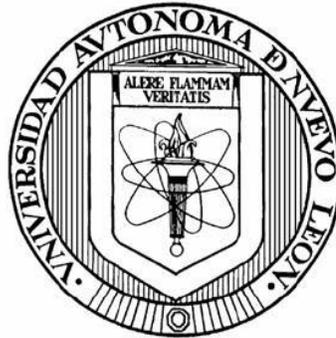


UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



CONTROL DE HONGOS CAUSANTES DEL DAMPING-OFF (ENFERMEDAD DE
ALMÁCIGO) IN VITRO Y EN UN VIVERO FORESTAL POR EXTRACTOS DE
PLANTAS DEL ESTADO DE DURANGO

POR

HOMERO SARMIENTO LÓPEZ

COMO REQUISITO PARCIAL PARA OBTENER EL GRADO DE

DOCTOR EN CIENCIAS CON ACENTUACIÓN EN QUÍMICA DE PRODUCTOS
NATURALES

2024

CONTROL DE HONGOS CAUSANTES DEL DAMPING-OFF (ENFERMEDAD
DEL ALMACIGO), *IN VITRO* Y EN UN VIVERO FORESTAL POR EXTRACTOS
DE PLANTAS DEL ESTADO DE DURANGO.

Comité de Tesis



Dr. Eduardo Sánchez García
Director de Tesis



Dra. Catalina Leos Rivas
Secretario



Dra. Catalina Rivas Morales
Vocal



Dr. Abelardo Chávez Montes
Vocal



Dra. María Julia Verde Star
Vocal



Dra. Katiushka Arevalo Niño
Subdirector de Posgrado

DERECHOS RESERVADOS©

PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

Financiamiento

Este trabajo fue financiado por el Programa de Apoyo a la Investigación Científica y Tecnológica,

PAICYT, UANL CT 706-19

PAICYT, UANL CT 1187-20

DEDICATORIA

A mi madre:
Cecilia López Pérez

A mi padre:
Rubén Sarmiento

A mis hermanos
Rogelio,

Rubén,

Wilbert

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por el otorgamiento de la beca para la realización del presente proyecto doctoral.

A la Universidad Autónoma de Nuevo León, la Facultad de Ciencias Biológicas, su personal administrativo y al Laboratorio de Química analítica, por permitirme cursar mis estudios de posgrado.

Al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), su Centro de Investigación Regional Norte-Centro y al Campo Experimental Valle del Guadiana, por el impulso a la capacitación de su personal científico mediante el acuerdo CORECADE NC18/026.

A mi comité de Tesis por todo su apoyo, asesoría y consejos durante la realización de la investigación.

Al Dr. Eduardo Sánchez García por su paciencia, motivación y todo su apoyo desde que decidí estudiar el posgrado.

Sr. Domingo García por la estima que me tiene, su gran amistad, y sus consejos.

A la Sra. Orelia y su esposo Don Beto, Tomás, Rosy, Juan Nájera, Edgar y Alessandra.

A mis amigos y compañeros de Doctorado, Dr. Óscar Alberto Pérez Narváez y la Dra. Mariana Cuesi por todo su apoyo durante mi estancia en el Laboratorio de Química Analítica, también por paciencia, sus consejos, por su amistad y compartir buenos momentos. Muchas gracias.

Dr. David Alejandro Hernández Marín por su amistad y asesoría durante todo este tiempo.

Dr. Alberto Aguayo Acosta por su guía y apoyo durante mi estancia en Monterrey muchas Gracias.

Al MC. Sergio García González, Dr. David Gilberto García Hernández, Dr. Raymundo Alejandro Pérez Hernández, Dr. Aldo Fabio Bazaldúa Rodríguez, Dr. David Mizaél Ortiz Martínez, Dr. Ezequiel Viveros Valdez, por sus consejos y apoyo durante el doctorado.

Amigos de laboratorio. Muchas gracias por compartir sus anécdotas, buenos momentos y deseos: Mely, Karla, Joel, Michel, Antero, Angy, Santiago, Felipe, Denisse, Mariana, Diego, Héctor, Rafa, Glenda Berenice, Ricardo, Ema, Edgar, Karina, Paulina, Arturo.

Agradecimientos también especialmente para

Lic, Roberto Vladimir Trujillo Ayala, administrador del Vivero Francisco Villa, M.V. Z. José Vidales Trujillo e Ing. Rodrigo Veliz jefes de producción del vivero Francisco Villa, Ing. Francisco Gerardo Ramírez García, técnico responsable de producción del vivero San Nicolás y Vivero Emiliano Zapata, Dr. Raúl Solís Moreno director de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Juárez del Estado de Durango, Ing, Manuel Avendaño Catedrático y encargado del Vivero de la Facultad de Ciencias Forestales, Profr. Rubén Sarmiento productor agrícola del ejido 25 de Diciembre, Sr. Daniel Vargas productor del ejido 25 de Diciembre, Ing. Francisco Camacho Maestro mezcalero de la Vinata Cuero Viejo, Sr. Raúl Ramírez Comisariado ejidal del ejido Primero de Mayo Durango, Dr. Sergio Rosales Mata, Dr. José Leonardo García Rodríguez, Dr. José Ángel Sigala Rodríguez investigadores del INIFAP-Durango, Dr. Juan Bautista Rentería Ánima director de Coordinación y Vinculación del INIFAP-Durango, Sr. Gabino Martínez Lerma apoyo técnico en INIFAP-Durango, Ing. Jesús Soto Rodríguez, Ing, Javier Navar. Al Ing. Javier Uriel Rodríguez Reyes y a la Ing. Samantha Elena Elizalde Hernández, por su apoyo en la parte experimental del vivero.

ÍNDICE

DEDICATORIA	V
AGRADECIMIENTOS	VI
ÍNDICE	VIII
ÍNDICE DE TABLAS	X
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XII
LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS	XIII
RESÚMEN.....	XIV
ABSTRACT.....	XV
INTRODUCCIÓN	1
ANTECEDENTES.....	3
Importancia de los bosques y la reforestación.....	3
Damping-off	5
Uso de extractos de plantas para controlar hongos fitopatógenos.....	10
Descripción de las especies utilizadas en la presente investigación	15
JUSTIFICACIÓN	18
HIPÓTESIS.....	19
OBJETIVOS	20
Objetivo general	20
Objetivos particulares.....	20
MATERIALES Y MÉTODOS	21
Aislamiento del patógeno.....	21
Identificación.....	22
Pruebas de patogenicidad	23
Preparación de inóculo fúngico para pruebas de inhibición.....	24

Recolección de material vegetal.....	24
Obtención de los extractos	25
Tamizaje fitoquímico	25
Pruebas de inhibición preliminar.....	26
Determinación de la concentración mínima inhibitoria y fungicida	26
Separación cromatográfica	27
Bioautografía	27
Evaluación del extracto en vivero	28
Análisis estadístico	31
RESULTADOS.....	32
DISCUSIÓN	51
CONCLUSIONES	58
PERSPECTIVAS	59
BIBLIOGRAFÍA	60
RESUMEN BIOGRÁFICO	73

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Características macroscópicas de los aislamientos de <i>Fusarium</i> obtenidos de plántulas de pino cultivadas en viveros forestales del estado de Durango.	34
Tabla 2. ID asignado a los aislamientos de <i>Fusarium</i> obtenidos de plántulas de pino cultivadas en viveros forestales del estado de Durango.....	35
Tabla 3. Características microscópicas distintivas de los aislamientos obtenidos al crecer en tres medios de cultivo en condiciones de laboratorio.....	36
Tabla 4. Características microscópicas de los microconidios producidos por los aislamientos al crecer en agar SNA.	36
Tabla 5. Características microscópicas de los macroconidios producidos en los esporodoquios al crecer en agar CLA.	36
Tabla 6. Rendimiento de extractos obtenidos por maceración metanólica de diferentes ejemplares botánicos utilizados en esta investigación.	38
Tabla 7. Resultados de actividad en la prueba de inhibición en pozo (mm) en aislamientos de <i>Fusarium</i> obtenidos de <i>Pinus engelmannii</i> y <i>Pinus durangensis</i>	39
Tabla 8. Resultados de actividad en la prueba de inhibición en pozo (mm) en aislamientos de <i>Fusarium</i> obtenidos de <i>Pinus arizonica</i> y <i>Pinus cooperi</i>	39
Tabla 9. Resultados de la prueba de CMI y CMF de los extractos probados contra los aislamientos de <i>Fusarium</i>	40
Tabla 10. Resultados de las pruebas fitoquímicas realizadas sobre los extractos que presentaron inhibición en los aislamientos de <i>Fusarium</i> aislados de plántulas de pino. .	42
Tabla 11. Fracciones obtenidas y su inhibición contra cepas del género <i>Fusarium</i> aisladas de pino.....	43
Tabla 12. Resultados de las pruebas fitoquímicas realizadas a la subfracción activa del extracto que presentó inhibición en el aislamiento de <i>Fusarium</i> aislados de plántulas de pino.....	44

Tabla 13. Porcentaje de germinación de los tratamientos evaluados en la prueba de inhibición en invernadero.....	46
Tabla 14. Índice de germinación de los tratamientos evaluados en la prueba de inhibición en invernadero.....	46
Tabla 15. Velocidad de germinación de los tratamientos evaluados en la prueba de inhibición en invernadero.....	46
Tabla 16. Resultados del porcentaje de daño 180 días después de la siembra.....	47
Tabla 17. Resultados de la prueba de Kaplan-Meier	49
Tabla 18. Resultados de los estimadores con mejor ajuste para los modelos epidemiológicos que provocaron damping-off en pántulas de	50

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ubicación de los viveros donde se extrajeron las plántulas con síntomas de damping-off.....	22
Figura 2. Puntos de colecta de ejemplares botánicos sometidos a extracción	25
Figura 1. Ambiente de producción de los viveros donde se extrajeron las muestras de plántulas de pino.	32
Figura 2. Obtención de muestras de pino para el aislamiento de hongos fitopatógenos .	33
Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos aislados de muestras de pino con síntomas de damping-off.....	37
Figura 4. Prueba preliminar de patogenicidad en laboratorio.	38
Figura 5. Resultado de la prueba de inhibición en pozo de los extractos evaluados.	40
Figura 6. Prueba de CMF y CMI en placas de microdilución de 96 pozos.	41
Figura 7. Resultados de CMF del extracto de hoja de <i>Xanthium strumarium</i>	41
Figura 8. Proceso de cromatografía en columna y cromatografía en capa fina (TLC)....	43
Figura 9. Zona de inhibición en la prueba de bioautografía de la fracción activa sobre FPe1.	44
Figura 10. Experimento en vivero. Izquierda: Unidades experimentales, Derecha: Plántula de <i>Pinus engelmannii</i> con daño de damping-off.....	48
Figura 11. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de los aislamientos que provocaron daño significativo por damping-off en plántulas de pino.....	49

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

Símbolos

Abreviatura

ha-hectárea

PDA- Agar papa dextrosa

WA- Agar agua 2%

SNA - Agar de Spezieller Nährstoff-farmer

SDA-Agar dextrosa sabouraud

UFC-Unidades formadoras de colonias

CMI-Concentración mínima inhibitoria

CMF-Concentración mínima fungicida

TLC-Cromatografía en capa fina

MeOH-Metanol

RESÚMEN

La enfermedad llamada damping-off la causan un complejo de hongos fitopatógenos que provocan pudriciones y marchitamiento a nivel del cuello de la planta y se presenta en la mayoría en los viveros que producen plantas en contenedor. El objetivo de presente estudio fue evaluar el efecto que tienen extractos de plantas silvestres: *Agave durangensis* Gentry, *Dodonaea viscosa* (L) Jacq, y *Xanthium strumarium* L. en el control de hongos causantes del damping-off en viveros forestales de Durango. Para lograr el objetivo antes mencionado se realizó el aislamiento del patógeno al homogenizar plántulas de pino de 1.5 meses de edad con síntomas de enfermedad, se realizaron resiembras consecutivas hasta obtener cultivos axénicos. De los aislados obtenidos se obtuvieron siete aislamientos del género *Fusarium* los cuales mediante identificación macro y microscópica en medios de cultivo PDA, SNA y CLA, presentaron similitudes al complejo *F. fujikuroi* y *F. oxysporum* y sobre estos aislados se realizaron las pruebas de inhibición. Las plantas para la obtención de los extractos fueron sometidas a maceración en metanol. Para determinar de forma preliminar las propiedades antifúngicas de los extractos, se aplicó la técnica de difusión en pozo, el extracto de hoja y tallo de *Xanthium strumarium* a una concentración de 200 mg mL⁻¹, presentaron una inhibición de 11 mm a 24.5 mm. Se determinó la concentración mínima inhibitoria CMI y la concentración mínima fungicida CMF de los extractos con actividad inhibitoria mediante el protocolo M-38 A, con modificaciones y para la hoja de *X. strumarium*, la CMI obtenida fue de 14 mg mL⁻¹ a 25 mg mL⁻¹, la CMF fue de 15 mg mL⁻¹ a 30 mg mL⁻¹. Se realizó la semipurificación del extracto de hoja de *X. strumarium* mediante técnicas cromatográficas y se utilizó la técnica de bioautografía para obtener la subfracción activa que fue sometida a pruebas fitoquímicas cualitativas y resultó positivo a cumarinas, sesquiterpenlactonas y quinona. Posteriormente se realizaron los ensayos en invernadero para determinar la efectividad del extracto de hoja de *X. strumarium*, la patogenicidad y la dinámica de la enfermedad encontrando diferencias. Los hongos aislados obtenidos de *Pinus engelmannii* y *P. durangensis* presentaron mayor virulencia y su ajuste al modelo Gompertz, los aislados obtenidos de *P. arizonica* presentaron el ajuste al modelo monomolecular.

ABSTRACT

phytopathogenic fungi that cause rot and wilting at the neck of the plant and occur mostly in nurseries that produce container plants. The objective of this study was to evaluate the effect of wild plant extracts: *Agave durangensis* Gentry, *Dodonaea viscosa* (L) Jacq, and *Xanthium strumarium* L. on the control of fungi that cause damping-off in forest nurseries in Durango. The pathogen was isolated by homogenizing 1.5-month-old pine seedlings with disease symptoms; consecutive replanting was carried out until axenic cultures were obtained. From the isolates, seven isolates of the *Fusarium* genus were obtained, which, through macro and microscopic identification in PDA, SNA, and CLA culture media, presented similarities to the *F. fujikuroi* and *F. oxysporum* complex, and inhibition tests were carried out on these isolates. The plants to obtain the extracts were subjected to maceration in methanol. To preliminarily determine the antifungal properties of the extracts, the well diffusion technique was applied, and the leaf and stem extract of *Xanthium strumarium* at a concentration of 200 mg mL⁻¹, presented an inhibition of 11 mm to 24.5 mm. The minimum inhibitory concentration MIC and the minimum fungicidal concentration CMF of the extracts with inhibitory activity were determined using the M-38 A protocol, with modifications, and for the leaf of *X. strumarium*, the MIC obtained was 14 mg mL⁻¹ at 25 mg mL⁻¹, the CMF was from 15 mg mL⁻¹ to 30 mg mL⁻¹. Semi purification of the *X. strumarium* leaf extract was carried out using chromatographic techniques, and the bioautography technique was used to obtain the active subfraction that was subjected to qualitative phytochemical tests and was positive for coumarins, sesquiterpenelactones, and quinone. Subsequently, greenhouse trials were carried out to determine the effectiveness of the *X. strumarium* leaf extract, the pathogenicity, and the dynamics of the disease, finding differences. The fungal isolates obtained from *Pinus engelmannii* and *P. durangensis* presented greater virulence and fit to the Gompertz model, the isolates obtained from *P. arizonica* showed fit to the monomolecular model.

INTRODUCCIÓN

En el estado de Durango se producen cada año cerca de 8 millones de plantas de pino para los programas de conservación y restauración forestal, con lo cual, anualmente se reforestan cerca de 7,700 hectáreas de bosque con densidades aproximadas de 1,100 a 1,200 plantas por hectárea (SNIF 2011). Estas plantas deben cumplir con ciertas características para que puedan desarrollarse en campo (Prieto *et al.* 2009), de tal modo que una planta se puede considerar de calidad si cumple ciertos atributos morfológicos que se encuentran enlistados en la Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016 (Secretaría de Economía, 2016). Con respecto a esto, uno de los indicadores más importantes de calidad en la producción de las plantas es la sanidad, que indica que la planta debe de estar libre de plagas y enfermedades (CONAFOR 2010a).

El complejo *damping-off*, llamado también mal del semillero, marchitamiento fúngico, secadera de la planta, mal del talluelo, ahogamiento, chupadera y pudrición de raíces, representa el mayor problema fitosanitario en los viveros que producen plantas a gran escala (García-Díaz *et al.* 2017), ya que en tan solo un periodo relativamente corto de tiempo, puede progresar y afectar el 100% de la producción (Kacprzak *et al.* 2001). Esta enfermedad, se presenta frecuentemente en semillas y plántulas de muchas especies forestales y de otros cultivos, y es causada por un complejo de microorganismos el cual incluye oomicetos y hongos filamentosos que ven favorecido su desarrollo por condiciones de alta humedad y temperaturas de entre 30 °C y 35 °C (Fajardo-Mejía *et al.* 2016). Estos patógenos invaden las raíces terminales de plántulas y al penetrar la epidermis de la raíz, se desarrollan intercelularmente, degradan los constituyentes de la pared celular y continúan afectando el contenido interno, causando pudrición/marchitamiento y finalmente la muerte del hospedero. En vista de la naturaleza altamente devastadora de éstos patógenos, es esencial un manejo eficaz de la enfermedad para obtener plántulas de pino sanas, cumpliendo con la NMX-AA-170-SCFI-2016 para una implementación exitosa de los programas de restauración y reforestación (Dar *et al.* 2011)

Algunos fungicidas químicos se han utilizado para controlar estas enfermedades (control

químico), pero el abuso en su empleo ha favorecido el desarrollo de patógenos resistentes a dichos fungicidas (Benítez *et al.* 2004), además ha tenido efecto negativo en la salud pública y en el medio ambiente, así como también ha ocasionado la pérdida de biodiversidad, y la contaminación del suelo y agua. Por otro lado, la Unión Europea (UE) ha establecido una serie de restricciones dentro de las cuales han promovido métodos alternativos para el control de problemas fitosanitarios (González-Coloma *et al.* 2007).

El descubrimiento y aplicación de moléculas bioactivas provenientes de productos naturales como las plantas, es una alternativa viable que ayudará a subsanar los problemas causados por el uso indiscriminado de plaguicidas químico/sintéticos, además puede propiciar el desarrollo de actividades sostenibles y económicas (Raskin *et al.* 2002)

Considerando lo anterior, el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto de plantas silvestres del estado de Durango sobre control de hongos causantes de damping off en la producción de planta forestal *in vitro* y en etapa de vivero, como una alternativa “verde” para el control de esta enfermedad.

ANTECEDENTES

Importancia de los bosques y la reforestación

Los bosques son importantes por su capacidad para mitigar el cambio climático, capturar carbono, absorción de agua, provisión de alimentos, evitan la erosión, y proveen sustento para la vida del ser humano y para sus actividades (Caride 2019). En México, muchas personas dependen de los bosques para obtener sus ingresos (Torres-Rojo et al. 2016).

La superficie forestal nacional es de 141 millones de hectáreas (ha), de las cuales 30 millones de *ha* corresponden a bosque (INEGI 2018). Durango es una importante reserva forestal a nivel nacional, ya que el 42.2% de la superficie estatal corresponde a bosque, es decir un aproximado de 5.3 millones de *ha* (INEGI 2017). En el 2017, su producción maderable fue de 2,559,297 m³ rollo, con un valor de \$3,076,568,098 de los cuales, 2,230,053 m³ rollo, fueron de obtenidos de pino con un valor de \$2,844,736,327, de tal manera que es el principal género maderable aprovechado; por esto, el estado de Durango es el principal productor de madera a nivel nacional lo que lo convierte en un estado de vocación preferentemente forestal (SEMARNAT 2020). En éste país, existen aproximadamente 42 % del total de especies de pino, y esto lo convierte en un centro secundario en lo que respecta a la diversidad de este género, además resalta su importancia como proveedor de recursos como madera para aserrar, pulpa para obtener papel y cartón, postes, construcción de muebles, además de bienes y servicios, así como el mantenimiento de la biodiversidad que proporcionan en conjunto los bosques de pino y pino-encino (Sánchez-González 2008).

La deforestación es el resultado del aumento de la superficie agrícola, la extracción poco controlada de madera con diferentes fines, construcción de infraestructura, y actividades realizadas por grupos delictivos relacionados al narcotráfico, cultivo de drogas y control de los terrenos forestales de manera ilegal (España-Boquera and Champo-Jiménez 2016). La reducción de la superficie forestal tiene un impacto marcado sobre la biodiversidad, deterioro del suelo, resiliencia y sobre la modificación del intercambio de energía entre suelo y atmosfera (González Hernández et al. 2015).

La deforestación a nivel nacional , en promedio comprende una tasa mayor a 0.5% por año (Masera et al. 1997), y en el Estado de Durango en el año 2011, se reportaron 282,485 *ha* de bosque con problemas de deterioro o fragmentación (Valles Gándara et al. 2011).

A partir de la segunda década del siglo XX, el ser humano ha reconocido la importancia del recurso a nivel mundial, de tal forma que ha modificado su visión al respecto y con ello, la inversión del dinero público y privado en la silvicultura (MacDicken 2015). Conservar los recursos que proveen los bosques es trascendental, ya que la vida del ser humano depende de ellos y el principal desafío es su preservación (Haro-Martínez and Taddei-Bringas 2014).

Para el año 2018, el promedio de la superficie reforestada con fines de restauración en México, fue aproximadamente de 48,435.67 hectáreas (ha), lo que implicó una producción de 143,768,769 plantas (CONAFOR 2019a, b). En el estado de Durango, para ese año, se produjeron 8,291,544 plantas y se reforestaron 4,680.80 ha que representa el 9.6 % de la superficie reforestada y el 11 % de la planta producida en el país por lo que fue el estado con mayor cantidad de planta producida y superficie reforestada (CONAFOR 2019a, b). Cuando se requiere planta con los atributos necesarios para lograr su establecimiento en campo, es necesario proteger la calidad genética y fisiológica durante su producción en el vivero (Wightman and Cruz 2003).. En México existen cientos de viveros forestales con la finalidad de suministrar plantas para los programas de reforestación (Robles Villanueva et al. 2017).

Resultados de una encuesta llevada a cabo durante el ciclo de producción 2013-2014, mencionan que la capacidad de producción instalada en el Estado de Durango, fue para producir 23 millones de plántulas, y la especie que se produjo en mayor proporción fue *Pinus engelmanni*, y en menor proporción *P. cembroides*, *P. cooperi*, *P. arizonica*, *P. durangensis* y *P. greggii*, el sustrato utilizado fue mayoritariamente turba de esfagno o peat moss, y los envases utilizados de poliestireno expandido de 77 cavidades, tubete removible de 98 cavidades y plástico rígido de 54 cavidades con un volumen mayor a 160 mL por cavidad (Sigala-Rodríguez et al. 2015).

Las plantas para reforestación, deben cumplir con ciertas características para que puedan desarrollarse en campo (Prieto-Ruíz et al. 2009), de tal modo que una planta se puede

considerar de calidad si cumple ciertos atributos morfológicos que se encuentran enlistados en la Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016 (SE 2016). Con respecto a esto, uno de los indicadores más importantes de calidad en la producción de las plantas es la sanidad, que indica que la planta debe de estar libre de plagas y enfermedades (CONAFOR 2010b).

Damping-off

Una planta sana, es aquella que exhibe la mejor condición morfológica y fisiológica durante su crecimiento, y esto puede alterarse por la acción de un factor denominado estrés que genera un cambio irreversible sobre el crecimiento normal de una planta sana, organismos como hongos, virus, bacterias, insectos, animales y malezas, producen estrés al causar deferentes enfermedades trayendo como consecuencia más notable la disminución del vigor, ya que se establece una competencia por recursos como los nutrimentos, luz y agua (Landis et al. 1989). Es por esto, que se vuelve necesario realizar un diagnóstico preciso del problema para corregirlo, ya que se corre el riesgo de pérdidas de recursos por la implementación de procedimientos de control inadecuado (Fajardo et al. 2019).

El vocablo patógeno se refiere a aquellos organismos que producen enfermedades y para determinar con exactitud cuál es el causante del problema, es necesario recuperarlo del tejido dañado, y reproducirlo en un medio de cultivo artificial para su identificación, ya que enfermedades producidas por hongos producen síntomas parecidos (Landis et al. 1989).

El damping-off es una enfermedad que puede aparecer en etapas tempranas del desarrollo de las plántulas y puede atacar la semilla en proceso de germinación, cuando aún no ha emergido de la testa, ya que el contenido de la semilla es atacado, cuando la radícula ha emergido, pero plántula aun no emerge del sustrato; esta etapa es conocida como preemergente; también puede atacar a la plántula cuando ya emergió y aún su tallo no ha lignificado, al presentar la infección en el tallo, la planta se dobla a nivel del cuello donde emerge del sustrato a esta etapa se le conoce como posemergente (Landis et al. 1989, Prieto-Ruíz et al. 2009, Toral Ibáñez et al. 2000). El ataque a los cotiledones es también un problema que aparece en la etapa de “cerillo” cuando la testa de la semilla aún se

encuentra adherida a la plántula y los hongos que se encuentran en esta se propagan al resto de la planta (Cibrián T.D. et al. 2008, Landis et al. 1989).

Estos organismos, de forma natural y en el ambiente del ecosistema forestal, no producen la enfermedad pero al confinarse a ambientes controlados como es el caso de los viveros, tienen la capacidad de provocar daños en las plantas cultivadas (Landis et al. 1989). Los patógenos que producen la enfermedad, invaden las raíces terminales de plántulas, y al penetrar en la pared celular de la epidermis de la raíz, se desarrollan intercelularmente, degradan los constituyentes de la pared celular y continúan afectando el contenido celular, causando pudrición/marchitamiento y finalmente la muerte del hospedero, y en vista de la naturaleza altamente devastadora de éstos patógenos, es esencial un manejo eficaz de la enfermedad para obtener plántulas de pino sanas, para la implementación exitosa de programas de restauración y reforestación (Dar et al. 2011).

A la enfermedad se le llama de varias maneras en varios países, como por ejemplo en Puerto Rico le conocen como sancocho, en Italia moria dei semenzali, en Francia fonte des semis (quemazon de las siembras), en México mal de almácigos, mal de viveros, marchitamiento, tristeza o estrangulamiento del tallo, en Estados Unidos de América damping-off por eso en muchos lugares de México se identifica con ese nombre (García-Rodríguez et al. 2012). También le mencionan como ahogamiento, baloneo, secadera y marchitamiento de plántulas (González-Acuña et al. 2014), mal del talluelo o caída de brote (Toral Ibáñez et al. 2000).

Esta enfermedad se presenta tanto en climas tropicales como en los templados (González-Acuña et al. 2014) y es común en semillas y plántulas de especies forestales y cultivos (Cibrián TD. et al. 2007, Dumroese and James 2005) en los que la alta humedad en el sustrato estimula su crecimiento.

Las fuentes primarias de inóculo son las semillas, los sustratos, contenedores que se reutilizan, la maleza y en el agua de riego, los cuales pueden diseminar a los hongos después de iniciar una infección y las condiciones propicias para el desarrollo de la enfermedad son los sustratos con poca capacidad de aireación, alta humedad, niveles de nitrógeno excedidos, pH elevado, y los contenedores de reuso sin desinfectar, además es importante señalar que la enfermedad prospera en temperaturas comprendidas entre 25 y

35 °C (Toral Ibáñez et al. 2000), y en tan solo un periodo relativamente corto de tiempo, puede progresar y afectar el 100% de la producción (Kacprzak et al. 2001).

En estudios realizados en México, específicamente en viveros que producen plántulas para reforestación en bosques de la Sierra Madre Occidental, se ha documentado la prevalencia de la enfermedad, reportándose en el 2009, que en el Estado de Durango el 100% de los viveros estudiados presentaron la enfermedad, por otro lado en Michoacán la enfermedad se presentó en 60 % de los viveros y en Jalisco del 62 %, también se ha reportado la enfermedad en viveros de los estados de Nayarit, Jalisco y Chihuahua (Alarcón et al. 2010, Prieto et al. 2009, Rueda et al. 2010, Sáenz et al. 2010).

Algunas especies de *Fusarium* se han reconocido como patógenos que atacan de forma agresiva a cultivos y plántulas de pino (Davydenko et al. 2018, Dick and Dobbie 2002). Puede desarrollarse como endófito asintomático aparentemente en muchas condiciones y los tipos de enfermedades inducidas son muy variados, así como su gravedad, una vez establecido puede inducir pudrición de raíces, tallos, marchitez, chancros, enfermedades foliares y pudrición de frutos y semillas (Leslie and Summerell 2006).

Algunas especies del género *Phytium* son parásitos facultativos y desarrollan su micelio sobre materia orgánica siendo patógenos al tener condiciones propicias para su desarrollo sobre todo cuando se utilizan sustratos no desinfectados con deficiente drenaje, sus zoosporas se pueden agregar cerca de las raíces y cuando se dan estas condiciones, germinan y producen hifas que tienen la capacidad de penetrar las células del sistema de raíces de la planta cuando el tejido es aún suculento causando la enfermedad (Cibrián TD. et al. 2007). Numerosas especies de *Phytophthora* se han asociado con enfermedades de damping-off en plántulas en viveros en todo el mundo, se dispersan a través de las raíces de plantas infectadas, suelo de plantas en maceta, medios de cultivo y agua y en algunos casos por transmisión aérea (Prospero et al. 2013). Por su parte, *Rhizoctonia* es clasificado como un hongo que forma micelio y esclerocios que son las estructuras de resistencia, sus hifas pueden infectar la plántula cuando emerge de la semilla y su desarrollo se da mejor en sustratos o suelos alcalinos con deficiencia en el drenaje y le favorecen temperaturas frescas y humedad (Cibrián TD. et al. 2007).

El hongo mayormente encontrado es *Fusarium circinatum*, que ataca semillas en germinación, plántulas en el vivero y árboles adultos y representa un problema económico debido a las pérdidas en diferentes cultivos y su control y también en las exportaciones (Pérez-Sierra et al. 2007). Infecta a árboles en acículas, ramas, raíces, conos y semillas (Hodge and Dvorak 2000). Otra especie que destaca por producir pudrición de raíz y del hipocótilo en plántula de los viveros es *Fusarium oxysporum* (Robles Yerena et al. 2016).

En México, uno de los hongos filamentosos más reportados causantes del Damping-off son los del género *Fusarium*, ya que se ha encontrado en muestras de plantas enfermas de una gran variedad de pinos como; *Pinus greggii*, *P. devoniana*, *P. pseudostrobus*, *P. cembroides*, *P. patula*, *P. douglasiana*, *P. montezumae*, *P. tenuifolia*, *P. ayacahuite*, *P. engelmannii*, *P. maximartinezii*, y en la mayoría de los estados productores de planta forestal como Chiapas, Chihuahua, Distrito Federal, Estado de México, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Michoacán, Morelos, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Veracruz y Zacatecas, encontrando a *F. oxysporum* como el agente causal de pudrición de la raíz, o damping-off, los síntomas presentados por las plantas enfermas fueron: variaciones de color observándose desde la clorosis, verde oscuro, follaje de tonalidad violeta y la base del tallo presentó estrangulamiento (García-Díaz and Cibrián 2009).

En plántulas de *P. patula* y *P. pseudostrobus*, en un vivero del estado de Guerrero se aislaron *F. oxysporum* y *F. solani*, los síntomas presentados fueron marchitez de la planta 15 días después de inocular el patógeno en las pruebas de patogenicidad (Robles Yerena et al. 2016).

En plántulas de *P. greggii* se logró aislar *F. circinatum*, en un vivero de Tlaxcala. Al realizar las pruebas de patogenicidad, los síntomas presentados fueron estrangulamiento del tallo y marchitamiento del brote principal, las acículas cambiaron a una tonalidad amarillenta y rojiza, y al extraer las plántulas observaron pudrición de la raíz principal y de raíces secundarias; raíces de color café claro, los síntomas más evidentes se presentaron en plantas de edad de 4 a 6 meses, el brote principal se dobló, ocasionando marchitamiento con cambio de color de marrón a color rojizo de forma paulatina, lo que es indicativo de la muerte de la planta. Por otro lado, las raíces mostraron pudrición, y una infección severa

se desarrolló de forma abundante en el cuello de la raíz y tallo, produciendo esporodoquios color blanco a naranja (García-Díaz et al. 2019, García-Díaz et al. 2017).

En un experimento realizado sobre *P. sylvestris* (Davydenko et al. 2018) evaluaron la inoculación algunas especies de *Fusarium* en plántulas de 2 meses de edad, encontraron que *F. circinatum* mató a casi todas las plántulas, *F. oxysporum* afectó el desarrollo y murieron cerca del 64 %, *F. tricinctum* y las otras especies tuvieron un impacto menor (*F. poae*, *F. graminearum*, *F. culmorum*). Las plántulas manifestaron la sintomatología típica de damping-off a los dos meses después de la inoculación, con mortalidad de hasta 32 %, y a 4 meses de la inoculación, la mortalidad fue cercana al 100%. Solo dos procedencias de *P. sylvestris* mostraron alta tasa de supervivencia a *F. circinatum*. Las lesiones que se presentaron en las plantas fueron lesiones necróticas, muerte regresiva de la acícula, marchitamiento y muerte regresiva de los brotes laterales. Las plantas muertas declinadas presentaron necrosis del tallo, decoloración y pérdida de acículas. En su estudio confirman la importancia de realizar pruebas de susceptibilidad con procedencias, así como la necesidad de explorar la resistencia individual de los genotipos de pino en preparación para hacer frente al problema de la probable aparición y establecimiento de *Fusarium circinatum*.

Como argumenta Dick and Dobbie 2002 es importante identificar al patógeno de forma correcta, porque síntomas originados por *Fusarium* spp. son parecidos en plántulas jóvenes de pino, y cita el caso que documentó un estudio acerca de la merma que se presentó en un vivero de *P. patula* donde al principio se le atribuyó el efecto a *F. oxysporum* y no al hongo que causa la enfermedad del cancro resinoso, y que muchas especies de *Fusarium* presentan variación en sus caracteres morfológicos y su separación entre especies mediante las técnicas de identificación tradicionales puede ser difícil.

La complejidad de la enfermedad y la variedad de los agentes que pueden causarlo ha llevado al uso indiscriminado de fungicidas para su control, por ejemplo, dazomet, metam sodio, vapan, formalina y metilbromuro, entre otros (Fajardo-Mejía et al. 2016).

A causa del uso indiscriminado de productos agroquímicos, se han presentado problemas de resistencia de los hongos causantes del damping-off (Roberts et al. 2014), además de problemas relacionados con daños al medio ambiente como la contaminación de mantos

freáticos, eutrofización, y acumulación de sustancias tóxicas en las cadenas tróficas (Camelo et al. 2011). Igualmente, la implementación de prácticas de cultivo como la aplicación de agroquímicos, ha provocado tensión entre pobladores de las zonas rurales debido a que han percibido daños en la piel y el sistema respiratorio, así como la persistencia de estos productos químicos en el ambiente (Giordano et al. 2018).

Debido a ello, existe la necesidad de desarrollar e implementar medidas alternativas para controlar enfermedades en semillas y plántulas de vivero, de forma segura y ecológica (Seseni et al. 2015). A este respecto, sustituir el uso de agroquímicos (Moraga-Suazo et al. 2011), y para esto el estudio de plantas superiores con actividad antifúngica ha demostrado que algunos extractos de plantas tienen capacidad de inhibir el crecimiento de hongos fitopatógenos (Pirzada et al. 2010).

Uso de extractos de plantas para controlar hongos fitopatógenos

Trabajos previos en *Dodonaea viscosa* revelan contenido de flavonoides, ácidos grasos y cianolípidos (Cao et al. 2009). Es una planta medicinal popular en la región, las hojas se utilizan como antiinflamatorios, antiúlceras, antibacteriano y agentes antifúngicos y en el tratamiento de fracturas (Venkatesh et al. 2008).

En Pakistan colectaron hojas de *Dodonaea viscosa* y obtuvieron el extracto por maceración en etanol, fue evaluado por la técnica de dilución del extracto en agar a dosis de 10, 50, 100, 200 g L⁻¹. Sobre *Alternaria solani* presentó una inhibición promedio del 56.9 %, sobre *Macrophomina phaseolina* fue de 52% y sobre *Rhizoctonia solani* 51.5 % (Aslam et al. 2010).

En India, sometieron hojas de *D. viscosa* a una extracción con maceración en agua y con solventes en dispositivo soxhlet con éter de petróleo, tolueno, cloroformo, metanol y etanol. El método para determinar la inhibición fue por dilución del extracto en el agar y la dosis evaluada fue de 2 mg mL⁻¹. El extracto acuoso presentó una inhibición moderada contra *F. verticillioides* en el rango comprendido entre 31 y 50 %. La inhibición para el extracto metanólico fue de 36 %, y la CMI determinada por el método de microdilución fue de 1 mg mL⁻¹ (Thippeswamy et al. 2013).

Hojas y flores de *D. viscosa* colectadas en Irán, fueron sometidas a extracción por maceración metanólica, y evaluados por difusión del extracto en agar obtuvieron una inhibición contra *Alternaria solani* de 57.2 %, y en *Botrytis cinérea* del 58 % (Bahraminejad et al. 2015).

Las plantas de agave son fuente de saponinas y polifenoles, que son compuestos considerados agentes con diversas actividades como anticancerígenos, antifúngicos, antiinflamatorios, antidiabéticos, antiinflamatorios, entre otros (Santos-Zea et al. 2012).

En un estudio con extractos de *Agave americana*, *A. ferox*, *A. montana*, *A. scabra* y *A. marginata* por maceración en metanol y se evaluaron contra *M. phaseolina*, *A. porii*, *A. niger*, *F. solani*, *A. awamorii* y *F. udum*. El método utilizado fue el de dilución en medio de cultivo. La mayor inhibición de todos los extractos se presentó en *M. phaseolina* donde las especies de agave mostraron inhibición por arriba del 50 % excepto *A. scabra* (48%). El hongo *A. awamorii* fue inhibido por *A. americana* (34,44%) y *A. montana*(34,17%), seguida de *A. ferox* (30,00%). No se observó una inhibición significativa en *A. marginata* (18,06%), y *A. scabra* no mostró ninguna inhibición. Para *F. solani* los extractos mostraron una inhibición por *A. ferox* del 39,34%, *A. americana* (38,86%), *A. montana* (35,55%), *A. scabra* (31,75%) y *A. marginata* (22,27%). En el caso de *F. udum*, los extractos presentaron la siguiente inhibición: *A. marginata* (27,61%), *A. montana* (26,12%), *A. ferox* (23,88%), *A. americana* (8,00%) y *A. scabra* no presentó inhibición. Sobre el hongo *A. porii* la inhibición fue de *A. ferrox* 29.05%, *A. americana* 10.14%, *A. marginata* 5.41 %, y *A. montana* y *A. scabra* promovieron el crecimiento. Ningún extracto pudo inhibir el crecimiento de *A. niger* (Maharshi and Thaker 2014).

En otro estudio con *A. lechuguilla* se obtuvieron extractos en equipo soxhlet con agua y con metanol y por infusión con emulsiones de lanolina y manteca de cacao con aceite mineral. El efecto sobre la inhibición de *Phytophthora cinnamomi*, se evaluó con fracciones de polifenoles a concentraciones de 500, 1000, 2000, 3000 y 4000 ppm En respuesta se obtuvo una inhibición del 60 % con el extracto acuoso a una concentración de 3000 ppm de polifenoles, una inhibición del 40 %, con el extracto etanólico con 40 ppm de polifenoles y no hubo inhibición con las emulsiones obtenidas con manteca de cacao y lanolina, y la CMI₉₀ fue de 121.7 ppm del extracto acuoso, 58.5 ppm extraído con

lanolina, 326,974 ppm extraído con cacao y 5,952 ppm extraído con etanol (Castillo-Reyes et al. 2015).(Castillo-Reyes et al. 2015) .

Hojas de plantas de *A. scabra* colectadas en Nuevo León, fueron sometidas a extracción mediante maceración en etanol y agua. Los extractos obtenidos se sometieron a escrutinio de inhibición por dos técnicas. Difusión en pozo y dilución del extracto en agar (medio envenenado). Las dosis evaluadas fueron 20 uL del extracto por pozo y en la otra técnica, 1 mL del extracto y 20 mL de PDA en placa de 90 x 15 mm. Se evaluó contra *Aspergillus niger*, *Botrytis cinérea*, *Mucor sp.* *Fusarium sp.* y *Penicillium sp.*. El extracto etanólico presentó inhibición de 3.58, 17.08, 26.91, 2.33 y 15.83 mm, para el acuoso 0, 9.17, 19.16, 3.00 y 8.91mm. Los resultados de la segunda prueba para el extracto etanólico mostraron inhibición del 10, 90, 28.3, 13.3 y 86.6 %, para el extracto acuoso obtuvieron 8.33, 16.6, 13.3 16.6 y 28.3 % (González-Álvarez et al. 2015).

En un estudio llevado a cabo en Nigeria, el extracto acuoso obtenido por maceración de *A. americana*, se evaluó con la técnica de dilución del extracto en agar a concentración de 10, 20, 40 y 60% contra *Phytophthora megakarya*. El porcentaje de inhibición obtenido fue de 42, 44, 48.3 y 54.3 % (Bolanle 2017).

En el caso de *Xanthium strumarium* es considerada una maleza indeseable pero los extractos alcohólicos de esta planta presentaron inhibición del hongo *Ceratocystis paradoxa* (Damayanti et al. 1996).

En un estudio en Túnez, obtuvieron extractos metanólicos por maceración, los evaluaron por la técnica de difusión en pozo. Lo probaron a tres dosis: 20, 50 y 100 µg por pozo, contra tres hongos. El porcentaje de inhibición de *Fusarium oxisporum* fue de 10.8, 23.5 y 38.6 %, para *Colletotrichum graminicola*, la inhibición fue de 17.9, 38.5 y 60.6 % y para *Penicillium digitatum* fue de 50.8, 70.5 y 87.7 % (Maazoun et al. 2019).

En Irán, evaluaron el aceite esencial de *X. strumarium* obtenido por hidrodestilación y extraído con hexano y diclorometano. Lo evaluaron sobre *Aspergillus niger* y *Candida albicans*. El método para probar la inhibición fue por difusión en disco impregnando 10 µL de diferentes concentraciones del aceite esencial: 10,20,40,60,80 y 100 µg mL⁻¹. Los resultados obtenidos fueron inhibiciones para *Candida albicans* de 3.2, 9.5, 15.9, 29.2,

36.7 y 44 mm y para *Aspergillus niger* de 2.3, 2.5, 11.2, 23.5, 23.9, 35.2 mm. La CMI fue examinada por microdilución como lo plantea CLSI y se consideró la dosis más baja que inhibió el crecimiento de más del 95% de los microorganismos el cual se obtuvo con 55.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Sharifi-Rad et al. 2015).

En Pakistán, la investigación sobre la fracción de acetato de etilo del extracto crudo de hojas de *X. strumarium* obtenido mediante maceración en metanol, consistió en evaluar su acción antifúngica contra *Microsporum canis*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium* sp., *Rhizopus* y *Helminthosporium* (Wahab et al. 2017), con la prueba de difusión en pozo. La dosis evaluada fue de 10 mg mL^{-1} . El control positivo fue griseofulvina. En los resultados se observó inhibición de 12, 19, 15, 12, 16, 14 mm y griseofulvina >12 y se observó un valor de CMI dentro del rango de 100-320 mg mL^{-1} .

En un estudio sobre actividad antifúngica y antioomicetes (Rajput et al. 2018) investigaron extractos de 103 plantas medicinales chinas contra *R. solani* y *P. aphanidermatum*. Uno de los extractos evaluados fue el fruto de *Xanthium sibiricum*, la extracción fue mediante infusión a 55 °C en metanol al 80 %. La prueba de inhibición fue mediante la técnica de difusión en pozo y la dosis de los extractos fue de 2 mg mL^{-1} . La tasa de inhibición fue de 20.6% para *R. solani* y 0 % para *P. aphanidermatum*.

El extracto obtenido por maceración en etanol al 80 %, se evaluó contra *C. albicans*, *T. mentagrophytes*, *T. rubrum*, *A. flavus* y *A. niger* con la técnica de difusión en pozo a dosis de 100 y 200 mg mL^{-1} por pozo y se determinó la concentración mínima inhibitoria y fungicida por macrodilución con la técnica del CLSI, control positivo Ketoconazol y el negativo el solvente. Se encontró que *X. strumarium* proporciona una actividad antifúngica significativamente superior en comparación con los otros dos extractos de plantas en todas las especies fúngicas probadas excepto en *A. niger* en ambas concentraciones probadas. A la concentración de 200 mg mL^{-1} obtuvieron una inhibición de 15.5, 46, 48, 11 y 8 mm y para la concentración de 100 mg mL^{-1} 14.5, 45, 46, 10, 8 mm.

Las CMI encontradas fueron 16, 0.5, 0.5, 16, 16 mg mL^{-1} , y la CMF fue de 16, 4, 4, 16 y >16 mg mL^{-1} (Gelagle 2018).

En Egipto, el extracto de hojas de *Xanthium strumarium* obtenido por maceración en agua, se analizó mediante la técnica de difusión en disco contra *F. oxysporum*, *Rhizopus stolonifer* y *A. niger* con las siguientes dosis: 5, 10, 20 y 60 mg mL⁻¹. La inhibición contra *F. oxysporum* fue de 10, 16,18 y 21 mm (Khalaphallah 2015).

En Nepal, probaron la actividad antifúngica del extracto metanólico de hojas de *X. strumarium* contra cinco hongos fitopatógenos: *Alternaria brassicae*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Sclerotium rolfsii* (Devkota and Das 2016). El método utilizado fue el de medio envenenado, y sus concentraciones evaluadas fueron 50, 100, 150, 200, 250 mg/mL, los controles positivos fueron bavistin y mancozeb y el negativo fue agua. Los resultados de crecimiento en diámetro para *F. oxysporum* fueron de 28, 22, 0, 0 y 0 mm respectivamente, para las dosis del extracto y de 13 mm para bavistin, 15 mm para mancozeb y 31 mm para el control negativo.

En Arabia Saudita evaluaron extractos obtenidos por maceración de tallo y hojas de *Xanthium spinosum* en etanol, cloroformo y hexano sobre el crecimiento de hongos fitopatógenos *Pythium ultimum*, *Penicillium expansum* y *Fusarium solani*. La técnica utilizada para determinar la inhibición fue difusión del extracto en disco y la dosis fue de 10 µL disco⁻¹, el control positivo fue flucoral 10 µg disco⁻¹ y el negativo el solvente. Los resultados de la prueba para *F. solani* fueron los siguientes: 4.13, 4.13 y 4.53 mm de inhibición para los extractos etanólico, clorofórmico y hexánico. La concentración mínima inhibitoria la probaron impregnando discos de papel filtro de 5 mm de diámetro con dosis de extracto resuspendido (25 a 150 mg mL⁻¹) y colocándolo sobre placas de Agar Czapek's inoculadas con el fitopatógeno. La CMI fue de 0.112, 0.113 y 0.151 mg mL⁻¹ para los tres tipos de extracto (Hashem et al. 2016).

En Pakistán, el aceite esencial obtenido por hidrodestilación de hojas de *Xanthium strumarium*, fue probado sobre *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Alternaria alternata* y *Penicillium digitatum*. La prueba de inhibición realizada fue por difusión en pozo y las dosis evaluadas fueron 250, 150, 100, 65, 25, 8 µg mL⁻¹. Los resultados de inhibición para *F. oxysporum* fueron de 31.8, 23.5, 18.3, 15.8, 12.8 y 11.2 mm y para *F. solani* 39.0, 28.5, 24.8, 21.5, 18.8, 16.1 mm. La CMF fue determinada

por el método de macrodilución en tubo y los resultados fueron de 8 $\mu\text{g mL}^{-1}$ para las cepas de *Fusarium* (Parveen et al. 2017).

En Irán se evaluó el aceite esencial obtenido por hidrodestilación de frutos de *Xanthium strumarium* sobre *Pyricularia oryzae*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Alternaria alternate*, *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*. El método para determinar inhibición fue por difusión en pozo depositando 25 μL del aceite esencial. La inhibición que se obtuvo para *F. oxysporum* fue de 15.75 mm. La CMI fue determinada por la técnica de microdilución modificada y la CMI obtenida fue de 50 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Ghahari et al. 2017).

Kumar et al 2018 analizaron el extracto obtenido por infusión en agua a 50 °C de hojas de *Xanthium strumarium* colectado de Tamil Nadu, India. y se probó en forma de nanopartículas de ácido cloroáurico, mediante la técnica de difusión en pozo sobre algunas cepas de hongos MTCC *Aspergillus niger*, *A. flavus*, *A. terreus*, *Fusarium oxysporum* y *Candida albicans*. Las nanopartículas se disolvieron en agua estéril y las dosis evaluadas fueron 25, 50, 75 y 100 mg por pocillo. El efecto de inhibición para *F. oxysporum* directamente proporcional a la dosis y obtuvieron zonas de inhibición de 0, 6,8, y 10 mm. La zona de inhibición del clotrimazol fue de 14 mm (Kumar P. Vijaya et al. 2018).

Descripción de las especies utilizadas en la presente investigación

Dodonaea viscosa Jacq. (Sapindaceae)

Nombre común Matagusano, hierba de la cucaracha, palo de golpe, jarilla, chapulixtle (González et al. 2004)

La especie *D. viscosa* es descrita de manera botánica por (Calderón and Rzedowski 2001), como un arbusto de 1 a 3 m de alto, perennifolio, viscido; hojas sésiles o cortamente pecioladas, láminas simples, linear-oblancooladas u oblongo-lanceoladas, de 5 a 12 cm de largo, agudas o redondeadas en el ápice, glabras y resinosas en el haz, pubescentes a glabras en el envés; flores unisexuales, amarillentas, dispuestas en cortos corimbos laterales; tépalos de 3 mm de largo; cápsula samaroides, trilocular, trilobada, glabra, de 1.5 a 2.5 cm de ancho.

Agave durangensis Gentry, (Agavaceae)

Es descrita botánicamente por (Gentry 2004), como mediana a grande, simple o cespitosa, de tallo corto, gris glauco, de hojas anchas, rosetas fuertemente armadas 8-12 dm de altura, 12-18 dm de ancho; hojas en su mayoría 40-90 x 14-22 cm, ampliamente lanceoladas, más anchas en el medio, más estrechas por encima de la base ancha, bastante rectas a curvadas hacia afuera, planas a cóncavas especialmente hacia el ápice, gruesas y convexas hacia la base, ásperas, pruinosas, los márgenes profundamente crenado-mamilado; dientes prominentes, 1-2 cm de largo, ampliamente acanalados arriba, gris pruinoso sobre café; panícula de 7-8 m de altura, profunda, abierta, con 18-30 laterales trifustados extendidos sinuosamente en el $\frac{3}{4}$ superior de un eje en zigzag; brácteas pedunculares de 15-25 cm de largo, escariosas, remotas, reflejas; flores en pequeñas umbelas, 60-80 mm de largo, apretadas, persistentemente erectas, amarillas; ovario de 30 a 45 mm de largo, incluido el cuello sin constricción; tubo cilíndrico, 15-22 mm profundo, ancho y carnososo, ligeramente picado; tépalos desiguales, estrictamente adheridos a los filamentos, volviéndose coriáceos, el exterior más grande, de 10-12 mm de largo, densamente redondeado en el dorso y superpuesto al interior, con un ápice notablemente papilado, casi córneo, rojizo, el tépalo interior más pequeño, con quillas afiladas; filamentos de 48-60 mm de largo, algo aplanados, insertados en 2 rangos 8-12 y 6-10 mm por encima de la base del tubo; anteras de 18-25 mm de largo; cápsulas de 4.5-6 x 1.6-1.8 cm, oblongas, oscuramente estipuladas, redondeadas y de pico corto en el ápice; semilla pequeña, 4.5-6 x 3.5-4.5 mm, semilunar a oboval, con ala ancha pero poco elevada en el borde.

Xanthium strumarium L. (Asteraceae = Compositae)

Nombre común: Cadillo, abrojo (González et al. 2004).

Planta de hábitat arvense o ruderal de distribución cosmopolita, abundante en Norteamérica, botánicamente es una hierba anual, robusta (puede crecer hasta 2 metros de alto), con tallos ásperos, lineolados, hojas grandes y ásperas en ambas caras, con peciolo que pueden ser largos (hasta de 15 cm), láminas anchamente ovadas a triangular-ovadas (hasta 18 cm de ancho y 14 cm de largo), con tres a cinco lóbulos, margen irregularmente crenado, trinervadas, base acorazonada a cuneada, ápice agudo a obtuso, capítulos florales unisexuales; los masculinos agrupados en racimos tipo espiga en el ápice de las ramas y en las axilas de las hojas, subglobosos, de 5 a 8 mm de diámetro, involucre

de ± 8 brácteas linear-lanceoladas, de 2 a 3 mm de largo, receptáculo cilíndrico, provisto de páleas similares a las brácteas involucrales, flores ± 40 , sus corolas de ± 2 mm de largo, anteras largamente salientes, de ± 1.5 mm de largo; los femeninos en la base de las inflorescencias, uno o pocos en la base de las inflorescencias, el involucre espinoso, en la madurez ovoide a subcilíndrico, de 1 a 4 cm de largo, incluyendo un par de picos terminales, las espinas por lo general ganchudas, más o menos densamente pubescentes y glandulosas (Calderón and Rzedowski 2001, González Elizondo et al. 2013).

JUSTIFICACIÓN

La producción de plantas de calidad, libre de plagas y enfermedades es una meta que persiguen los viveristas. Sin embargo, durante el cultivo de las plantas en el vivero se propician las condiciones para el desarrollo de hongos dentro de los cuales se destaca el complejo que produce la enfermedad llamada damping-off. Para su control se utiliza de manera convencional fungicidas de origen sintético lo cual puede tener efectos nocivos a corto y mediano plazo. Con respecto a esto, el manejo integrado de plagas y enfermedades tiene como fundamento utilizar técnicas que ayuden a su control y la tendencia es que el uso de plaguicidas de origen sintético sea la última opción debido a los problemas asociados a su uso. El uso de extractos de plantas con actividad biológica sobre organismos fitopatógenos es una opción a la que se puede recurrir de primera instancia, es amigable con el medio ambiente y es una alternativa de explotación para productores de las regiones donde se desarrollan las especies en cuestión. La utilidad del presente estudio es la de definir la efectividad de los extractos para de esta forma estar en posibilidad de recomendar su uso en el control de enfermedades en la producción de planta en vivero.

HIPÓTESIS

Los extractos de plantas utilizados en la presente investigación tienen la capacidad de controlar el crecimiento de hongos causantes de damping-off, tanto in vitro como en condiciones de invernadero.

OBJETIVOS

Objetivo general

Evaluar el efecto de los extractos de *Agave durangensis*, *Dodonaea viscosa* y *Xanthium strumarium* en el control de hongos del complejo damping-off en la producción de plantas en invernadero.

Objetivos particulares

- 1.- Aislar los hongos causantes del damping-off, a partir de plántulas que presenten síntomas de la enfermedad.
- 2.- Obtener extractos metanólicos de las plantas en estudio.
- 3.- Medir la inhibición por las técnicas difusión en pozo contra los hongos aislados.
- 4.- Determinar la concentración mínima fungicida de los extractos con mayor actividad
- 5.- Realizar la semipurificación de los compuestos activos por técnicas cromatográficas y establecer el tamizaje fitoquímico de las fracciones activas.
- 6.- Determinar la efectividad de los compuestos activos sobre damping-off en condiciones de invernadero mediante inoculación, y el ajuste modelos epidemiológicos.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento del patógeno

Las muestras de plántulas se obtuvieron de cinco viveros del estado de Durango (Figura 1): vivero INIFAP (23°59'23.2''N y 104°37'26.2''O, 1879 msnm), vivero General Francisco Villa (25°58'19.7''N y 104°35'51.6''O, 1878 msnm), vivero de la Facultad de Ciencias Forestales de la Universidad Juárez del Estado de Durango (24°00'48.3''N y 104°41'03.2''O, 1899 msnm), vivero General Emiliano Zapata (25°03'40''N y 105°26'17''O, 1756 msnm), y Vivero San Nicolás (24°56'57''N y 105°25'02.8''O, 1806 msnm). El muestreo fue dirigido a plántulas de pino de 1.5 meses de edad, con síntomas de damping-off, junto con sustrato de la cavidad de crecimiento.

Las muestras obtenidas fueron depositadas en tubos cónicos de 50 mL, para su transporte al laboratorio. Cada muestra se depositó en vasos estériles de licuadora con 100 mL de solución amortiguadora de fosfatos pH 7.2 y fue homogenizada durante un minuto y se dejó reposar un minuto. Se realizaron seis diluciones decimales seriadas de cada muestra, las cuales fueron inoculadas por extensión, en cajas de Petri de 90 x 15 mm con agar dextrosa papa (PDA) y agar dextrosa Sabouraud (SDA) suplementados con 0.05 g L⁻¹ de sulfato de estreptomicina. Estas placas se incubaron a 28 °C por siete días hasta obtener el cultivo axénico de cada aislamiento. Para ello se procedió mediante la adaptación de la técnica de (Obanor et al. 2013) para obtener cultivos monospóricos de la siguiente manera: con asa micológica, se realizó una punción en el centro de la colonia y se introdujo en un tubo de vidrio con 7 mL de solución salina 0.85% y polisorbato 80 0.01% estéril, y se agitó suavemente. Se tomó una muestra de 100 uL y se inoculó por extensión en superficie de cajas de Petri con agar agua (AA) y fueron incubadas a 25°. Después de 48 horas de incubación, a partir de una colonia formada por un solo conidio (monoconidial o cultivo monospórico), se realizó la transferencia de un plug de la punta de una hifa del borde de la colonia y se transfirió asépticamente a cajas de Petri con PDA y se incubaron a 28°C durante 7 días.

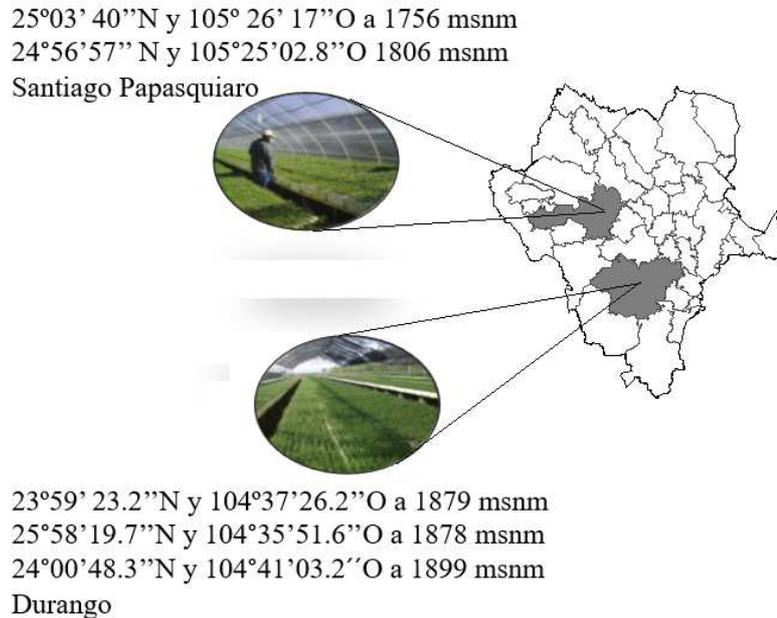


Figura 1. Ubicación de los viveros donde se extrajeron las plántulas con síntomas de damping-off

Identificación

Para su separación e identificación macroscópica se observó y registró el crecimiento de la colonia de cada aislamiento y sus características morfológicas como la elevación en plano transversal, el borde, color del micelio, producción de pigmento, textura de la superficie, reverso de la caja Petri (Gabrekiristos et al. 2020).

A partir de cultivos monospóricos de cada aislamiento se transfirieron plugs a cajas de Petri con agar Spezieller Nährstoffarmer (SNA), agar hoja de clavel (CLA), y en PDA propuestos en (Leslie and Summerell 2006), para observar y registrar sus características microscópicas.

Del cultivo monospórico transferido a SNA y PDA se procedió aplicando la técnica de (Harris 1986) y la forma de inoculación que propone (Rosana et al. 2014). Los microcultivos fueron incubados durante 7 días a 28° C. Después cada cubreobjetos proveniente del microcultivo, se montó sobre portaobjetos con azul de lactofenol y fue sellado en el borde con esmalte acrílico. Para las observaciones microscópicas se utilizó

un microscopio Leica® y el objetivo de 40X, además se utilizó una cámara de 5 megapíxeles Amscope® y las capturas se realizaron mediante el software Amscope® versión 1.7. La identificación se realizó con ayuda de claves morfológicas (Barnett and Hunter 1998, Leslie and Summerell 2006, Watanabe 2010).

Las cajas de Petri con CLA fueron preparadas con la técnica de (Peluola et al. 2020), e incubadas a 25° C durante 7 días con fotoperiodo de 12 horas de luz ultravioleta (365nm) y 12 horas de luz blanca (Britz et al. 2001). La fuente luminosa cuadro fue una lámpara Lumiaction® FL15BLB de 15 Watts y la luz blanca un tubo fluorescente TecnoLite® F15T8D de 15 watts ubicadas a 50 cm.

De los aislamientos que formaron esporodocios se tomó una muestra con unas pinzas tipo Meriam previamente esterilizadas y se depositó en portaobjetos de 75 x 25 mm con el centro cóncavo y una gota de azul de lactofenol para posteriormente colocar un cubreobjetos de 22 x 22 mm y sellar los bordes con esmalte acrílico para su observación en el microscopio.

Por cada aislamiento se realizaron la medición de largo y ancho de 100 macroconidios y microconidios (Robles-Yerena et al., 2017; García-Díaz et al. 2017).

Pruebas de patogenicidad

La semilla utilizada para las pruebas fue de la especie *Pinus engelmannii*. Se procedió con la técnica de (Aegerter and Gordon 2006), con modificaciones. Previo a su siembra, la semilla recibió un tratamiento de flotación en agua destilada durante 20 horas para descartar semillas inviables. Posteriormente, fue desinfectada por flotación en solución de hipoclorito de sodio comercial al 10 % durante 15 minutos. Se retiró el excedente de cloro con cuatro enjuagues de agua destilada estéril y se dejó secar durante 10 minutos. La semilla fue sumergida durante 1 hora en una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^5 UFC mL⁻¹. Después fue sembrada a 1 cm de profundidad en contenedores de polietileno rígido de 36 cavidades con un volumen por cavidad de 80 mL llenados con peat moss el cual previamente fue sometido a esterilización por medio de calor húmedo en una autoclave a 121° C durante 30 minutos. El testigo consistió en la siembra de la semilla sin inoculación del patógeno. Se registró el porcentaje de germinación

diariamente, comenzando al emerger la primera plántula, así como la aparición de síntomas de enfermedad. Se registró también la aparición de los primeros síntomas y signos en las plantas con enfermedad. Al morir la plántula se extrajo de la cavidad de crecimiento, y se realizó un enjuague en etanol a 70 % durante 1 minuto. Después se depositó en cajas de Petri de 90 x 15 mm con PDA + antibiótico. Se colocaron en la incubadora a 28 ° C durante 72 horas después de los cuales se realizaron observaciones para determinar el agente que causó la enfermedad (Postulados de Koch).

Preparación de inóculo fúngico para pruebas de inhibición

Para la obtención de conidios se utilizó la técnica de raspado con modificaciones menores (Sánchez et al. 2005). Se utilizaron cultivos en PDA de cada aislamiento desarrollados durante 7 días a 28 °C, y en cada caja se agregó solución salina 0.85 % y polisorbato 80 al 0.05 % en cada caja Petri, el raspado se realizó con ayuda de un asa bacteriológica y el sobrenadante fue depositado en tubos de cultivo estériles de 90 x 12 mm. El tubo fue agitado durante 1 minuto y se dejó sedimentar 5 minutos. Se tomó una muestra por duplicado y se realizó el conteo de conidios con ayuda de un hematocitómetro de Neubauer. La suspensión de conidios se ajustó a una concentración de 1×10^5 unidades formadoras de colonias por mililitro (UFC mL⁻¹).

Recolección de material vegetal

El material vegetal para obtener los extractos fue colectado en el mes de septiembre de 2018. Las plantas de *Agave durangensis* y *Dodonaea viscosa*, fueron colectadas en el ejido Primero de Mayo en el municipio de Durango (24° 00' 41.3''N y 104° 20' 4.9''O, 1891 msnm). Las muestras de bagazo de *A. durangensis*, obtenidas después del proceso de destilación para obtención de mezcal fueron recolectadas en una planta de producción de mezcal artesanal. Los ejemplares de *Xanthium strumarium* fueron colectados en una parcela agrícola, en el ejido 25 de Diciembre municipio de Nazas (24° 15'46'' N y 104° 03' 05'' O, 1233 msnm. Después de extraídas fueron llevadas al laboratorio para su procesamiento.

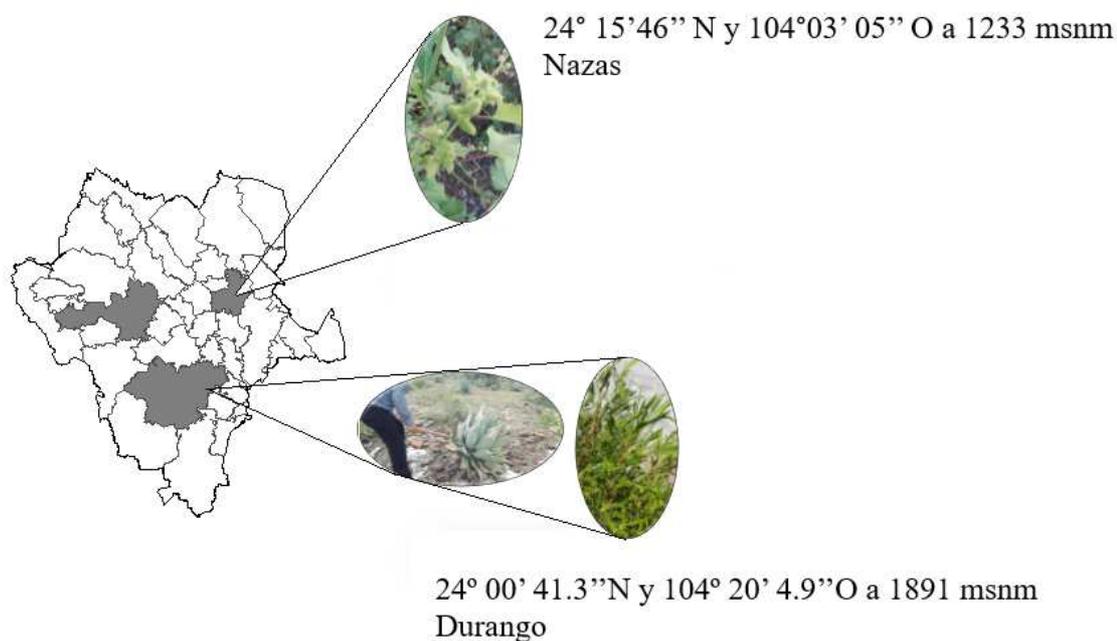


Figura 2. Puntos de colecta de ejemplares botánicos sometidos a extracción

Obtención de los extractos

Las plantas obtenidas fueron secadas a la sombra y después fueron trituradas con una licuadora Osterizer®. Para la extracción mediante maceración estática, se introdujeron 50 g de materia seca y 300 mL de metanol en un matraz Erlenmeyer de 500 mL y se dejaron reposando 24 h y transcurrido ese tiempo, el líquido obtenido fue filtrado con papel filtro, y se introdujo en un rotaevaporador Yamato BM 100® hasta sequedad y el solvente recuperado se agregó de nuevo al matraz. Este proceso de extracción se repitió tres veces para obtener el extracto el cual se determinó el rendimiento con la siguiente fórmula:

$$\text{Rendimiento} = \frac{\text{peso del extracto obtenido}}{\text{peso seco del material vegetal}}$$

Tamizaje fitoquímico

Para esto, se realizaron pruebas de identificación fitoquímica: Shinoda para flavonoides, Salkowski para esteroides y melilesteroides, ácido sulfúrico para flavonoides, Liebermann-

Burchard para triterpenos y compuestos esteroidales, Baljet para sesquiterpenolactonas, Dragendorff para alcaloides, Molish para azúcares, la prueba de cumarinas, y la prueba de bicarbonato de sodio para saponinas (Domínguez, 1973; Marcano y Hasegawa, 2002).

Pruebas de inhibición preliminar

Se determinó mediante la técnica de difusión en pozo en agar con ligeras modificaciones (Kaur et al. 2015). Se preparó una suspensión de inóculo a una concentración de 1×10^5 UFC mL⁻¹. Se depositó 100 uL de la suspensión en una caja de Petri de 90 x 15 mm con PDA y se extendió con ayuda de un asa de vidrio Driglasky. Después, con la boca de un tubo de ensaye estéril de 6 mm de diámetro, se realizaron orificios sobre la superficie del agar distribuidos de forma equidistante, se retiró el agar con una espátula y se agregó 100 uL de cada extracto resuspendido en metanol (200 mg mL⁻¹) en cada pozo. El control consistió en depositar metanol en uno de los pozos. Las cajas se incubaron a 28 °C durante 7 días. El efecto antifúngico se comprobó con la presencia o ausencia de una zona de inhibición en forma de halo en el pocillo de cada uno de los extractos evaluados. En el caso de presentar inhibición, se registró el halo de inhibición con ayuda de un vernier con aproximación a milímetros, se realizó el registro y pruebas no paramétricas de Kruskal-Wallis y de comparaciones por pares para determinar el extracto con mayor actividad que fue seleccionado para realizar las pruebas de concentraciones de inhibición.

Determinación de la concentración mínima inhibitoria y fungicida

La prueba fue realizada siguiendo el protocolo M38 A2 en microdilución de la CLCI (2008) para hongos filamentosos con algunas modificaciones. Se preparó una suspensión de inóculo a una concentración de 1×10^5 UFC mL⁻¹ en caldo papa dextrosa. Cada pozo de la microplaca contenía un volumen final de 200 uL, del cual fueron 100 uL de inóculo y 100 uL del extracto resuspendido en metanol a diferentes concentraciones (comenzando a 200 mg mL⁻¹ y disminuyendo al 50 % la concentración hasta llegar a 3.125 mg mL⁻¹). Los controles consistieron en caldo sin inocular, caldo inoculado sin extracto y caldo inoculado con solvente. Las placas de microdilución se incubaron a 28° C durante 7 días. La concentración mínima inhibitoria (CMI) se determinó con una lectura visual de la inhibición completa de crecimiento. Para determinar la concentración mínima fungicida (CMF), se siguió la técnica de (Amoussa et al. 2016), con modificaciones menores que

consistió en tomar 20 μ L de cada pocillo donde aparentemente no se observó crecimiento y se depositó cada alícuota en cajas de Petri con PDA y estas cajas fueron incubadas a 28° C durante 48 horas. La concentración mínima fungicida fue aquella concentración más baja a la cual el hongo no tuvo la capacidad de crecer.

Separación cromatográfica

El extracto que presentó mayor actividad inhibitoria fue sometido al proceso de semipurificación en gradiente por cromatografía en columna. Se utilizó una columna cromatográfica de vidrio de 3.5 cm de diámetro y 45 cm de altura con un matraz redondo de 500 mL colocado en la parte superior para contener el solvente. La fase estacionaria fue sílica gel 60 Å (Sigma-Aldrich®), y como fase móvil se utilizó una mezcla binaria cloroformo-metanol en poder creciente, comenzando con proporción 10:0, cambiando el gradiente de proporción 0.5 de polaridad y finalizando con metanol. Para eluir el extracto se utilizó 1 litro de solvente de cada proporción y se recolectaron fracciones de 50 mL. Las fracciones obtenidas se concentraron evaporando el solvente y posteriormente se resuspendieron en 3 mL del solvente respectivo y realizó cromatografía en capa fina (TLC), para determinar las fracciones similares y unir las (Kaur et al. 2015). Una vez obtenidas las fracciones se depositaron en viales ambar de 10 mL y depositadas en el refrigerador a 4°C hasta su uso.

Bioautografía

Las fracciones que evidenciaron actividad inhibitoria fueron sometidas a bioautografía. Los cromatofolios utilizados fueron de vidrio de 25 x 75 mm con sílica gel. Muestras de fracciones a evaluar fueron depositadas sobre cromatofolios de vidrio a 1.5 cm del borde con ayuda de tubos capilares para microhematocrito (1.1 x 75 mm), cada placa fue eluída y se dejó secar el solvente. Una vez evaporado completamente el solvente, los cromatofolios fueron introducidos en cajas de Petri de 90 x 15 estériles. Sobre cada cromatofolio se colocó una capa de agar PDA. Se depositó 50 μ L de inóculo fúngico a una concentración de 1×10^5 UFC y se extendió sobre el agar con ayuda de un asa de vidrio Driglasky estéril. Se introdujeron pequeños cuadros de AA en la caja de Petri para generar un ambiente húmedo (cámara húmeda), y se incubaron a 28° C durante 7 días. Al

evidenciarse una zona de inhibición fue identificada la posición de los compuestos en el cromatofolio y fue calculado su factor de retención (rf) con la siguiente fórmula:

$$rf = \frac{\textit{distancia recorrida por el soluto}}{\textit{distancia recorrida por el solvente o fase móvil}}$$

Se observó el cromatofolio con luz ultravioleta (longitud de onda 365 nm), para identificar la banda responsable de la actividad.

La fracción activa fue desarrollada nuevamente en TLC. Para ello se prepararon cromatofolios con placas de vidrio de 10 x 15 cm, con sílica gel 60 G. La fracción con actividad fue depositadas con un ayuda de capilar para hematocrito a 1.5 cm del borde del cromatofolio y fueron desarrollas con su mezcla de solvente respectivo. Una vez evaporado el solvente, las placas fueron visualizadas bajo luz UV (365 nm) y las áreas fueron comparadas con el rf de los puntos relacionados en la placa de TLC de referencia. Una vez localizado la banda con actividad, fue raspada con una espátula de teflón, y depositada en un vaso de precipitados de 250 mL. Se añadieron 25 mL de metanol, y después fueron filtrados con membrana de celulosa para retirar la sílica gel. Después de filtrado se colocó dentro de un vial color ambar y se realizaron las pruebas fitoquímicas mencionadas anteriormente para determinar los compuestos de la fracción activa.

Evaluación del extracto en vivero

Se llevó a cabo un ensayo en vivero para verificar la patogenicidad de los aislamientos, determinar la dinámica de la enfermedad, así como la evaluación de la efectividad del extracto que produjo inhibición en condiciones in vitro. Cada aislamiento fúngico se evaluó sobre la especie de pino de la cual fue aislado originalmente. Para la inoculación, se siguió la metodología de (Morales-Rodríguez et al. 2018) con algunas modificaciones. Previo a su siembra, la semilla recibió un tratamiento de flotación en agua destilada durante 20 horas para descartar semillas inviables. Posteriormente, fue desinfectada por flotación en solución de hipoclorito de sodio comercial al 10 % durante 15 minutos. Se retiró el excedente con seis enjuagues de agua destilada estéril y se dejó secar durante 10 minutos (Aoudou et al. 2012). Después fue sembrada a 1 cm de profundidad en contenedores de polietileno rígido de 98 cavidades con un volumen por cavidad de 160 mL llenados con una mezcla compuesta por 50 % de peat moss, 25 % de perlita expandida

y 25 % de vermiculita, y se agregó fertilizante de lenta liberación (8 meses) Osmocote® de formulación 18-6-12 (N-P-K) a una dosis de 4 kg por 1000 L de sustrato.

El tamaño de la unidad experimental fue de 18 plantas, se evaluaron cuatro tratamientos con cinco repeticiones y el diseño aplicado fue completamente al azar.

El testigo absoluto fue sembrado directamente en la cavidad después de la preparación pregerminativa. La semilla del tratamiento control negativo fue sumergida en una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^5 UFC mL⁻¹ durante 1 hora, se eliminó el sobrenadante y se dejó secar durante 15 minutos, posteriormente fue sembrada. La semilla del tratamiento control positivo fue sumergida en una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^5 UFC mL⁻¹ durante 1 hora, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar 15 minutos y posteriormente se agregó fungicida Benomilo en presentación de polvo humectable al 50 %, a razón de 100 g por cada 1000 g de semilla, y posteriormente fue sembrada. La semilla correspondiente al tratamiento del extracto fue sumergida en una suspensión de conidios a una concentración de 1×10^5 UFC mL⁻¹ durante 1 hora, se eliminó el sobrenadante, se dejó secar 15 minutos y posteriormente se agregó 12 mL de extracto de *Xanthium strumarium* resuspendido en metanol a razón de 30 mg mL⁻¹ (dosis de CMF obtenida en laboratorio).

Se hicieron conteos de germinación a partir de la primera plántula emergida y hasta cumplir 50 días después de la siembra (dds). A partir de que germinó la primera semilla, se hicieron conteos diarios de plántula muerta por damping-off durante 180 días. Estas plántulas dañadas se extrajeron de la cavidad de crecimiento para su traslado a laboratorio. Fueron sumergidas en etanol al 70 % durante 1.5 minutos y colocada dentro de una caja de Petri con PDA suplementado con estreptomycinina e incubadas a 25° C durante 72 horas. Posteriormente del micelio desarrollado en estas cajas se transfirieron colonias a cajas con PDA e incubadas a 25°C durante 72 horas. Se realizaron observaciones microscópicas para determinar si las plántulas fueron afectadas por el hongo inoculado y así comprobar los postulados de Koch

Las variables evaluadas fueron: porcentaje de germinación a los 50 días con la fórmula:

$$PG = \frac{Sg}{Ss} * 100$$

PG=porcentaje de germinación, sg=semillas germinadas, ss=semillas sembradas

También se calculó el índice de germinación y la velocidad de germinación, obtenido con las fórmulas (González-Zertuche and Orozco-Segovia 1996).

$$IG = \frac{\sum(n_i t_i)}{N} \quad VG = \sum \left(\frac{n_i}{t} \right)$$

IG= índice de germinación, ni= número de semillas germinadas el día i, ti= número de días después de la siembra y N= total de semillas sembradas; VG velocidad de germinación, ni= número de semillas germinadas el día i, t = tiempo de germinación desde la siembra hasta la germinación de la última semilla.

Los datos de germinación y daño fueron sometidos a un análisis estadístico mediante la prueba de Kruskal-Wallis y en caso de diferencias las respectivas pruebas de comparaciones por pares, se realizó la prueba Log-Rank a partir de las curvas de Kaplan-Meier para determinar las diferencias de supervivencia entre los tratamientos. Con los datos del porcentaje de daño de los aislamientos que presentaron diferencias significativas respecto al testigo, se determinaron curvas de progreso de la enfermedad y su ajuste a modelos epidemiológicos: logístico, Gompertz, exponencial y monomolecular (Campbell and Madden 1990), para definir los parámetros de la ecuación. El análisis estadístico se realizó con ayuda del software InfoStat ® versión 2017 (Di Rienzo et al. 2017), y los gráficos en SigmaPlot ®versión 10.0.

Estas plántulas fueron llevadas al laboratorio y fueron sumergidas en etanol al 70 % durante 1 minuto y después depositadas en cajas de Petri de 90 x 15 mm con PDA e incubadas a 28° C. A las 48 horas se realizaron montajes por impronta con cinta adhesiva transparente sobre portaobjetos de vidrio de 25 x 75 mm con azul de lactofenol para su observación en el microscopio y determinar si el daño fue por el hongo inoculado o por otras causas. Las semillas que no germinaron se colocaron dentro de cajas Petri con PDA e incubadas a 28° C. Después de 48 horas de incubación, se realizaron improntas para

determinar si las semillas no germinadas fueron afectadas por el hongo inoculado. Se calculó el porcentaje de plantas dañadas por el hongo con la fórmula:

$$\% \text{ daño} = \frac{\text{Plántulas dañadas por el hongo}}{\text{Plántulas germinadas}} * 100$$

Análisis estadístico

Para el análisis estadístico de las variables observadas, se utilizó una prueba de Kruskal-Wallis mediante el programa Infostat® versión 2017 (Di Rienzo *et al.*, 2017) y el programa SigmaPlot® versión 10.0.

RESULTADOS

Las especies que se cultivaron en los viveros muestreados en el periodo de producción de planta de ciclo templado-frío 2018-2019 fueron *Pinus engelmannii*, *P. durangensis*, *P. cooperi*, *Pinus arizonica* y *P. cembroides*. Se encontraron algunas plántulas de estas especies con la sintomatología de damping-off: postradas, pérdida de turgencia generalizada, y el cuello necrótico y con estrangulamiento. Solo en *P. cembroides* no se encontraron plántulas enfermas. Después del procesamiento de las plántulas mediante las diluciones decimales seriadas, se obtuvieron colonias de hongos los cuales se pudieron aislar y obtener en cultivo axénico después de tres transferencias sucesivas. Los aislamientos obtenidos fueron de los géneros *Aspergillus*, *Penicillium*, *Alternaria*, *Fusarium*, *Rhizopus*, *Scopulariopsis* y *Acremonium*. Siete de estos aislamientos obtenidos mostraron la morfología macroscópica del género *Fusarium* el cual está reportado como fitopatógeno de plantas de pino y de otras especies, por lo que se seleccionó para realizar las pruebas de inhibición y de patogenicidad. En las muestras no se encontraron hongos de los géneros *Rhizoctonia*, *Phytium* y *Phytophthora*.



Figura 1. Ambiente de producción de los viveros donde se extrajeron las muestras de plántulas de pino.



Figura 2. Obtención de muestras de pino para el aislamiento de hongos fitopatógenos

Las características predominantes de las colonias de *Fusarium* fueron la superficie seca con micelio de aspecto algodonoso, y la producción de pigmento rosa a rosa violáceo (Tabla 1). Entre estos estos aislamientos, se presentaron variaciones en la elevación de la colonia, la disposición de las hifas en el micelio y el borde de la colonia, de tal manera que se separaron por morfotipos y se asignó un identificativo (ID) de acuerdo con la especie de pino de la que fueron aislados (Tabla 2).

Tabla 1. Características macroscópicas de los aislamientos de *Fusarium* obtenidos de plántulas de pino cultivadas en viveros forestales del estado de Durango.

Características	Morfotipo 1	Morfotipo 2	Morfotipo 3	Morfotipo 4	Morfotipo 5	Morfotipo 6	Morfotipo 7
Aspecto de la superficie	Seca algodonosa	Seca algodonosa	Seca algodonosa	Seca algodonosa	Seca algodonosa	Seca algodonosa	Seca algodonosa
Color de la colonia	Rosa pálido a blanco	Rosa violáceo	Violáceo en el centro, el resto blanco	Rosa a violáceo en el centro, el resto blanco	Rosa violáceo	Rosa pálido en el centro, el resto blanco	Rosa pálido en el centro, el resto blanco
Color del reverso de la caja	Centro rosa, el resto color crema	Rosa a crema	Rosa a violáceo en el centro, el resto crema	Rosa a violáceo en el centro, el resto crema	Rosa a violáceo en el centro, el resto rosa	Centro color crema, el resto color blanco	Color blanco a crema
Elevación de la colonia (vista lateral)	Plana	Ligeramente umbonada	Ligeramente umbonada	Convexa	Elevada	Ligeramente umbonada	Ligeramente umbonada
Disposición de las hifas aéreas (vista lateral)	Inclinadas	Levemente inclinadas	Erectas	Levemente inclinadas	Levemente inclinadas	Levemente inclinadas	Erectas
Borde de la colonia	Filamentoso	Filamentoso irregular	Filamentoso	Filamentoso irregular	Filamentoso	Filamentoso ligeramente ondulado	Filamentoso

Tabla 2. ID asignado a los aislamientos de *Fusarium* obtenidos de plántulas de pino cultivadas en viveros forestales del estado de Durango.

Aislado	Municipio	Especie de pino donde se obtuvo el aislamiento	ID muestra
1	Durango	<i>Pinus engelmannii</i>	FPe 1
2	Durango	<i>Pinus engelmannii</i>	FPe 2
3	Durango	<i>Pinus engelmannii</i>	FPe 3
4	Santiago Papasquiario	<i>Pinus durangensis</i>	FPd 1
5	Santiago Papasquiario	<i>Pinus arizonica</i>	FPa 1
6	Santiago Papasquiario	<i>Pinus arizonica</i>	Fpa 2
7	Santiago Papasquiario	<i>Pinus cooperi</i>	FPc 1

Al realizar las observaciones microscópicas de los aislamientos de *Fusarium* desarrollados en diferentes medios de cultivo se encontró lo siguiente (Figura 3):

En SNA (Tabla 3), la conidiogénesis fue de forma general del tipo enteroblástica fialídica, produciendo monofiálides y polifiálides, los microconidios formados fueron de forma ovoide sin septos (Tabla 4), producidos en falsas cabezas. Los aislamientos FPe1, FPe3 y FPd1 desarrollaron algunas hifas enrolladas que no presentaron los otros aislamientos.

En PDA la conidiogénesis fue similar a la producida en SNA, la diferencia fue que en PDA se pueden formar clamidosporas terminales e intercalares como las que se formaron en los aislamientos FPe2, FPa1, FPa2 y FPc1 y no se formaron en el resto de los aislamientos.

Al desarrollar en medio de cultivo CLA, los aislamientos FPa1, FPa2 y FPc1, produjeron esporodoquios de color naranja sobre la superficie y los bordes de la hoja de clavel. Se realizó el montaje de estos sobre portaobjetos cóncavo y al observar en microscopio se visualizaron macroconidios fusiformes (Tabla 5).

Tabla 3. Características microscópicas distintivas de los aislamientos obtenidos al crecer en tres medios de cultivo en condiciones de laboratorio.

Estructuras desarrolladas en medios de cultivo	FPe 1	FPe 2	FPe 3	FPd1	FPa1	FPa2	FPc1
Hifas enrolladas en SNA*	x		x	x			
Formación de esporodoquios en CLA**					x	x	x
Clamidosporas en PDA***		x			x	x	x

* Agar Spezieller Nährstoffarmer, **Agar hoja de clavel, ***Agar papa dextrosa

Tabla 4. Características microscópicas de los microconidios producidos por los aislamientos al crecer en agar SNA.

Microconidios en SNA*	FPe 1	FPe 2	FPe 3	FPd1	FPa1	FPa2	FPc1
Largo μm	6.79 \pm 0.11	7.31 \pm 0.11	5.72 \pm 0.12	6.38 \pm 0.12	6.82 \pm 0.1 3	6.62 \pm 0.1 1	6.19 \pm 0.0 9
Ancho μm	2.25 \pm 0.02	2.31 \pm 0.03	2.06 \pm 0.04	1.93 \pm 0.03	2.11 \pm 0.0 4	2.17 \pm 0.0 3	2.1 \pm 0.03
Forma	ovoide	ovoide	ovoide	ovoide	ovoide	ovoide	ovoide

* Agar Spezieller Nährstoffarmer

Tabla 5. Características microscópicas de los macroconidios producidos en los esporodoquios al crecer en agar CLA.

Características	FPa1	FPa2	FPc1
Forma de la célula apical	curvada	curvada	curvada
Forma de la célula base	pie	pie	pie
Largo μm	38.98 \pm 4.90	36.27 \pm 3.87	23.63 \pm 2.31
Ancho μm	3.29 \pm 0.37	3.31 \pm 0.35	2.53 \pm 0.26
Curvatura dorsiventral	moderada	moderada	moderada
Número de septos	3 y 4	3 y 4	2 y 3

*Agar hoja de clavel

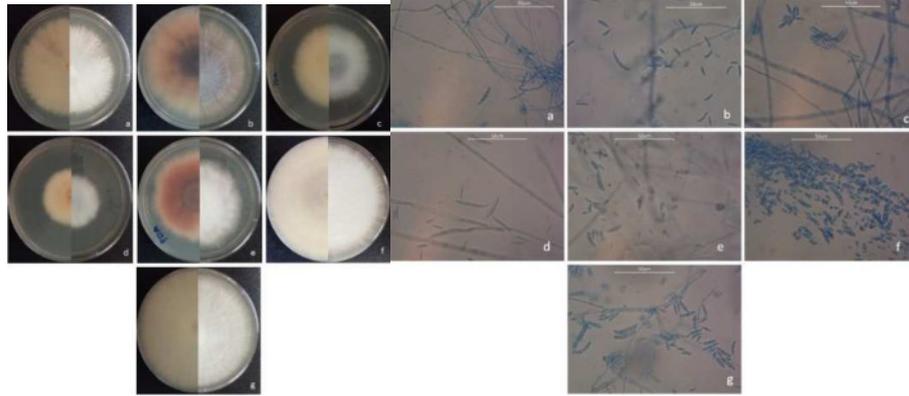


Figura 3. Características macroscópicas y microscópicas de los hongos aislados de muestras de pino con síntomas de damping-off.

Las pruebas de patogenicidad preliminar llevadas a cabo en el laboratorio (Figura 4), revelaron que los siete aislamientos de *Fusarium* son patógenos. La germinación comenzó el día 7 dds, y los daños se presentaron del 9 al día 16 dds. En promedio el aislamiento PE1 redujo la germinación un 27.7 %, el aislamiento PE2 un 22.2%, el aislamiento PE3 redujo la germinación 44.4 %, FPC1 redujo 19.4%, FPA redujo 16.6 %, FPC2 y FPD redujeron 24.9 %. En el 98 % de las semillas no germinadas se encontró al patógeno sobre la semilla. Las plántulas germinadas fueron colonizadas por el hongo y la incidencia de damping-off fue de 92 al 100 % de daño en la plántula. Con ello se confirma la patogenicidad de los aislados.



Figura 4. Prueba preliminar de patogenicidad en laboratorio.

Para la obtención de los extractos para evaluar la efectividad biológica contra los aislamientos de *Fusarium* obtenidos, se procedió con la extracción metanólica, se procesaron muestras con un peso superior a 200 g. La hoja de *Dodonaea viscosa* fue la que presentó un rendimiento superior al 15 %, el resto de los ejemplares botánicos presentó rendimientos menores al 10 %. El menor rendimiento se obtuvo en el bagazo de *A. durangensis* (Tabla 6).

Tabla 6. Rendimiento de extractos obtenidos por maceración metanólica de diferentes ejemplares botánicos utilizados en esta investigación.

Ejemplar botánico	Muestra (g)	Extracto obtenido (g)	Rendimiento (%)
Hoja de <i>Xanthium strumarium</i>	229	18	7.86
Tallo y semilla <i>Xanthium strumarium</i>	213.2	17.2	8.07
Hoja de <i>Dodonaea viscosa</i>	207.5	34.8	16.77
Hoja de <i>Agave durangensis</i>	263	22.6	8.59
Bagazo de <i>Agave durangensis</i>	219	7.9	3.61

La actividad inhibitoria a las 168 horas de incubación de los extractos obtenidos mediante maceración metanólica, quedó demostrada con la prueba en pozo, y fue evidenciada por los halos de inhibición obtenidos de la planta *Xanthium strumarium*, que fue comprendida de los 11 mm y hasta 24.5 mm. El resto de los extractos, al igual que en el blanco de solvente, no presentaron inhibición (Tabla 7 y 8). La misma tendencia se presentó para los diferentes aislamientos de *Fusarium* aislados de plántulas de pino. Debido a ello, se decidió continuar con el extracto de *X. strumarium* para realizar las pruebas de CMF y CMI (Figura 5).

Tabla 7. Resultados de actividad en la prueba de inhibición en pozo (mm) en aislamientos de *Fusarium* obtenidos de *Pinus engelmannii* y *Pinus durangensis*.

Extracto	FPe 1	FPe 2	FPe 3	FPd1
Hoja <i>X. strumarium</i>	14.17±0.7 a	13.5±0.6 a	18.83±1.5 a	17.17±1.0 a
Tallo <i>X. strumarium</i>	12.5±0.2 a	11.00±0.0 a	16.17±1.1a	13.00±0.4 a
<i>D. viscosa</i>	0.00±0.0 b	0.00±0.0 b	0.00±0.0 b	0.00±0.0 b
Hoja <i>A. durangensis</i>	0.00±0.0 b	0.00±0.0 b	0.00±0.0 b	0.00±0.00 b
Bagazo <i>A. durangensis</i>	0.00±0.0 b	0.00±0.0 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
Blanco	0.00±0.0 b	0.00±0.0 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b

Promedios con letras diferentes, son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$

Tabla 8. Resultados de actividad en la prueba de inhibición en pozo (mm) en aislamientos de *Fusarium* obtenidos de *Pinus arizonica* y *Pinus cooperi*.

Extracto	FPa1	FPa2	FPc1
Hoja <i>X. strumarium</i>	24.50±0.2 a	15.17±0.7 a	22.50±0.4 a
Tallo <i>X. strumarium</i>	21.17±1.6 a	15.25±1.4 a	21.33±1.2 a
<i>D. viscosa</i>	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
Hoja <i>A. durangensis</i>	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
Bagazo <i>A. durangensis</i>	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b
Blanco	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b	0.00±0.00 b

Promedios con letras diferentes, son estadísticamente diferentes ($P < 0.05$) con un nivel de significancia de $\alpha = 0.05$



Figura 5. Resultado de la prueba de inhibición en pozo de los extractos evaluados.

La hoja de *Xanthium strumarium* presentó inhibición del crecimiento a partir de 14 mg mL⁻¹. El aislamiento sobre el cual se presentó la dosis inhibitoria y fungicida más baja fue FPe3, y los que presentaron dosis inhibitorias más altas fue FPe1, FPe2, y FPa. Por su parte, el extracto metanólico obtenido del tallo y la semilla tuvieron dosis inhibitorias más altas que el extracto de la hoja (Tabla 9). El aislamiento que fue inhibido con la dosis más baja fue FPe3, y las dosis más altas fueron para FPa2 y FPc1 (Figura 6 y 7).

Tabla 9. Resultados de la prueba de CMI y CMF de los extractos probados contra los aislamientos de *Fusarium*

Aislamiento	Hoja <i>X. strumarium</i>		Tallo/semilla <i>X. strumarium</i>	
	CMI mg mL ⁻¹	CMF mg mL ⁻¹	CMI mg mL ⁻¹	CMF mg mL ⁻¹
FPe 1	≥25	30	≥30	35
FPe 2	≥25	30	≥35	40
FPe 3	≥14	15	≥20	25
FPd1	≥20	25	≥25	30
FPa1	≥25	30	≥30	35
FPa2	≥20	25	≥35	40
FPc1	≥15	20	≥35	40



Figura 6. Prueba de CMF y CMI en placas de microdilución de 96 pozos.

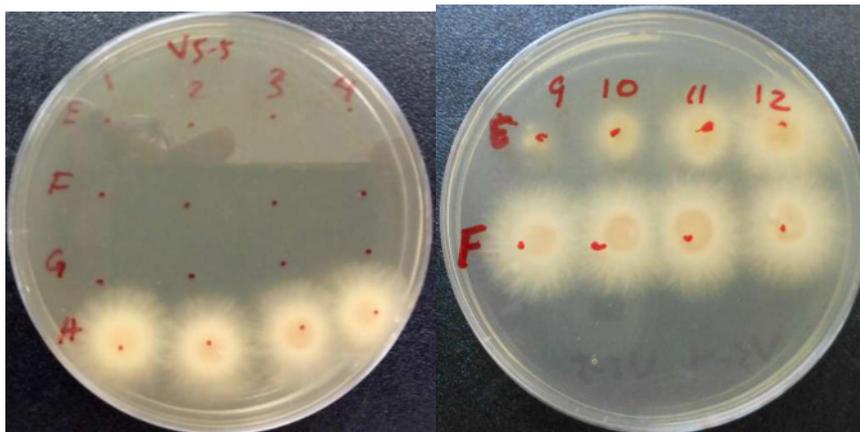


Figura 7. Resultados de CMF del extracto de hoja de *Xanthium strumarium*.

Las pruebas fitoquímicas revelaron diferencias entre los extractos en lo referente a la presencia de esteroides, quinonas y carbohidratos (antrona) (Tabla 10).

Tabla 10. Resultados de las pruebas fitoquímicas realizadas sobre los extractos que presentaron inhibición en los aislamientos de *Fusarium* aislados de plántulas de pino.

Prueba fito-química	Hoja de <i>X. strumarium</i>	Tallo y semilla de <i>X. strumarium</i>
Cumarina	-	-
Sequiterpenolactonas	-	-
Esteroles	+	-
Quinonas	-	+
Saponinas	-	-
Antrona	+	-
Flavonoides	+	+
Taninos	+	+

Con los resultados anteriormente obtenidos, se optó por realizar la separación cromatográfica del extracto que obtuvo las dosis mínimas inhibitorias y fungicidas menores, el cual fue el extracto metanólico de la hoja de *Xanthium strumarium*. Al eluir la columna, se obtuvieron 220 fracciones de 50 mL. Se evaluaron mediante cromatografía en capa fina (TLC), para unir las fracciones similares (Figura 8), obteniendo 18 fracciones las cuales se almacenaron en viales ambar a 4°C. El resultado de la bioautografía en cromatofolios de 25 x 75 mm presentó inhibición solo en la fracción 1 (Tabla 11). A éstas se realizó la bioautografía en el cromatofolio de 100 x 150 mm para determinar las bandas responsables de la inhibición (Figura 9), y realizar su semipurificación mediante el raspado de la banda activa, y para realizar las determinaciones fitoquímicas del componente responsable de la inhibición (Tabla 12) donde reveló positivo en cuatro componentes fitoquímicos.

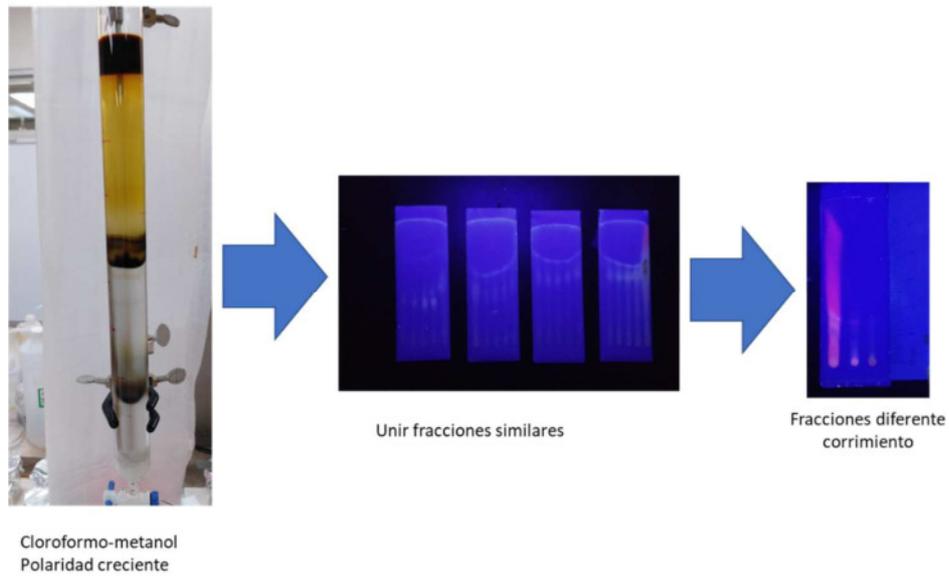


Figura 8. Proceso de cromatografía en columna y cromatografía en capa fina (TLC)

Tabla 11. Fracciones obtenidas y su inhibición contra cepas del género *Fusarium* aisladas de pino.

Proporción solvente		Fracciones colectadas	Fracciones resultantes	ID fracción	Actividad inhibitoria
Cloroformo	Metanol				
9.5	0.5	20	2	1	+
				2	-
9	1	20	1	3	-
8.5	1.5	20			
8	2	20	1	4	-
7.5	2.5	20	1	5	-
7	3	20	1	6	-
6.5	3.5	20	1	7	-
6	4	20	1	8	-
5.5	4.5	20	1	9	-
5	5	20	2	10	-
				11	-
0	10	20	1	12	-

Tabla 12. Resultados de las pruebas fitoquímicas realizadas a la subfracción activa del extracto que presentó inhibición en el aislamiento de *Fusarium* aislados de plántulas de pino.

Prueba fitoquímica	Subfracción activa
Cumarina	+
Sequiterpenolactonas	+
Esteroles	
Quinonas	+
Saponinas	-
Antrona	bajo contenido de azúcares
Flavonoides	-
Taninos	-
alcaloides	-

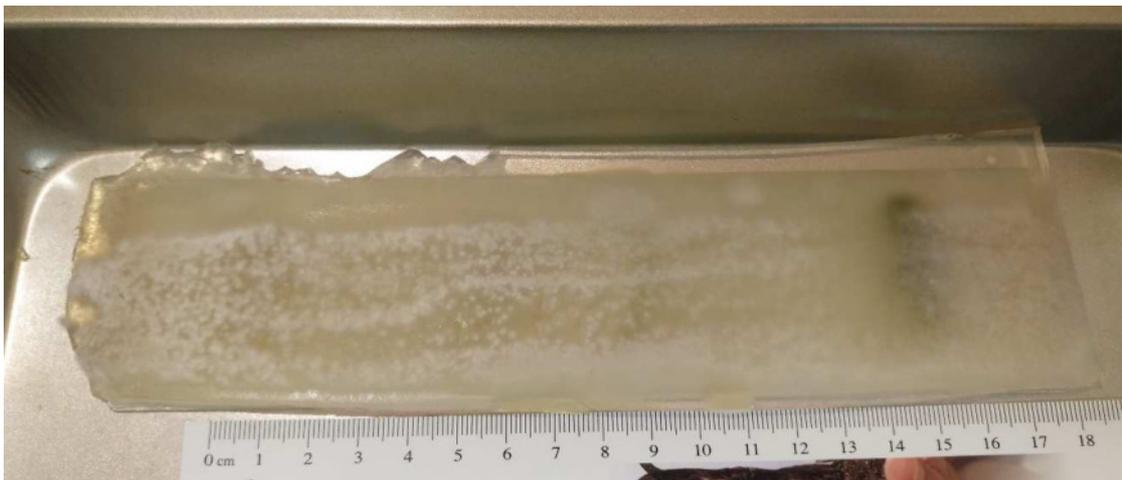


Figura 9. Zona de inhibición en la prueba de bioautografía de la fracción activa sobre FPe1.

En la prueba de evaluación de la patogenicidad y evaluación del extracto en vivero, la germinación comenzó 11 días después de la siembra, siendo el día 14 dds cuando se presentó el pico germinativo.

En la prueba de patogenicidad, el comienzo de germinación ocurrió 11 dds y el pico de germinación se presentó entre 12 y 14 dds. En el caso del tratamiento del control positivo y del extracto las semillas presentaron baja germinación, así como bajo índice y velocidad de germinación. En el tratamiento del extracto, posiblemente pudo ocurrir por deshidratación del embrión debida al solvente en el cual se resuspendió el extracto

(metanol), y en el caso del control positivo porque el embrión no logró hidratarse por la costra de fungicida formada sobre la testa de la semilla. Es por ello que para los análisis de daños y supervivencia no se tomaron en cuenta lo que sugiere en próximos experimentos evaluar que el extracto que se aplique sobre semilla, así como los fungicidas se prueben de manera preliminar para determinar si producen daño o no en la semilla lo cual se puede realizar con una prueba de tinción de embriones con sales de tetrazolio para determinar viabilidad, y la prueba de índigo carmín que tiñe embriones muertos.

Al tomar solo en cuenta el tratamiento testigo y el inoculado, respecto al porcentaje de germinación sólo se presentó diferencia en un aislamiento inoculado obtenido de *Pinus engelmannii* (FPe3) el cual disminuyó en 27 % la germinación (Tabla 13) lo cual indica que este aislamiento fue el único que provocó daño preemergente que se confirmó con los resultados obtenidos en el análisis de índice germinativo (Tabla 14) y velocidad de germinación (Tabla 15), donde también sólo hubo diferencias significativas para este aislamiento. El resto de los aislamientos no presentaron diferencias respecto al testigo en las variables de germinación por lo que se confirma que no provocaron daño preemergente.

Tabla 13. Porcentaje de germinación de los tratamientos evaluados en la prueba de inhibición en invernadero.

Tratamiento	FPe 1	FPe 2	FPe 3	FPd1	FPa1	FPa2	FPc1
T1 Testigo	84.44±2.08 a	84.44±3.69 a	90.00±3.24 a	91.11±2.22 a	34.44±5.93 a	45.56±4.08 a	95.83±2.66 a
T2 Control -	70.00±6.24 a	80.00±3.77 a	63.33±7.16 bc	90.00±3.24 a	38.89±3.93 a	40.00±5.67 a	95.55±2.08 a
T3 Control +	72.22±3.93 a	80±5.15 a	73.33±2.72 ab	41.11±7.97 b	24.45±4.16 ab	43.34±5.39 a	75.56±5.72 ab
T4 Extracto	8.89±1.36 b	13.33±2.83 b	13.33±2.83 c	23.33±6.43 b	6.67±2.72 b	4.45±3.24 b	41.11±4.84 b

Promedios con letras diferentes, son estadísticamente diferentes ($P<0.05$) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$

Tabla 14. Índice de germinación de los tratamientos evaluados en la prueba de inhibición en invernadero.

Tratamiento	FPe 1	FPe 2	FPe 3	FPd1	FPa1	FPa2	FPc1
T1 Testigo	11.81±0.31 a	12.72±0.75 a	11.33±0.58 a	12.93±0.64 a	4.90±0.96a	6.93±0.85 a	12.93±0.51 a
T2 Control -	10.22±0.90 a	11.27±0.81a	8.22±0.79 ab	13.67±0.48 a	5.41±0.48 a	6.05±0.86 a	12.20±0.23 a
T3 Control +	11.81±1.25a	11.49±0.74 a	11.39±0.69 a	9.37±1.77 ab	4.07±0.82 ab	7.33±0.95 a	12.22±0.80 a
T4 Extracto	1.42±0.25 b	1.78±0.40 b	1.97±0.42 b	4.80±1.40 a	1.62±0.64 b	0.80±0.60 b	7.08±0.72 b

Promedios con letras diferentes, son estadísticamente diferentes ($P<0.05$) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$

Tabla 15. Velocidad de germinación de los tratamientos evaluados en la prueba de inhibición en invernadero.

Tratamiento	FPe 1	FPe 2	FPe 3	FPd1	FPa1	FPa2	FPc1
T1 Testigo	0.88±0.04 a	0.64±0.10 a	0.98±0.06 a	0.90±0.05 a	0.34±0.06 ab	0.38±0.02 a	0.83±0.17 ab
T2 Control -	0.63± 0.09 ab	0.75±0.08 a	0.69±0.10 a	0.66±0.03 a	0.41±0.05 a	0.40±0.06 a	1.10±0.05 a
T3 Control +	0.51±0.08 bc	0.75±0.05 a	0.58±0.06 a	0.18±0.03 b	0.22±0.03 bc	0.35±0.07 a	0.50±0.06 bc
T4 Extracto	0.10±0.01 c	0.16±0.03 b	0.16±0.04 b	0.17±0.04 b	0.04±0.02 c	0.04±0.03 b	0.30±0.05 c

Promedios con letras diferentes, son estadísticamente diferentes ($P<0.05$) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$

El día 13 dds (semana 2), comenzaron a aparecer las plantas con síntomas de damping-off postemergente, El daño en las plantas se presentó con un aspecto postrado, con la afectación en el cuello de la plántula (Figura 10). Estos daños se presentaron en el periodo comprendido entre los 13 dds y 40 dds (semana 2 a la semana 7). En ese periodo el daño a la planta fue inmediato, es decir un día, la planta se presentaba sana y al día siguiente postrada. A partir de la semana 8, la planta con inicio de síntomas tardó aproximadamente 5 días en colapsar. De estas plantas donde se presentó daño, se pudieron recuperar colonias de *Fusarium* con la misma morfología del aislamiento inoculado, con lo cual afirmaron los postulados de Koch. Los aislamientos que provocaron menor daño en las plántulas de pino fueron FPe1, FPe2 y FPc1. Los aislamientos que presentaron mayor daño en orden ascendente fueron: FPa1, FPd1, FPa2, y FPe3 (Tabla 16). El aislamiento con mayor daño fue FPe3 que acumuló 50 % de decesos de plántulas 20 dds, a los 28 dds presentó 80 % de mortalidad y el 100% de mortalidad sucedió a los 82 dds. El aislamiento FPa2, acumuló 50 % de mortalidad a los 36 dds y 61 % de daños 139 dds. El aislamiento FPd1 acumuló 50 % de mortalidad a los 66 dds y 60 % de daño 174 dds,. Por su parte FPa1 el máximo daño que presentó fue de 32 % a los 30 dds.

Tabla 16. Resultados del porcentaje de daño 180 días después de la siembra

Tratamiento	FPe 1	FPe 2	FPe 3	FPd1	FPa1	FPa2	FPc1
T1 Testigo	0.0±0.00	1.3±1.3	0.0±0.0 a	0.0±0.00a	2.2±2.2 a	2.2± 2.2 a	1.6±1.6
T2 Control -	4.3±1.80	1.2±1.2	100±0.0 b	60.7±2.7 b	32.2±10.4 b	61.0±11.7 b	5.9±2.0

Promedios con letras diferentes, son estadísticamente diferentes (P<0.05) con un nivel de significancia de $\alpha=0.05$



Figura 10. Experimento en vivero. Izquierda: Unidades experimentales, Derecha: Plántula de *Pinus engelmannii* con daño de damping-off

El resultado de la prueba de supervivencia de Kaplan-Meier (Tabla 17), confirma que los aislamientos obtenidos de *Pinus engelmannii*: FPe1, FPe2, y el obtenido de *P. cooperi* FPC1, no presentaron diferencias respecto al testigo, por lo que presentaron baja virulencia. Por otro lado, los que presentaron diferencias altamente significativas fueron el aislamiento FPe3, que fue el más virulento seguido por los aislamientos obtenidos de *P. arizonnica* FPa1 y FPa2, seguidos de FPd1 (Figura 11).

Tabla 17. Resultados de la prueba de Kaplan-Meier

Función de supervivencia							
Estadístico	FPe 1	FPe 2	FPe 3	FPd1	FPa1	FPa2	FPc1
<i>log rank test</i>	3.689	0.001	164.29	72.437	9.168	28.472	1.871
P	0.054778 ns	0.980327 ns	0 **	0 **	0.002463 **	0 **	0.171381 ns

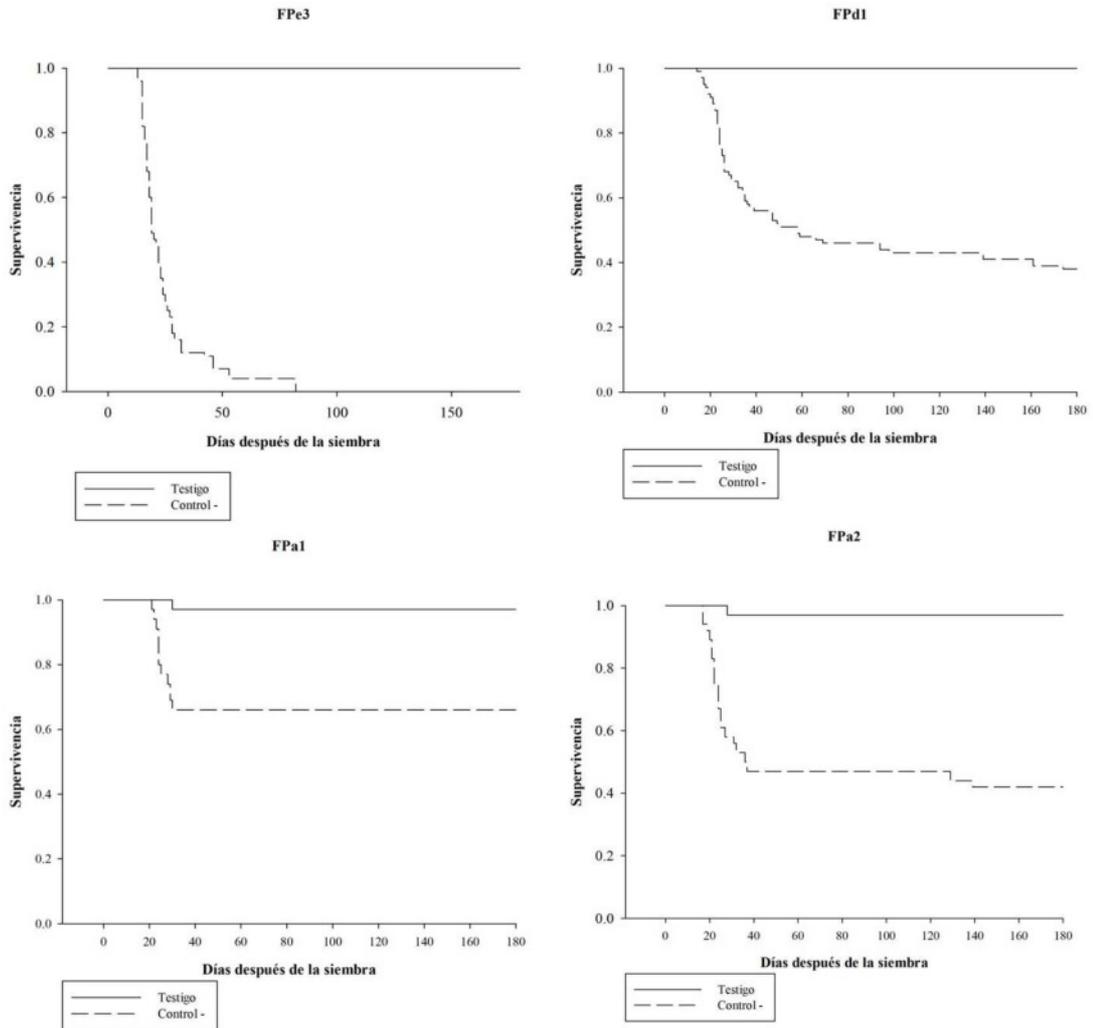


Figura 11. Curvas de supervivencia de Kaplan-Meier de los aislamientos que provocaron daño significativo por damping-off en plántulas de pino.

El modelo epidemiológico Gompertz fue el que presentó mejor ajuste para el aislamiento FPe3 y FPd1, representado por la ecuación $\text{daño} = \alpha * \exp(-\beta * \exp(-\gamma * \text{DDS}))$,

en este los parámetros realizaron una contribución significativa ($p < 0.05$) y su estimación se observa en la Tabla 18. Por su parte, los aislamientos obtenidos de *Pinus arizonica*, se ajustaron con el modelo monomolecular representado por la ecuación $\alpha \cdot (1 - \beta \cdot \exp(-\gamma \cdot DDS))$ y sus parámetros, así como su significancia de muestra en la Tabla 18.

Tabla 18. Resultados de los estimadores con mejor ajuste para los modelos epidemiológicos que provocaron damping-off en pántulas de

Aislamiento	Modelo epidemiológico	Parámetro estimado					
		Alfa	p-valor	Beta	p-valor	Gamma	p-valor
FPe3	Gompertz	98.36	<0.0001	15.36	<0.0001	0.15	<0.0001
FPd1	Gompertz	55.78	<0.0001	7.27	<0.0001	0.08	<0.0001
FPa1	Monomolecular	62.55	0.0489	0.8	<0.0001	0.0043	0.278
FPa2	Monomolecular	99.93	<0.0001	0.81	<0.0001	0.01	0.0148

DISCUSIÓN

Los hallazgos de la presente investigación son similares a los encontrados por (Menkis et al. 2006) quienes encontraron únicamente hongos del género *Fusarium* colonizando raíces de *Pinus silvestris* y *Picea abies* y no hallaron hongos de los géneros *Rhizoctonia*, *Phytium* y *Phytophthora*.

La morfología microscópica de algunos aislamientos encontrados en la presente, tienen características similares a las encontradas en *F. oxysporum* del estudio de (Robles Yerena et al. 2016) cultivado en CLA que produjeron macroconidios y microconidios en monofialides y estructuras conidiogénicas en forma de falsas cabezas. Por otro lado, algunos de los hongos que se aislaron en ésta investigación tienen similitud a los hallados por (García-Díaz et al. 2019, García-Díaz et al. 2017) en *F. circinatum*, coincidiendo en las características morfológicas y morfométricas así como la presencia de hifas enrolladas. Los dos autores mencionados anteriormente realizaron sus investigaciones en México en años recientes y es importante referirlos por su contribución en la identificación de especies del género *Fusarium* que producen enfermedades en plántulas de pino cultivadas en condiciones protegidas. En el estudio de Pérez-Sierra, encontraron dos grupos de hongos que al crecer en PDA, las principales características macroscópicas sobresalientes, fueron el borde de la colonia el cual presentó el margen completo, el aspecto del micelio de forma algodonoso, el color del micelio en tonos blanquecinos con tinte en la parte central de la colonia, un grupo de color salmón y el otro color violeta a púrpura, y de forma microscópica, conidios ovalados sin septos, de forma esporádica con 1 septo, formadas en falsas cabezas, conidióforos ramificados en forma de monofialides y polifialides, clamidosporas ausentes, el primer grupo con hifas hialinas enrolladas con las características de *F. circinatum* y el segundo grupo hifas estériles pero no enrolladas. (Pérez-Sierra et al. 2007).

En los resultados de las pruebas de inhibición con los extractos utilizados en esta investigación, se pueden contrastar con los resultados obtenidos por de-Rodríguez donde los compuestos más afines al solvente polar como los polifenoles pueden presentar mayor actividad contra los fitopatógenos, lo cual no es el caso de ésta investigación donde los

polifenoles están en más baja proporción, en cambio en este estudio, las sustancias con posible respuesta antifúngica son los terpenos que se extraen en mayor cantidad con solventes polares (De Rodríguez et al. 2011).

En un experimento realizado con plantas del Himalaya, extracto de hojas de *Agave americana* obtenido por maceración en diclorometano, se realizó una prueba de bioautografía directa contra *Alternaria alternata* y *Curvularia lunata*: se aplicaron 20 µl de soluciones correspondientes a 1000 µg de extractos brutos a placas de TLC de gel de sílice y desarrolladas con cloroformo-metanol (1: 9, v / v), y secado para la eliminación completa de disolventes. Sobre la superficie se dispersó inóculo fúngico y se incubó y no se presentó inhibición en el caso de *A. americana* (Guleria and Kumar 2006).

El extracto de *A. durangensis* y *D. viscosa* posiblemente presentó una condición muy parecida a la que menciona de-Rodríguez donde el extracto de *Y. carnerosana* obtuvieron un efecto contrario a la inhibición, es decir, se comportaron como promotores de la esporulación del hongo(De Rodríguez et al. 2011).

Plantas de *Agave americana* colectadas en Cambodia y en extracción por maceración en metanol por el método de difusión en discos de 6 mm, y aplicados a una dosis 200 y 400 µL por disco obtuvieron una inhibición aproximada entre 11 y 14 mm de diámetro para las dos concentraciones contra *C. albicans*. La CMI la determinaron mediante la técnica propuesta por el CLSI., y la MIC fue de 250 µg ml⁻¹ y la CMF fue de 500 µg mL⁻¹. Los autores mencionan que los compuestos responsables de la inhibición pueden ser las saponinas esteroidales (Chea et al. 2007).

En un estudio llevado a cabo en Nuevo León, México, se colectaron plantas de *A. aspérrima* y *A. striata*, se dividieron en hoja, raíz, escapo floral y flores y se obtuvieron extractos por maceración acuosa, metanol y etanol. Los evaluaron contra *Aspergillus flavus* y *A. parasiticus* mediante la técnica de difusión en pozo y la CMI la determinaron mediante macrodilución. Las partes más activas fueron la flor y el escapo. Los extractos metanólicos, etanólicos y acuosos de raíces y hojas no ejercieron ninguna acción inhibidora detectable sobre las cepas fúngicas. El promedio de inhibición osciló entre 0,9 y 1,5 cm del extracto de flor y entre 2,5 y 3,1 cm del extracto de escapo. Las flores de *A. aspérrima* exhibieron los valores de CMI más bajos con 0.5-1.0 mg mL⁻¹ contra las cepas

de *A. flavus* y 1.0 mg mL^{-1} contra las cepas de *A. parasiticus*, los extractos de flores de *A. striata* fueron menos activos en un rango de 1.0 a 2.0 mg mL^{-1} para todas las cepas de hongos. Los extractos de escapo de ambas plantas fueron los menos efectivos, con un rango de 19 a 30 mg mL^{-1} contra cepas de *A. flavus* y de 22 a 25 mg mL^{-1} contra cepas de *A. parasiticus* (Sánchez et al. 2005).

En un estudio realizado con *Agave lechuguilla* en México, obtuvieron extractos por infusión en agua y con emulsiones de lanolina y manteca de cacao con aceite mineral, extrajeron polifenoles totales y probaron esa fracción a dosis de 500 , 1000 , 2000 , 3000 y 4000 ppm y evaluaron su respuesta sobre *Rhizoctonia solani* mediante la técnica del medio de cultivo envenenado. El resultado fue una inhibición del crecimiento menor del 30% . En otras plantas evaluadas como *L. tridentata* y *F. cernua* encontraron inhibición dependiente de la dosis, atribuidas a los taninos (Castillo et al. 2010).

En otro estudio de India, hojas y corteza de *D. viscosa*, fueron sometidas a extracción con maceración en eter de petróleo, cloroformo, metanol y también por infusión en agua a 60° C . Los evaluaron contra *Fusarium oxysporum*, *F. oxysporum* f. sp. conglutinans, *Curvularia lunata* y *Rhizoctonia solani* mediante la técnica de difusión en pozo, según la NCCLS 1997. La CMI fue determinada por macrodilución en caldo PDA. Solamente el extracto metanólico de la corteza de *D. viscosa* presentó una débil inhibición contra *C. lunata* (Singha et al. 2011).

En Etiopia hojas fueron sometidas a extracción con metanol. El método para su evaluación como inhibitorio se evaluó mediante la técnica de difusión en disco Kirby-Bauer, contra *Aspergillus fumigatus*, y *Trichophyton rubrum* sobre los cuales no presentó actividad (Getie et al. 2003).

En India, obtuvieron extractos acuosos de hojas y flores de *D. viscosa*. Lo evaluaron contra *Aspergillus flavus*, *A. fumigatus* y *A. niger* por la prueba de difusión en pozo. No presentaron inhibición (Srinivasan et al. 2001).

Lawson en 2020 evaluaron los aceites esenciales de asteráceas obtenidos por hidrodestilación de la parte aérea contra hongos (método de microdilución en caldo usando anfotericina B como control positivo y RPMI como control negativo) y

encontraron que los componentes como limoneno, myrceno (monoterpenos hidrocarbonados) mostraron una CMI contra *Asperillus niger* (ATCC 16888), de 625 ug mL⁻¹. Los compuestos obtenidos del aceite esencial de *Xanthium strumarium* fueron limoneno (48.23%), myrceno (14.31%), germacreno D (13.92%), (2E-)hexenal (5.79%) y sabineno (4.89%) que en conjunto dan un total de 87.14%. Monoterpenos hidrocarbonados 70.87, monoterpenoides oxigenados 2.22%, sesquiterpenos hidrocarbonados 16.58%, sesquiterpenoides oxigenados 1.95, diterpenoides 0.89, benzenoides 0.28%, otros, 0.29% (Lawson et al. 2020).

Iqbal et al 2020, en su estudio de pruebas fitoquímicas preliminares encontraron terpenos, fenoles, alcaloides, saponinas y flavonoides. Éstos autores encontraron que la invasión de un fitopatógeno sobre la planta de *Xanthium* incrementó la proporción de terpenos a comparación de una planta sana (Iqbal and Feng 2020).

En un estudio se encontró que en el análisis del aceite esencial obtenido por hidrodestilación en aparato tipo Clavenger durante 3 horas las hojas de *X. strumarium* presentaron terpenoides en un 98,37% de la masa total, los sesquiterpenos representaron los componentes principales en una proporción del 72,40%, incluidos los tipos oxigenados y no oxigenados (61,78% y 10,62%), monoterpenoides (25,19%), tanto de tipo no oxigenado (14,27%) como oxigenado (10,92%). Los diterpenoides representaron solo el 0,78% de la masa total, con solo dos compuestos identificados, que se caracterizaron como acetato de fitol (0,49%) y (8, 13)-kaur-16-eno (0,29 %), y el resto de componentes fueron hidrocarburos oxigenados (El-Gawad et al. 2019).

El rendimiento porcentual de extractos de hojas de *X. strumarium* en diferentes sistemas de disolventes son Hexano (7,23%), Cloroformo (20,67%), Acetona (1,241%), Metanol (6,80%), en soxhlet, el extracto de metanol era el extracto altamente activo para los fitoconstituyentes, y resultó con alcaloides, carbohidratos y compuestos fenólicos. Las proteínas y los aminoácidos, los triterpenoides de los esteroides, las grasas y el aceite fijo y las saponinas estaban ausentes en el metanol. El extracto de acetona mostró la presencia de carbohidratos y compuestos fenólicos únicamente. Los extractos de hexano y cloroformo no mostraron ningún fitoconstituyente (Kumar Deepak et al. 2016).

En las pruebas de invernadero, se presentaron resultados similares a los de (García-Díaz et al. 2017). El hongo *F. circinatum*, en *Pinus greggii* redujo 43 % la germinación, la enfermedad se desarrolló 5 semanas después de la inoculación, en el 93 % de plántulas dañadas recuperaron el hongo inoculado y a partir semillas no germinadas recuperaron 100% de esos aislamientos. (García-Díaz et al. 2019) a los 20 días después de la inoculación.

(Robles Yerena et al. 2016), al inocular *F. solani* y *F. oxysporum* en *Pinus patula* y *P. pseudostrobus*, la sintomatología se observó 15 días después de su inoculación, la incidencia final fue de 100 %. *F. oxysporum* presentó mayor virulencia en *P. patula*.

En la investigación de (Mateos et al. 2017) inocularon *F. verticillioides* y *F. oxysporum* en la siembra de *Pinus sylvestris* y *P. pinea* y encontraron que *F. oxysporum* presentó mayor índice de daño. En los resultados obtenidos por (Davydenko et al. 2018), *F. circinatum* presentó mortalidad en casi todas las plántulas de diferentes procedencias de *P. sylvestris* en el periodo de cuatro meses después de la inoculación y los daños provocados por *F. oxysporum* fueron de cerca del 64 % al día 21 después de la inoculación, por otro lado otras especies de *Fusarium*, provocaron bajo porcentaje de daño. Estos autores hacen énfasis en las primeras semanas, donde es el periodo crítico de desarrollo del patógeno de tal forma que es cuando se deben llevar a cabo los tratamientos fitosanitarios encaminados a reducir la cantidad de inóculo para frenar el desarrollo de la enfermedad, ya que si no se combate, el inóculo puede ingresar a las plantaciones forestales y provocar transmisión de cancro resinoso.

Al inocular *G. circinata* (anamorfo *F. circinatum*) sobre semillas de varias familias de *P. radiata* (Aegerter and Gordon 2006) observaron que la mortalidad fue diferente entre familias, comprendida entre 3.5 a 52 %.

Utilizar semillas libres de propágulos de hongos, es el procedimiento más seguro para prevenir la entrada de *F. circinatum* en zonas libres de la enfermedad de cancro resinoso del pino (Berbegal et al. 2015).

Respecto a la dinámica de las poblaciones de *Fusarium* en el vivero, (Ocamb et al. 2002) mencionan que puede variar, y este hongo puede ser introducido al vivero desde el almacenamiento de la semilla y por su manipulación de durante la siembra, por ello es necesario realizar pruebas de patogenicidad de los lotes de semillas para conocer el potencial de afectación de esos aislamientos y para determinar la dinámica cuando se presentan las infecciones; en su investigación, los hallazgos sugieren que propágulos de especies de hongos reportadas como patógenas de la raíz de plantas, fueron introducidas por fuentes externas y raramente se aislaron de semillas, además, el daño en las plántulas donde fueron inoculados estos hongos fue variable y esta variabilidad se presentó entre especies de *Fusarium*, debido a ello, es importante la identificación de esos patógenos para conocer la dinámica del crecimiento de esos patógenos.

El medio ambiente y factores genéticos juegan un papel importante en la resistencia que presentan diferentes especies de pino en respuesta a las infecciones por *Fusarium circinatum*, que es el más virulento de las coníferas y ensayos reportan por lo menos 60 especies susceptibles al patógeno; puede producir infección directamente por insectos y vectores o, indirectamente por viento y agua (Flores-Pacheco 2017).

En los viveros que producen plantas de forma comercial, la enfermedad es la principal preocupación en etapas tempranas del desarrollo, varias especies de *Fusarium* spp. afectan la viabilidad de las semillas y las plantas jóvenes de pino, provocando pérdidas debido a semillas no viables y debilitamiento o muerte de las plántulas, esto también disminuye la productividad de los programas de reforestación debido a las restricciones impuestas durante el establecimiento de una campaña de cuarentena, ya que plantas infectadas pueden ser asintomáticas y ser el vector del patógeno a largas distancias además de bajar el rendimiento en plantaciones, la prohibición de siembra de especies susceptibles en zonas de España y también la disminución en exportación de madera y otros productos y por otro lado aumenta el costo del seguimiento y control del patógeno (Storer et al., 1998),

Los viveros en los que las plantas presentaron infecciones por *F. circinatum* eran típicamente el primer punto de entrada de la enfermedad y todavía constituyen un reservorio para la transmisión a las plantaciones forestales (Davydenko et al. 2018).

Como ejemplo (Britz et al. 2001) proponen que *Fusarium circinatum* aislado en rodales naturales de *Pinus pátula*, y *P. greggii*, en México, pudo haber ingresado a Sudáfrica posiblemente en semillas contaminadas.

CONCLUSIONES

La enfermedad de damping-off en plántulas de pino producidas en los viveros del estado de Durango, fue provocada por hongos del género *Fusarium*, y sus características macroscópicas y microscópicas concordaron con las del complejo de especies de *Fusarium fujikuroi* y del complejo *F. oxysporum*. El extracto metanólico de *Xanthium strumarium* presentó actividad inhibitoria en hongos del género *Fusarium* aislados de plántulas de pino. La actividad fungicida del extracto metanólico de *Xanthium strumarium* sobre los hongos del género *Fusarium* se presentó a una concentración de 14 a 30 mg mL⁻¹. La cromatografía en columna y en capa fina permitieron separar la fracción del extracto metanólico de *X. strumarium* con actividad y las pruebas fitoquímicas cuantitativas revelaron presencia de sesquiterpenlactonas, cumarinas y quinona en la subfracción activa del extracto metanólico de la hoja de *X. strumarium* con actividad contra aislados de *Fusarium* obtenidos de pino. Los aislados de *Fusarium* con mayor virulencia fueron obtenidos de *Pinus engelmannii* y *P. durangensis* y se ajustaron al modelo epidemiológico Gompertz y los de menor virulencia obtenidos de *P. arizonica* se ajustaron al modelo monomolecular.

PERSPECTIVAS

En investigaciones posteriores realizar la identificación de los aislamientos fúngicos con marcadores moleculares y herramientas biotecnológicas, continuar las investigaciones para la obtención de compuestos bioactivos contra fitopatógenos, así como la elucidación de su estructura molecular mediante cromatografía de alta resolución y detección mediante métodos espectroscópicos, su mecanismos de acción biológica, además explorar prácticas agronómicas para aumentar la concentración de compuestos bioactivos de interés, así como la búsqueda de compuestos bioactivos o precursores en residuos agroindustriales.

BIBLIOGRAFÍA

- Aegerter BJ, Gordon TR. 2006. Rates of pitch canker induced seedling mortality among *Pinus radiata* families varying in levels of genetic resistance to *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*). *Forest Ecology and Management* 235:14-17.
- Alarcón BM, Sigala RJA, Lara MCR. 2010. Calidad de planta en ocho viveros forestales del Estado de Chihuahua. Publicación especial No. 2. Pages 66. Chihuahua, México: INIFAP-Sitio Experimental La Campana Madera.
- Amoussa AMO, Lagnika L, Bourjot M, Vonthron-Senecheau C, Sanni A. 2016. Triterpenoids from *Acacia ataxacantha* DC: antimicrobial and antioxidant activities. *BMC complementary and alternative medicine* 16:1-8.
- Aoudou Y, Ngoune Léopold T, Dongmo Pierre Michel J, Carl Moses M. 2012. Inhibition of fungal development in maize grains under storage condition by essential oils. *International Journal of Biosciences* 2:41-48.
- Aslam A, Naz F, Arshad M, Qureshi R, Rauf C. 2010. In vitro antifungal activity of selected medicinal plant diffusates against *Alternaria solani*, *Rhizoctonia solani* and *Macrophomina phaseolina*. *Pak. J. Bot* 42:2911-2919.
- Bahraminejad S, Amiri R, Abbasi S. 2015. Anti-fungal properties of 43 plant species against *Alternaria solani* and *Botrytis cinerea*. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 48:336-344.
- Barnett HL, Hunter BB. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. American Phytopathological Society (APS Press).
- Berbegal M, Landeras E, Sánchez D, Abad-Campos P, Pérez-Sierra A, Armengol J. 2015. Evaluation of *Pinus radiata* seed treatments to control *Fusarium circinatum*: effects on seed emergence and disease incidence. *Forest Pathology* 45:525-533.
- Bolanle OO. 2017. In vitro antifungal effects of medicinal plants extracts on the mycelia growth of *Phytophthora megakarya* causal agent of cocoa blackpod disease. *RJLBPCS* 3:29-36.

- Britz H, Couhnhho T, Gordon T, Wingfield M. 2001. Characterisation of the pitch canker fungus, *Fusarium circinatum*, from Mexico. *South African Journal of Botany* 67:609-614.
- Calderón G, Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. Comisión Nacional para el Estudio de la Biodiversidad e Instituto de Ecología, AC. México.
- Camelo M, Vera SP, Bonilla RR. 2011. Mecanismos de acción de las rizobacterias promotoras del crecimiento vegetal. *Ciencia & Tecnología Agropecuaria* 12:159-166.
- Campbell CL, Madden LV. 1990. Introduction to plant disease epidemiology. John Wiley & Sons.
- Cao S, Brodie P, Callmander M, Randrianaivo R, Razafitsalama J, Rakotobe E, Rasamison VE, TenDyke K, Shen Y, Suh EM. 2009. Antiproliferative triterpenoid saponins of *Dodonaea viscosa* from the Madagascar dry forest. *Journal of natural products* 72:1705-1707.
- Caride V. 2019. Hacia un sistema eficiente para la conservación de los bosques nativos. *REVIBEC-Revista Iberoamericana de economía ecológica*:67-83.
- Castillo-Reyes F, Hernandez-Castillo FD, Clemente-Constantino JA, Gallegos-Morales G, Rodriguez-Herrera R, Aguilar CN. 2015. In vitro antifungal activity of polyphenols-rich plant extracts against *Phytophthora cinnamomi* Rands. *African Journal of Agricultural Research* 10:4554-4560.
- Castillo F, Hernández D, Gallegos G, Mendez M, Rodríguez R, Reyes A, Aguilar CN. 2010. In vitro antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Industrial Crops and Products* 32:324-328.
- Chea A, Jonville M-C, Bun S-S, Laget M, Elias R, Duménil G, Balansard G. 2007. In vitro antimicrobial activity of plants used in Cambodian traditional medicine. *The American journal of Chinese medicine* 35:867-873.
- Cibrián T, García DSE, Alvarado RD. 2007. Damping-off o secadaera de plántulas in Cibrian T, Alvarado R, García D, eds. *Enfermedades Forestales en México/Forest*

Diseases in Mexico. Chapingo, México: CONAFOR-SEMARNAT, México; Forest Service USDA, EUA; NRCAN Forest Service, Canada; Comisión Forestal de América del Norte, COFAN, FAO.

- Cibrián TD, García DSE, Don Juan MB. 2008. Manual de identificación y manejo de plagas y enfermedades en germoplasma y planta producida en viveros. Comisión Nacional Forestal. México.
- Clinical for Laboratory Standards Institute. Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi: approved standard- second edition. Document M38-A2. Wayne, Pa: Clinical and Laboratory Standards Institute. 2008.
- CONAFOR. 2010a. Prácticas de reforestación. Manual básico. Pages 64 in Reforestación CGdCyRGd, ed. Jalisco, México: Secretaría de Recursos Naturales y Medio Ambiente.
- ---. 2010b. Prácticas de reforestación. Manual básico. Comisión Nacional Forestal Secretaría de Medio Ambiente y Recursos Naturales.
- ---. 2019a. Producción de plantas para reforestación in naturales Sdmayr, ed. Jalisco, México: Comisión Nacional Forestal Sistema Nacional de Información Ambiental y de Recursos Naturales.
- ---. 2019b. Superficie reforestada (hectáreas) in naturales Sdmayr, ed. Jalisco, México: Comisión Nacional Forestal Sistema Nacional de Información Ambiental y de Recursos Naturales.
- Damayanti M, Susheela K, Sharma G. 1996. Effect of plant extracts and systemic fungicide on the pineapple fruit-rotting fungus, *Ceratocystis paradoxa*. CYTOBIOS-CAMBRIDGE-:155-166.
- Dar GH, Beig M, Ahanger F, Ganai NA, Ahangar MA. 2011. Management of root rot caused by *Rhizoctonia solani* and *Fusarium oxysporum* in blue pine (*Pinus wallichiana*) through use of fungal antagonists. Asian J. Plant Pathol 5:62-67.

- Davydenko K, Nowakowska JA, Kaluski T, Gawlak M, Sadowska K, García JM, Diez JJ, Okorski A, Oszako T. 2018. A Comparative Study of the Pathogenicity of *Fusarium circinatum* and other *Fusarium* Species in Polish Provenances of *P. sylvestris* L. *Forests* 9:560.
- De Rodríguez DJ, García RR, Castillo FH, González CA, Galindo AS, Quintanilla JV, Zuccolotto LM. 2011. In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products* 34:960-966.
- Devkota A, Das RK. 2016. Antifungal activities and phytochemical screening of *Xanthium strumarium*. *Bio Bulletin* 2:121-127.
- Di Rienzo J, Casanoves F, Balzarini M, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C. 2017. *InfoStat Córdoba, Argentina Universidad Nacional de Córdoba.*
- Dick M, Dobbie K. 2002. Species of *Fusarium* on *Pinus radiata* in New Zealand. *New Zealand Plant Protection* 55:58-62.
- Domínguez, X. 1973. Métodos de investigación fitoquímica. Limusa. México. pp 40-43
- Dumroese RK, James RL. 2005. Root diseases in bareroot and container nurseries of the Pacific Northwest: epidemiology, management, and effects on outplanting performance. *New Forests* 30:185-202.
- El-Gawad AA, Elshamy A, El Gendy AE-N, Gaara A, Assaeed A. 2019. Volatiles profiling, allelopathic activity, and antioxidant potentiality of *Xanthium strumarium* leaves essential oil from Egypt: Evidence from chemometrics analysis. *Molecules* 24:584.
- España-Boquera ML, Champo-Jiménez O. 2016. Proceso de deforestación en el municipio de Cherán, Michoacán, México (2006-2012). *Madera y bosques* 22:141-153.
- Fajardo-Mejía MA, Morales-Osorio JG, Antonio G, León-Peláez JD. 2016. Effect of plant extracts and growth substrates on controlling damping-off in *Pinus tecunumanii* seedlings. *Cerne* 22:317-324.

- Fajardo MA, León JD, Correa GA, Morales JG. 2019. The Causal Agent of Damping-off in *Pinus patula* (Schiede) and *Pinus tecunumanii* (Schwerdtf.). *Floresta e Ambiente* 26.
- Flores-Pacheco J. 2017. Chancro resinoso del pino (*Fusarium Circinatum*) Historia, evolución, dispersión y estrategias de manejo. *Nexo Revista Científica* 30:19-42.
- Gabrekiristos E, Teshome D, Ayana G. 2020. Cultural, Morphological and Pathogenic Variability among Isolates of *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* Causing Wilt of Hot Pepper in Central Rift Valley, Ethiopia. *Plant Pathol Microbiol* 11:499.
- García-Díaz SE, Aldrete A, Alvarado-Rosales D, Cibrián-Tovar D, Méndez-Montiel JT. 2019. *Trichoderma harzianum* Rifai as a biocontrol of *Fusarium circinatum* Nirenberg & O'Donnell in seedlings of *Pinus greggii* Engelm. ex Parl. in three substrates. *Revista Chapingo Serie Ciencias Forestales* 25.
- García-Díaz SE, Aldrete A, Alvarado-Rosales D, Cibrián-Tovar D, Méndez-Montiel JT, Valdovinos-Ponce G, Equihua-Martínez A. 2017. Efecto de *Fusarium circinatum* en la germinación y crecimiento de plántulas de *Pinus greggii* en tres sustratos. *Agrociencia* 51:895-908.
- García-Díaz SE, Cibrián TD. 2009. Pudrición de raíz causada por *Fusarium oxysporum* schltldl en coníferas. *Memorias del XV Simposio Nacional de Parasitología Forestal*.
- García-Rodríguez JL, Mejía-Bojorquez JM, Moreno-Jiménez MR, López-Hernández JA. 2012. Principales plagas y enfermedades en los viveros forestales que producen plantas de pino in López-Hernández JA, Monárrez-González JC, eds. *Producción de planta Forestal del templado frío en condiciones protegidas*. Durango, México: INIFAP.
- Gelagle AA. 2018. Investigation on antibacterial and antifungal activity of some selected medicinal plants in Ethiopia. Addis Ababa University College of health science.

- Gentry HS. 2004. *Agaves of Continental North America*. University of Arizona Press.
- Getie M, Gebre-Mariam T, Rietz R, Höhne C, Huschka C, Schmidtke M, Abate A, Neubert R. 2003. Evaluation of the anti-microbial and anti-inflammatory activities of the medicinal plants *Dodonaea viscosa*, *Rumex nervosus* and *Rumex abyssinicus*. *Fitoterapia* 74:139-143.
- Ghahari S, Alinezhad H, Nematzadeh GA, Tajbakhsh M, Baharfar R. 2017. Biochemical composition, Antioxidant and biological activities of the essential oil and fruit extract of *Xanthium strumarium* Linn. From Northern Iran. *Journal of Agricultural Science and Technology* 19:1603-1616.
- Giordano G, Pérez M, Pérez RA. 2018. Ordenanzas que restringen el uso de agroquímicos: análisis de la experiencia de Villa San José, provincia de Santa Fe. *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 116:279-286.
- González-Acuña IJ, Gómez-Jaimes R, Lang-Ovalle FP, Álvarez-Bravo A, Balderas Palacios G. 2014. Hongos fitopatógenos en suelos agrícolas de la costa de Nayarit. INIFAP.
- González-Álvarez M, Moreno-Limón S, Salcedo-Martínez S, Pérez-Rodríguez E. 2015. Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de extractos de agave (*Agave scabra*, *Salm Dyck*) sobre hongos postcosecha. *Phyton* 84:427-434.
- González-Coloma A, Reina M, Fraga B, Díaz C, Cabrera R. 2007. Biocompuestos con actividad antimicrobial. Pages 30-41 in Lira-Saldivar R, ed. *Bioplaguicidas y control biológico*. Coahuila, México: Centro de Investigación en Química aplicada.
- González-Zertuche L, Orozco-Segovia A. 1996. Métodos de análisis de datos en la germinación de semillas, un ejemplo: *Manfreda brachystachya*. *Botanical Sciences*:15-30.
- González E, López E, González E, Tena F. 2004. *Plantas medicinales del estado de Durango y zonas aledañas*. CIIDIR, Durango, Instituto Politécnico Nacional. Durango, México.

- González Elizondo M, López Enriquez IL, González Elizondo MS, Tena Flores JA. 2013. Plantas medicinales del estado de Durango. Instituto Politécnico Nacional.
- González Hernández A, Pérez Miranda R, Moreno Sánchez F, Ramírez Ojeda G, Rosales Mata S, Cano Pineda A, Guerra de la Cruz V, Torres Esquivel MdC. 2015. Variabilidad de la temperatura local en bosques de coníferas por efectos de la deforestación. *Revista mexicana de ciencias forestales* 6:22-39.
- Guleria S, Kumar A. 2006. Antifungal activity of some Himalayan medicinal plants using direct bioautography. *Journal of cell and molecular Biology* 5:95-98.
- Haro-Martínez AA, Taddei-Bringas IC. 2014. Sustentabilidad y economía: la controversia de la valoración ambiental. *Economía, sociedad y territorio* 14:743-767.
- Harris JL. 1986. Modified method for fungal slide culture. *Journal of clinical microbiology* 24:460-461.
- Hashem M, Alamri S, Shathan A, Alrumman S, Moustafa M. 2016. Suppression of Phytopathogenic Fungi by Plant Extract of Some Weeds and the Possible Mode of Action. *British Microbiology Research Journal* 15:1-13.
- Hodge G, Dvorak W. 2000. Differential responses of Central American and Mexican pine species and *Pinus radiata* to infection by the pitch canker fungus. *New Forests* 19:241-258.
- INEGI. 2017. Anuario estadístico y geográfico de Durango 2017. Pages 504. Aguascalientes, México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía.
- ---. 2018. Anuario estadístico y geográfico por entidad federativa. Aguascalientes, México: Instituto Nacional de Estadística y Geografía
- Iqbal MF, Feng YL. 2020. Phytochemical screening, GC-MS profiling of invasive cocklebur (*Xanthium strumarium*)-insect-pathogen interaction and simulated volatile chemical signaling at Northeast China. *bioRxiv*.
- Kacprzak M, Asiegbu F, Daniel G, Stenlid J, Manka M, Johansson M. 2001. Resistance reaction of conifer species (European larch, Norway spruce, Scots pine) to

infection by selected necrotrophic damping-off pathogens. *European Journal of Plant Pathology* 107:191-207.

- Kaur M, Kamboj A, Rathour A, Saluja A. 2015. Isolation and Characterization of Constituents from the Leaves of *Xanthium strumarium* and their Evaluation for Antioxidant and Antimicrobial Potential. *Natural Products Chemistry & Research* 3:168.
- Khalaphallah R. 2015. Antimicrobial Activity of Some Heterocyclic Compounds and Herbal Extracts on Plant Pathogens.
- Kumar D, Chandra R, Sanghi A, Arora S, Vidyarthi S. 2016. Membrane Stabilizing Activity of *Xanthium strumarium* Leaves Extracts. *International Journal of Pharmaceutical and Clinical Research* 8:176-178.
- Kumar PV, Kala SMJ, Prakash KS. 2018. Synthesis of Gold Nanoparticles Using *Xanthium Strumarium* Leaves Extract and Their Antimicrobial Studies: A Green Approach. *Rasayan Journal of Chemistry* 11:1544-1551.
- Landis TD, Tinus RW, McDonald SE, Barnett JP. 1989. Disease and pest management.
- Lawson SK, Sharp LG, Powers CN, McFeeters RL, Satyal P, Setzer WN. 2020. Volatile Compositions and Antifungal Activities of Native American Medicinal Plants: Focus on the Asteraceae. *Plants (Basel)* 9.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. *The Fusarium laboratory manual*. John Wiley & Sons.
- Maazoun A, Hamdane A, Ben J, Marzouki M. 2019. Saponin content of *Agave americana* (L.) leaf extract and its antifungal attributes against phytopathogenic fungi. *International Journal of Agriculture and Biosciences* 8:106-111.
- MacDicken KG. 2015. Global forest resources assessment 2015: what, why and how? *Forest Ecology and Management* 352:3-8.

- Maharshi AR, Thaker VS. 2014. Antifungal Activity of Agave Species from Gujarat, India. Pages 423-430. *Microbial Diversity and Biotechnology in Food Security*, Springer.
- Marcano D. & Hasegawa M. 2002. *Fitoquímica orgánica. Segunda Edición. Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico. Universidad de Venezuela.* p 57.
- Masera OR, Ordóñez MJ, Dirzo R. 1997. Carbon emissions from Mexican forests: current situation and long-term scenarios. *Climatic change* 35:265-295.
- Mateos E, Olaizola J, Pajares JA, Pando V, in, Diez JJ. 2017. Influence of *Suillus luteus* on *Fusarium* damping-off in pine seedlings. *African Journal of Biotechnology* 16:268-273.
- Menkis A, Vasiliauskas R, Taylor A, Stenström E, Stenlid J, Finlay R. 2006. Fungi in decayed roots of conifer seedlings in forest nurseries, afforested clear-cuts and abandoned farmland. *Plant Pathology* 55:117-129.
- Moraga-Suazo P, Opazo A, Zaldúa S, González G, Sanfuentes E. 2011. Evaluation of *Trichoderma* spp. and *Clonostachys* spp. strains to control *Fusarium circinatum* in *Pinus radiata* seedlings. *Chilean journal of agricultural research* 71:412.
- Morales-Rodríguez C, Bastianelli G, Aleandri M, Chilosi G, Vannini A. 2018. Application of *Trichoderma* spp. complex and biofumigation to control damping-off of *Pinus radiata* D. Don caused by *Fusarium circinatum* Nirenberg and O'Donnell. *Forests* 9:421.
- Obanor F, Neate S, Simpfendorfer S, Sabburg R, Wilson P, Chakraborty S. 2013. *Fusarium graminearum* and *Fusarium pseudograminearum* caused the 2010 head blight epidemics in Australia. *Plant Pathology* 62:79-91.
- Ocamb C, Juzwik J, Martin F. 2002. *Fusarium* spp. and *Pinus strobus* seedlings: root disease pathogens and taxa associated with seed. *New Forests* 24:67-79.
- Parveen Z, Mazhar S, Siddique S. 2017. Chemical Composition and Antifungal Activity of Essential Oil from *Xanthium strumarium* L. Leaves. *Indian Journal of Pharmaceutical Sciences* 79.

- Peluola C, Hoesel S, Crutcher F. 2020. Chlorine gas is an effective alternative to sterilize carnation leaves for *Fusarium* spp. identification. *Journal of microbiological methods* 170:105841.
- Pérez-Sierra A, Landeras E, León M, Berbegal M, García-Jiménez J, Armengol J. 2007. Characterization of *Fusarium circinatum* from *Pinus* spp. in northern Spain. *Mycological research* 111:832-839.
- Pirzada A, Shaikh W, Usmanghani K, Mohiuddin E. 2010. Antifungal activity of *Dodonaea viscosa* Jacq extract on pathogenic fungi isolated from superficial skin infection. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences* 23.
- Prieto-Ruíz JÁ, García-Rodríguez JL, Mejía-Bojorquez JM, Huchín-Alarcón S, Aguilar-Vitela JL. 2009. Producción de planta del género *Pinus* en vivero en clima templado frío. Pages 48. Durango, México: INIFAP-Campo Experimental Valle del Guadiana.
- Prieto RJA, Sigala RJA, Pinedo LS, Garcia RJL, Madrid ARE, García PJJ, Mejía BJM. 2009. Calidad de planta en los viveros forestales del Estado de Durango. Pages 81. Durango, México: INIFAP-Campo Experimental Valle del Guadiana.
- Prospero S, Vercauteren A, Heungens K, Belbahri L, Rigling D. 2013. *Phytophthora* diversity and the population structure of *Phytophthora ramorum* in Swiss ornamental nurseries. *Plant Pathology* 62:1063-1071.
- Rajput NA, Atiq M, Javed N, Ye Y-H, Zhao Z, Syed RN, Lodhi AM, Khan B, Iqbal O, Dou D. 2018. Antimicrobial effect of chinese medicinal plant crude extracts against *Rhizoctonia solani* and *Phytophthora aphanidermatum*. *Fresen. Environ. Bull* 27:3941-3949.
- Raskin I, Ribnicky DM, Komarnytsky S, Ilic N, Poulev A, Borisjuk N, Brinker A, Moreno DA, Ripoll C, Yakoby N. 2002. Plants and human health in the twenty-first century. *TRENDS in Biotechnology* 20:522-531.

- Roberts DP, Lakshman DK, Maul JE, McKenna LF, Buyer JS, Fan B. 2014. Control of damping-off of organic and conventional cucumber with extracts from a plant-associated bacterium rivals a seed treatment pesticide. *Crop Protection* 65:86-94.
- Robles Villanueva F, Rodríguez Trejo DA, Villanueva Morales A. 2017. Calidad de planta y supervivencia en reforestación de *Pinus montezumae* Lamb. *Revista mexicana de ciencias forestales* 8:55-76.
- Robles Yerena L, Leyva Mir SG, Cruz Gómez A, Camacho Tapia M, Nieto Ángel D, Tovar Pedraza JM. 2016. *Fusarium oxysporum* Schltdl. y *Fusarium solani* (Mart.) Sacc. causantes de la marchitez de plántulas de *Pinus* spp. en vivero. *Revista mexicana de ciencias forestales* 7:25-36.
- Rosana Y, Matsuzawa T, Gonoï T, Karuniawati A. 2014. Modified slide culture method for faster and easier identification of dermatophytes. *Microbiology indonesia* 8:7-7.
- Rueda SA, Benavides SJdD, Prieto RJA, Sáenz RJT, Orozco GG. 2010. Calidad de planta producida en los viveros forestales de Jalisco y Nayarit. *Libro Técnico 2.* . Pages 167. Jalisco, México: INIFAP-Campo Experimental Centro Altos de Jalisco.
- Sáenz RJT, Villaseñor RFJ, Muñoz FHJ, Prieto RJA. 2010. Sistemas de producción de planta en viveros forestales de clima templado en Michoacán Folleto divulgativo No. 1. Pages 41. Michoacán, México: INIFAP-Campo Experimental Uruapan.
- Sánchez-González A. 2008. Una visión actual de la diversidad y distribución de los pinos de México. *Madera y bosques* 14:107-120.
- Sánchez E, Heredia N, García S. 2005. Inhibition of growth and mycotoxin production of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus* by extracts of *Agave* species. *International Journal of Food Microbiology* 98:271-279.
- Santos-Zea L, Maria Leal-Diaz A, Cortes-Ceballos E, Alejandra Gutierrez-Uribe J. 2012. *Agave* (*Agave* spp.) and its traditional products as a source of bioactive compounds. *Current Bioactive Compounds* 8:218-231.

- SE. 2016. Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016 Certificación de la Operación de Viveros Forestales. Pages 170: Comisión Nacional Forestal.
- SEMARNAT. 2020. Anuario estadístico de la producción forestal 2017. Pages 285 in suelos Dgdgyd, ed. Ciudad de México: Secretaría de medio ambiente y recursos naturales.
- Seseni L, Regnier T, Roux-Van Der Merwe M, Mogale E, Badenhorst J. 2015. Control of *Fusarium* spp. causing damping-off of pine seedlings by means of selected essential oils. *Industrial Crops and Products* 76:329-332.
- Sharifi-Rad J, Hoseini-Alfatemi SM, Sharifi-Rad M, Sharifi-Rad M, Iriti M, Sharifi-Rad M, Sharifi-Rad R, Raeisi S. 2015. Phytochemical compositions and biological activities of essential oil from *Xanthium strumarium* L. *Molecules* 20:7034-7047.
- Sigala-Rodríguez JÁ, Sarmiento-López H, Ferrel-Soto JI, Basave-Villalobos E, Rosales-Mata S, Prieto-Ruiz JÁ. 2015. Sistemas de producción de planta en los viveros forestales del estado de Durango. INIFAP.
- Singha I, Unni B, Kakoty Y, Das J, Wann S, Singh L, Kalita M. 2011. Evaluation of in vitro antifungal activity of medicinal plants against phytopathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection* 44:1033-1040.
- SNIF. 2011. Estadísticas de los programas de la Comisión Nacional Forestal. (2018; <http://www.cnf.gob.mx:8090/snif/portal/las-demas/estadisticas-de-los-programas-de-la-comision-nacional-forestal>)
- Srinivasan D, Nathan S, Suresh T, Perumalsamy PL. 2001. Antimicrobial activity of certain Indian medicinal plants used in folkloric medicine. *Journal of ethnopharmacology* 74:217-220.
- Thippeswamy S, Mohana D, Abhishek R, Manjunath K. 2013. Effect of plant extracts on inhibition of *Fusarium verticillioides* growth and its toxin fumonisin B1 production. *J Agric Sci Technol* 9:889-900.

- Toral Ibáñez M, Campos Roasio D, Fratti Bran A, Varela Ortíz R. 2000. Manual de producción de plantas forestales en contenedores. Programa de Desarrollo Forestal de Jalisco.
- Torres-Rojo JM, Moreno-Sánchez R, Mendoza-Briseño MA. 2016. Sustainable forest management in Mexico. *Current Forestry Reports* 2:93-105.
- Valles Gándara AG, Ríos Saucedo JC, Hernández JL, Ibarra Flores MJ, Espinoza Arellano JJ, Mar Tovar CL. 2011. Caracterización del sector forestal en el Estado de Durango in Ibarra Flores JM, Pajarito Ravelero A, Valles Gándara AG, Espinoza Arel Aegerter BJ, Gordon TR. 2006. Rates of pitch canker induced seedling mortality among *Pinus radiata* families varying in levels of genetic resistance to *Gibberella circinata* (anamorph *Fusarium circinatum*). *Forest Ecology and Management* 235:14-17.

RESUMEN BIOGRÁFICO

Homero Sarmiento López

Candidato para el grado de

Doctor en Ciencias con Acentuación en Química de Productos Naturales

Tesis: CONTROL DE HONGOS CAUSANTES DEL DAMPING-OFF (ENFERMEDAD DE ALMÁCIGO) IN VITRO Y EN UN VIVERO FORESTAL POR EXTRACTOS DE PLANTAS DEL ESTADO DE DURANGO

Campo de estudio: Ciencias de la vida.

Datos personales: Nacido en Durango, Durango, el 28 de enero de 1987 hijo de Rubén Sarmiento y Cecilia López Pérez.

Educación: Egresado de la Universidad Juárez del Estado de Durango de la carrera de Ingeniería en Agroquímica, grado obtenido en 2012.

Egresado de la Universidad Juárez del Estado de Durango de la Maestría en Ciencias en Conservación y Manejo de Recursos Naturales y Medio Ambiente, grado obtenido en 2013.

Experiencia profesional: Prestador de servicios profesionales en el departamento de Producción de planta en la Comisión Nacional Forestal Gerencia Estatal Durango, año 2013. Investigador del programa de plantaciones y sistemas agroforestales del INIFAP-Campo Experimental Valle del Guadiana, Durango desde 2013 a la fecha.