rancho Poca Luz 1 y salvador Guajardo				
Entidad (es):	San Luis Potosí y Coahuila		Municipio (s):	Catorce y Parras de la Fuente	
Localidades:	Ranchos san Cristóbal y El Pájaro en SLP, y Santa Inés en Paila Coahuila				
A realizar durante el año(s):	2018				
Participantes		Adscripción (Clave Depto.)	Expediente No.	Firma	
Responsable	Dr. Alberto Sandoval Rangel	Horticultura	3177		
Colaborador:	Dr. Adalberto Benavides Mendoza	Horticultura	3303		
Colaborador:	Dr. Marcelino Cabrera de la Fuente	Horticultura	3864		
Colaborador:	Dra. Susana González Morales	Cátedras Conacyt	100062		
Colaborador:	Dr. Valentín Robledo Torres	Horticultura	3031		
Colaborador:	Dr. Armando Robledo Olivo	Alimentos	4048		
Colaborador:					
		Nivel estudios	Matrícula	Firma	
Tesista:	Berta Felisa Civieta Bermejo	Doctorado	71171492		
Programa Docente:	Doctorado en agricultura protegida				
Tesista:	María Monserrat Basurto Hernández	Licenciatura	41141568		
Programa Docente:	Ingeniero Agrónomo en Horticultura				
Tesista:	Yaiza Guadalupe Cuvas Limón	Licenciatura	41141821		
Programa Docente:	Ingeniero Agrónomo en Horticultura				
Vo. Bo. "ANTONIO NARRO"			Autoriza		
Firma y sello					
Nombre	Dr. Víctor Manuel Reyes Salas Jefe de Departamento		Dr. Armando Robledo Olivo Subdirector de Programación y Evaluación		

• Cada Jefe de Departamento deberá dejar copia para su archivo

Protocolo para Proyecto de Investigación 2017

1.-Título del proyecto

Biocontrol de *Fusarium sp* en el suelo con crucíferas

2.- Introducción

El biocontrol en cultivos, es sistema ecológicamente eficaz para reducir plagas, enfermedades y malezas (Stefanova et al, 1999). La eficiencia del biocontrol de patógenos en el suelo, se basa en la reducción de las poblaciones de microorganismos fitopatógenos y el aumento de las poblaciones de microorganismos no nocivos para el cultivo (Papavizas G.C. 1985, Ling et al, 2010). Por otra parte, el aumento o decremento de las poblaciones está en función de la disponibilidad de alimento y las condiciones ambientales. Adicional a la resistencia natural que presenta una planta con una nutrición adecuada. Con base en estos principios en el año 2012, se estableció el presente proyecto con el propósito de controlar *Fusarium sp*, en el cultivo de tomate, cultivado en suelo y bajo una malla o casa sombra de seis has., en el rancho San Cristóbal Municipio de Catorce, SLP. El sistema consiste en cuatro acciones o mecanismos. Primero, la rotación con el cultivo de repollo en los meses de noviembre a marzo. Segunda, la biofumigación, que ocurre al incorporar al suelo los residuos del repollo. Tercera, incremento de competencia espacial, mediante el uso de la materia orgánica residual del repollo y la adición exógena de microorganismos saprofitos o facultativos, como *Thichoderma harzianum*, *Glioclaium virens*, *Bacillus subtilis* entre otros y cuarta, la mejora en la nutrición de la planta, inducidos por los compuestos y iones derivados de la descomposición de la materia orgánica.

Con este sistema de biocontrol, durante los cinco ciclos de cultivo realizados del 2012 al 2016, no ha habido necesidad de aplicar Metam, que es el fumigante de uso más generalizado en la región para control de *Fusarium*, además se observado una reducción en la incidencia y severidad del patógeno.

Sin embargo para plantear este sistema como un desarrollo tecnológico, es necesario documentar la síntesis de tiocianatos o productos biofumigantes, la identificación y adaptación de cepas de organismos saprofitos o facultativos a este sistema y la contribución de la adición de los residuos de crucíferas en la nutrición de los cultivos.

Por lo anterior este proyecto plantea para el 2017, los siguientes objetivos:

Objetivos

Cuantificar la producción de tiocianatos y el efecto sobre la dinámica de los iones en la solución del suelo, en relación a la cantidad de residuos de repollo incorporado.

Hipótesis

La producción de tiocianatos y la dinámica de los iones del suelo estarán en función de la cantidad de residuos de repollo incorporados.

3.-Revisión de Literatura

Biocontrol

El biocontrol o control biológico es un método de control de plagas, enfermedades y malezas que consiste en utilizar organismos vivos con objeto de controlar las poblaciones de otro organismo (Wikipedia, 2016). En fitopatología se ha definido como la integración de mecanismos o métodos, que incluyen rotación de cultivos, alteraciones del pH del suelo, uso de enmiendas orgánicas, adición exógena de microorganismos (Baker, 1985; Bellows y Fisher, 1999). El concepto de control biológico hay que diferenciarlo del control natural, que es el control que sucede en las poblaciones de organismos sin intervención del hombre y que incluye además de enemigos naturales la acción de los

factores abióticos del medio. Por ello hay que entender el control biológico como un método artificial de control que presenta limitaciones especialmente en cuanto al conocimiento de los organismos afectados, lo que trae consigo una serie de ventajas e inconvenientes en su aplicación, sobre todo si se relaciona con los métodos químicos de control. Entre los inconvenientes más importantes se encuentran:

1. Normalmente su aplicación requiere un planteamiento y manejo más complejo, mayor seguimiento de la aplicación, y es menos rápido y drástico que el control químico.
2. El éxito de su aplicación requiere mayores conocimientos de la biología de los organismos implicados (tanto del agente causante del daño como de sus enemigos naturales).
3. La mayoría de los enemigos naturales suelen actuar sobre una o unas pocas especies, es decir son altamente selectivos. Esto puede resultar una ventaja (como se comentará a continuación) pero en ocasiones supone una desventaja al incrementar la complejidad y los costos derivados de la necesidad de utilizar distintos programas de control.

A pesar de ello, también presenta una serie de ventajas que hace que este tipo de control se convierta en uno de los más importantes para la protección fitosanitaria. Entre ellas se pueden destacar:

1. Poco o ningún efecto nocivo colateral de los enemigos naturales hacia otros organismos, incluso el hombre.
2. La adquisición de resistencia al control biológico es muy rara.
3. El control es relativamente a largo término, con frecuencia permanente.
4. El tratamiento con insecticidas es eliminado por completo o de manera sustancial.
5. La relación costo/beneficio es muy favorable.
6. Evita plagas secundarias.
7. No existen problemas de intoxicaciones.
8. Se le puede usar dentro del Manejo integrado de plagas (MIP). (Barrera, 1990)

La agricultura Protegida y el biocontrol de patógenos del Suelo con Crucíferas

La agricultura protegida es aquella que se realiza bajo métodos de producción que ayudan a ejercer determinado grado de control sobre los diversos factores del medio ambiente. Permitiendo con ello minimizar las restricciones que las malas condiciones climáticas ocasionan en los cultivos. La agricultura protegida, términos prácticos se concibe como la agricultura que se realiza bajo cubierta: mallas o casa sombra, cubiertas de polietileno comúnmente conocido como cubiertas de plástico e invernaderos. En el país existen alrededor de 20 mil hectáreas bajo agricultura protegida de las cuales aproximadamente 12 mil son de invernadero y las otras 8 mil corresponden a malla sombra y macro túnel principalmente (SAGARPA, 2012). La tendencia de esta tecnología es al aumento, motivada por la inversión del sector privado y los programas del sector público en particular los programas de la SAGARPA, quien desde el año 2001 ha otorgado diversos apoyos para la Agricultura Protegida y en el 2009, puso en marcha la Estrategia Nacional de Agricultura Protegida.

El 50% de la superficie con agricultura protegida se concentra en cuatro estados: Sinaloa (22%), Baja California (14%), Baja California Sur (12%) y Jalisco (10%). Los principales cultivos que se producen bajo agricultura protegida son el jitomate (70%), pimiento (16%), pepino (10%). En los últimos años se ha intensificado la diversificación de cultivos como la papaya, fresa, chile habanero, flores, plantas aromáticas.

De las 20 mil has para agricultura bajo cubierta, el 75% utiliza el suelo como sustrato y una de las principales limitantes para la producción es estos sistemas son las enfermedades del suelo y en particular *Fusarium sp.* Entre los factores relacionados al desarrollo de *Fusarium* están: el Monocultivo, la fumigación recurrente del suelo con el mismo ingrediente activo, generalmente biocidas, lo mismo ocurre con el uso de fungicidas, la reducción progresiva de la materia orgánica de los suelos, que aunado a la fumigación y los fungicidas reduce la microflora del suelo y finalmente considerar que los factores ambientales de humedad y temperatura que se generan en los ambientes protegidos para favorecer el desarrollo de los cultivos, también favorece el desarrollo de los patógenos.

Las estrategias que se han empleado para el manejo de las enfermedades del suelo son: El uso de resistencia genética, portainjertos, fumigación y solarización, uso de fungicidas y el uso de sustratos o suelo modificado. Estas estrategias han permitido la producción de cultivos bajo cubierta pero el problema persiste y colateralmente han

ocasionado otros problemas como la contaminación ambiental, restricciones en el uso de algunos fungicidas y fumigantes como el bromuro de metilo, PCNB, tiabendazol entre otros. Por lo cual se hace necesaria la búsqueda de opciones que permitan la sostenibilidad de estos sistemas con un enfoque más acorde a la conservación del medio ambiente.

El usos de crucíferas representa una alternativa para el control de *Fusarium* en el suelo y existen diversos estudios que muestran su eficacia (Kirkegaard *et al.* 1993; Matthiesen y Kirkegaard 1993; Angus *et al.* 1994, Campas-Baypoli *et al.*, 2010). El control de *Fusarium* en el suelo por las crucíferas se realiza por tres diferentes mecanismos, en primera instancia permite la rotación de cultivo si es intercalado entre ciclos del cultivo tradicional (Zavaleta-Mejia, 1999), en segundo lugar la incorporación de los residuos del cultivo al descomponerse en el suelo tiene una acción fumigante conocido como biofumigación que se aplica a la emisión de isotiocianatos generados durante los procesos de descomposición de las hojas de las brassicas (Kirkegaard *et al.* 1993; Angus *et al.* 1994) y finalmente la materia orgánica residual representa una fuente de alimento para los microorganismos saprófitos o facultativos que al incrementar sus poblaciones presentan competencia por espacio a los organismos fitopatógenos como *Fusarium* (Hjeljord y Tronsmo, 1998).

Gucosinolatos y Tiocianatos

Los glucosinolatos son aniones orgánicos solubles en agua, que incluyen aproximadamente 120 compuestos, cuya estructura química corresponde a ésteres β -tioglucósidos N-hidroxisulfato o ésteres (Z)-N-hidroximinosulfato o S-glucopiranosil tiohidroximatos. Poseen un átomo de azufre unido a una β -D-glucopiranososa y una cadena lateral sobre el carbono α del grupo imino tal como se observa en la figura 1 (Suzuki, Ohnishi-Kameyama, Sasaki, Murata, & Yoshida, 2006); (Botting, Davidson, Griffiths, Bennett, & Botting, 2002; Fahey, *et al.*, 2001). La cadena lateral los clasifica en glucosinolatos alifáticos, aromáticos e indólicos dependiendo de su precursor biosintético, según sea metionina, fenilalanina o triptófano, respectivamente (Brown & Morra, 1995); (Visentin, Tava, Iori, & Palmieri, 1992); (Li & Kushad, 2004). A la vez determina las diferencias en las propiedades químicas, la actividad biológica y los productos de degradación (Anne Louise Gimsing, Kirkegaard, & Bruun Hansen, 2005). Las cadenas laterales se caracterizan por un amplio rango de estructuras químicas, resumidas en la Tabla 1 (Fahey, *et al.*, 2001; Wade, Garrard, & Fahey, 2007).

Estos metabolitos secundarios, detectados por lo general en todos los órganos, son responsables del sabor picante y aroma sulfuroso de algunas plantas, que se produce como resultado de su rompimiento en isotiocianatos (Li & Kushad, 2004; Trenerry, Caridi, Elkins, Donkor, & Jones, 2006; Visentin, *et al.*, 1992). Se encuentran principalmente en las especies Cruciferae, Brassicaceae (Wade, *et al.*, 2007) y en por lo menos 500 especies de angiospermas dicotiledóneas no crucíferas, algunos ejemplos de estas se encuentran reportados en la Tabla 2 (Fahey, *et al.*, 2001); (Brown & Morra, 1995). Generalmente, cada genotipo contiene un glucosinolato predominante, aunque su contenido varía con el tipo de tejido (raíces, hojas, flores, frutos, etc.) y el estado de desarrollo del mismo, lo cual resulta importante para la taxonomía y genética de estas plantas (Kushad *et al.*, 1999; Mohn, CuTting, Ernst, & Hamburger, 2007; Suzuki, *et al.*, 2006; Visentin, *et al.*, 1992). Adicionalmente, el contenido de glucosinolatos en vegetales frescos se afecta por muchos factores tales como el tipo de suelo, el espaciado entre plantas, la luz, la temperatura y aplicación de fertilizantes.

En general, los glucosinolatos y sus productos de degradación se consideran componentes potenciales en la defensa de las plantas contra los insectos y los herbívoros (Chen & Andreasson, 2001; Halkier & Du, 1997). Por otra parte, se relacionan con la inactivación de enzimas de detoxificación de la fase II, tales como glutatión-S-transferasa, y por inhibición de enzimas de la fase I (enzimas del citocromo P450), las cuales están involucradas en la activación de carcinógenos químicos (Li & Kushad, 2004).

Aunque los glucosinolatos intactos pueden conferir resistencia a insectos herbívoros, hongos, bacterias, moluscos y microorganismos, las propiedades defensivas de éstos aumentan cuando los tejidos son fragmentados, por daño mecánico, infección o ataque de plagas, puesto que el rompimiento celular expone los glucosinolatos y los pone en contacto con la enzima mirosinasa (una β -tioglucosidasa) (Al-Gendy, El-gindi, Hafez, & Ateya, 2010; Botting, *et al.*, 2002; Li & Kushad, 2004). Como resultado de la actividad de esta enzima se liberan glucosa, sulfato y varios compuestos tóxicos, entre los que están isotiocianatos, nitrilos, tiocianatos y oxazolidinas.

4.- Procedimiento Experimental

Producción de tiocianatos y acción fumigante

Para ello se producirá repollo y de las hojas maduras se realizarán las pruebas de cuantificación de tiocianatos o su precursor los Glucosinolatos, mediante HPLC (Śmiechowska, et al., 2010).

Primeramente se realizara la determinación de glocosinolatos y/o tiocianatos invitro en muestras de hoja.

- Picada
- Macerada
- Extracto liquido

Posteriormente se repetirán las pruebas incorporando al suelo las muestras de hoja. Para ello se utilizaran macetas de PE, con capacidad de 10 L.

- Picada incorporada al suelo
- Macerada incorporada al suelo
- Extracto liquido incorporado al suelo

Valoración de la acción fumigante

Esta prueba se realizará con el apoyo del productor cooperante (Rancho Poca Luz 1, en el municipio de Catorce S.L.P).

Para lo cual se estableció el cultivo de repollo en noviembre del 2016 como rotación de cultivo (esta será la tercera rotación en 5 años) el cual se picará con doble paso de rastra e incorporará con arado, en el mes de marzo del 2017. Antes de su incorporación se realizará una cuantificación de la cantidad de repollo a incorporar.

En el mes de abril del 2018 se plantará tomate y después de la plantación se medirá cada semana, la incidencia y severidad de *Fusarium* y se buscará comparar con los resultados de un productor que aplique metam®.

Los concentración de los iones se correlacionara mediante la prueba simple se Sperman con variables de crecimiento, productividad y calidad del cultivo de tomate.

Los datos recabados se analizaran en el modelo completamente al azar (Zar, 1996) y con el programa estadístico Statistica versión 7, para Windows.

Cronograma de Actividades.

Programación del Gasto.

Actividad a realizar	E	F	M	A	M	J	J	A	S	O	N	D
Producción de repollo	X	X										
Prueba de cuantificación de tiocianatos			X	X								
Incorporación de residuos de repollo al suelo			X									
Evaluación de incidencia y severidad de <i>Fusarium</i>				X	X	X	X	X	X			
Evaluación de variables agronómicas				X	X	X	X	X	X			
Análisis de datos y pruebas de correlación						X	X	X	X			
Elaboración de tesis y preparación de 1 articulo y/o review				X	X			X	X	X		

5.-Productos Esperados

2 tesis de licenciatura
1 Review y/o articulo

6.-Literatura Citada

Agrios G.N. 2005. Fitopatología Agrícola. Departamento de fitopatología. Universidad de Massachusetts. 2da edición-México. P689.

Angus, J. F; P. A. Gardner; J. A. Kirkegaard; J. M. Desmarchelier. 1994. Biofumigation: Isothiocyanates released from Brassica roots inhibit growth of the take-all fungus. *Plant and Soil* 162, 107-112. **Baker** C.J., y **Barrera**, J.F., Moore, D., Abraham, Y.J., Murphy, S.T. and Prior, C. 1990. Biological control of the coffee berry

- borer, *Hypothenemus hampei*, in Mexico and possibilities for further action. Brighton Crop Protection Conference.
- Bellows** S. T., and T. W Fisher. 1999. Handbook of Biological Control. Academic Press. San Diego California USA.
- Bello, 2001. Biofumigación y solarización como alternativas al bromuro de metilo. Departamento de Agroecología CCMA, CSIC. Madrid, España.
- Carrasco Jiménez** J, González Martineaux S y Lundstedt Lagos 2008. Tecnología de desinfección de suelos sustrato de hortalizas. Fitosanidad para las hortalizas en la zona sur. Disponible en: <http://www.inia.cl/medios/biblioteca/serieactas/NR34579.pdf>
- Huerta-Hernández** A. 2012. Agricultura Protegida. Disponible en: <http://www.funprover.org/agroentorno/agosto012pdf/agriculturaprotegida.pdf>.
- Hjeljord** L, Tronsmo A. *Trichoderma* and *Gliocladium* in biological control: an overview. In: *Trichoderma & Gliocladium: Enzymes, biological control and commercial applications*. Harman GE, Kubice CP. (Eds). Volumen 2. p.131-151. Taylor & Francis. 1998.
- Infante** D, B. Martínez, Noyma González Y Yusimy Reyes. 2009. Mecanismos de Acción de *Trichoderma* frente a Hongos Fitopatógenos. Rev. Protección Veg. V.24 N.1 La Habana Ene.-Abr. 2009
- Ludwig** H. Pfenning y Lucas Magalhães de Abreu 2008. Hongos del suelo saprófitos y patógenos de plantas. Disponible en: <http://www2.inecc.gob.mx/publicaciones/libros/667/cap8.pdf>
- Fraire Cordero** M.L, D. Nieto Ángel, E. Cárdenas Soriano, G. Gutiérrez Alonso, R. Bujanos Muñiz y H Vaquera Huerta 2010. Efecto de variedades y densidad de plantación en la calidad física del florete de brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*). Rev fitotecmex 33 (2).
- Francescangeli** N., M. A. Sangiacomo and H. R. Martí. 2007. Vegetative and reproductive plasticity of broccoli at three levels of incident photosynthetically active radiation. Spanish Journal of Agricultural Research 5(3): 389-401.
- Gómez Lucila**, E. González, R. Enrique, M.A. Hernández, Mayra G. Rodríguez. 2010. Uso de la biofumigación para el manejo de *Meloidogyne* spp., en la producción protegida de hortalizas. Rev. Protección Veg. 25 (2):119-123.
- Kirkegaard**, J.A.; J.F. Angus; P.A. Gardner; H.P. Cresswell. 1993. Benefits of brassica break crops in the Southeast wheatbelt. Proc. 7th Aust. Agron. Cons. Adelaide, 19-24 Sept., 282-285.
- Lara Viveros** F. M., 2010. Incidencia de Enfermedades, Calidad postcosecha y contenido de glucosinolatos en Brócoli. Tesis Doctor en Ciencias en Recursos Fitogenéticos Fisiología Vegetal. Colegio de Posgraduados. Montecillo Texcoco estado de México.
- Manici**, L. M., Lazzeri, L., & Palmieri, S. (1997). In Vitro Fungitoxic Activity of Some Glucosinolates and Their Enzyme-Derived Products toward Plant Pathogenic Fungi. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 45(7), 2768-2773.
- Matthiesen**, J. N.; J. A. Kirkegaard. 1993. Biofumigation, a new concept for 'clean and green' pest and disease control. Western Australian Potato Grower October, 14-15.
- Ling Ning**, Chao Xue, Qiwei Huang, Xingming Yang, Yangchun Xu, Qirong Shen. 2010. Development of a mode of application of bioorganic fertilizer for improving the biocontrol efficacy to *Fusarium* wilt. BioControl (2010) 55:673–683 DOI 10.1007/s10526-010-9290-1.
- Papavizas** G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*: Biology, ecology and potential for biocontrol. Ann Rev Phytopathol (1985) 55: 23-54.
- Peil** R. M; Gálvez J. 2005. Reparto de materia seca como factor determinante de la producción de las hortalizas de fruto cultivadas en invernadero: Revisión bibliográfica. R. Bras. Agrociencia. 11 (1): 05-11.
- Rodríguez-Núñez** J.R, Jaime López-Cervantes, Dalia I. Sánchez-Machado. 2010. Efectos de hojas de Brassicaceas. Instituto Tecnológico de Sonora, Cd. Obregón, Sonora, México 2010.
- SAGARPA** (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación), 2012. Importancia de la Agricultura Protegida. www.sagarpa.gob.mx.
- Sandoval-Rangel** A. Biofumigación de suelos Agrícolas. XII Simposio Internacional de Producción de Cultivos en Invernaderos. Facultad de Agronomía. Universidad Autónoma de N.L.
- Stavely** J.R.. 1985. Biocontrol of bean rust by *Bacillus subtilis* under field conditions. Plant disease 1985.
- SEMARNAT**, 2013. Plan nacional de eliminación del consumo de bromuro de metilo en México. Disponible en: app1.semarnat.gob.mx:8080/sissao/index.html). Consultado diciembre 2014.
- SIAP** (Servicio de Información AgroAlimentaria y Pesquera) 2013. Producción agrícola 2013. Cierre de la producción por cultivo. www.siap.gob.mx
- Śmiechowska**, A., Bartoszek, A., & Namieśnik, J. (2010). Determination of Glucosinolates and Their Decomposition Products—Indoles and Isothiocyanates in Cruciferous Vegetables. *Critical Reviews in Analytical Chemistry*, 40(3), 202 - 216.
- SPFI** (Secretaría de Patrimonio y Fomento Industrial). 1983. Norma Oficial Mexicana NOM.FF-46-1982. Productos alimenticios no industrializados para uso humano hortalizas en estado fresco brócoli. Diario Oficial de la Federación

DOF:14/01/1983.

Suzuki, C., Ohnishi-Kameyama, M., Sasaki, K., Murata, T., & Yoshida, M. 2006. Behavior of Glucosinolates in Pickling Cruciferous Vegetables. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54(25), 9430-9436.

Wade, K. L., Garrard, I. J., & Fahey, J. W. 2007. Improved hydrophilic interaction chromatography method for the identification and quantification of glucosinolates. *Journal of Chromatography A*, 1154(1-2), 469-472.

Zar J. H., 1996. Biostatistical Analysis. Third ed. Prentice-Hall Inc. New Jersey, USA

Zavaleta-Mejía E. 1999. Alternativas de Manejo de las Enfermedades de las Plantas. *Terra* 17 (3):201-207.