



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**INDUCCIÓN DEL SISTEMA DE DEFENSA EN PLANTAS
DE TOMATE POR UN EXTRACTO HIDROALCOHÓLICO
DE AJO PARA EL CONTROL DE *Fusarium oxysporum***

Por:

Ileem Aguilar Gastélum

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN DE CIENCIA DE LOS ALIMENTOS

Como requisito parcial para obtener el grado de

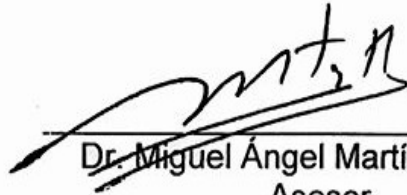
MAESTRÍA EN CIENCIAS

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Ileen Aguilar Gastélum, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Maestría en Ciencias en Agosto 2016.



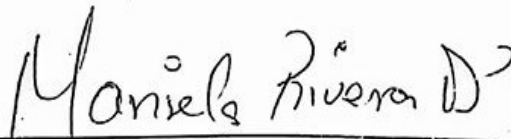
Dra. Irasema Vargas Arispuro
Director de Tesis



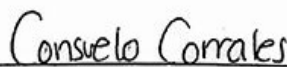
Dr. Miguel Ángel Martínez Téllez
Asesor



Dra. Maritza Arellano Gil
Asesor



Dra. Marisela Rivera Domínguez
Asesor

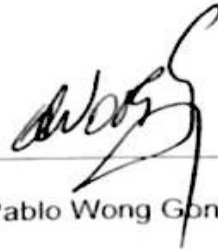


M. C. Consuelo Corrales Maldonado
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.



Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Agradezco al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por otorgarme un apoyo económico durante dos años del posgrado para la realización del trabajo de investigación.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo A. C. (CIAD) por facilitarme las instalaciones de los laboratorios de Ecología Química y Fisiología Vegetal, en donde realicé mis experimentales y análisis de los datos.

A mi directora de tesis, la Doctora Irasema por su apoyo incondicional, su tiempo y su confianza. Y a mis compañeras de laboratorio Cony, Soco y Pao.

Gracias por compartir sus conocimientos y su cariño.

A Francisco Soto, por toda su ayuda.

A mis sinodales, por su tiempo, correcciones y enseñanzas.

DEDICATORIA

Este trabajo lo dedico a mis padres, quienes han estado presentes siempre en cada logro de mi vida. Por darme su apoyo incondicional y lo mejor para formarme como persona. Cada éxito de mi vida lo dedico a cada esfuerzo que hicieron por mí, porque gracias a ello, he logrado ser lo que hasta hoy. Son mi fortaleza, los amo mucho.

A mi querido Ale, que recorrió conmigo esta etapa en donde compartimos conocimientos, experiencia y sobre todo tiempo de calidad. Gracias por tus consejos y tu apoyo incondicional. Te amo.

A las personas que participaron durante este trabajo, que le dedicaron tiempo y me ensaaron tanto. Dra Irasema, Cony, Soco, Panchito, Dr. Miguel, Sra. Silvia. Gracias por su cariño.

CONTENIDO

	Página
LISTA DE FIGURAS	viii
LISTA DE TABLAS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xiii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN	3
II.1. Cultivo del Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	3
II.2. Problemas Fitosanitarios	4
II.2.1. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i> (Fol)	4
II.2.2. <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> (Forl)	6
II.3. Mecanismos de Defensa <i>Solanum lycopersicum-Fusarium oxysporum</i>	8
II.3.1. Defensas Constitutivos	9
II.3.2. Defensas Inducidas	9
II.3.3. Metabolitos que Participan en los Mecanismos de Defensa Inducidos... ..	11
II.4. Alternativas al Uso de Agroquímicos para el Control de <i>F. oxysporum</i>	13
II.4.1. Extractos Vegetales	14
II.4.2. Aceites Esenciales	15
II.5. Ajo (<i>Allium sativum</i>) y sus Propiedades Antifúngicas	15
III. HIPÓTESIS	18
IV. OBJETIVOS	19
IV.1. General	19
IV.2. Específicos	19
V. MATERIALES Y MÉTODOS	20
V.1. Material Vegetal	20
V.2. Extracto Hidroalcohólico de Ajo (EHA)	21
V.3. Obtención e Inoculación de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> ..	21
V.4. Inoculación de las plantas	22
V.5. Tratamientos de Inducción en Plantas	22
V.6. Evaluación de la Severidad e Incidencia de la Enfermedad	23
V.7. Diseño Experimental	25
V.8. Determinación del Ácido Salicílico y Jasmónico	25
VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES	27
VI.1 Material Vegetal	27
VI.2 Extracto Hidroalcohólico de Ajo	27

CONTENIDO (Continuación)

VI.3 Obtención de Esporas de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> ..	28
VI.4. Evaluación de la Severidad e Incidencia de la Enfermedad	28
VI.5. Evaluación de la Altura de las Plantas	31
VI.6. Contenido de Clorofila	34
VI.7. Número de Hojas.....	36
VI.8. Cuantificación de Ácido Salicílico (AS).....	38
VI.9. Cuantificación de Ácido Jasmónico (AJ)	40
VII. CONCLUSIONES	43
VII. REFERENCIAS	44

LISTA DE FIGURAS

Figura		Página
1	Procedimiento realizado para inocular las plantas de tomate.	23
2	Plántulas de tomate en semilleros (45 días posteriores a la germinación)	28
3	Puntos y lesiones necróticas en los haces vasculares de los tallos en las plantas heridas + inoculadas.	30
4	Plantas de tomate testigo absoluto e inoculadas con <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i> , y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo	31
5	Porcentaje de severidad de la enfermedad de Forl en plantas de tomate, testigo e inoculadas con Forl, y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo en diferentes concentraciones. Datos normales. Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).	32
6	Evaluación de la altura de plantas de tomate, testigo e inoculadas con Forl y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo con diferentes concentraciones. Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).	34
7	Contenido de clorofila en plantas de tomate, testigo e inoculadas con Forl, y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo en diferentes concentraciones. Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).	36
8	Marchitez en plantas inoculadas con Forl.	38
9	Número de hojas en plantas de tomate, testigo e inoculadas con Forl, y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo con diferentes concentraciones Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).	39

LISTA DE FIGURAS (continuación)

Figura		Página
10	Concentración de AS en plantas de tomate, testigo e inoculadas con Forl, y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo en diferentes concentraciones. Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).	40
11	Concentración de AJ en plantas de tomate, testigo e inoculadas con Forl, y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo en diferentes concentraciones. Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).	42

LISTA DE TABLAS

Tabla		Página
1	Tratamientos de inducción	24
2	Escala para evaluar la severidad por <i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>radicis-lycopersici</i>	25

RESUMEN

En Sonora, aproximadamente 800 hectáreas de terreno agrícola están dedicadas al cultivo de tomate en agricultura protegida. Una de las principales amenazas bajo este esquema del cultivo es el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, provocando cuantiosas pérdidas económicas. Para su control se emplean métodos químicos y cultivares resistentes, que resultan inefectivos ya que los patógenos desarrollan resistencia. Existen compuestos como el ácido salicílico (AS) y el ácido jasmónico (AJ) que aplicados de forma exógena, inducen moléculas, que activan el sistema de defensa que de manera natural tienen las plantas para defenderse de las plagas. Por lo que el objetivo de este trabajo, fue evaluar el efecto de un extracto hidroalcohólico de ajo (*Allium sativum*) (EHA) con concentraciones de 0.5, 1 y 2 %, para inducir el sistema de defensa de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*) inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Se preparó un EHA a partir de ajo fresco con un contenido de $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ de alicina, cuantificada mediante HPLC; y como productos de la degradación de la alicina se cuantificó dialil trisulfuro (DATS) en $206 \mu\text{g/mL}^{-1}$, E-ajoeno en $7.6 \mu\text{g/mL}^{-1}$ y $3.2 \mu\text{g/mL}^{-1}$ de Z ajoeno. Se obtuvo una solución inoculante de Forl de (1×10^7 esporas/mL) a partir de una cepa aislada de cultivos sonorenses de tomate que presentaban sintomatología de *Fusarium oxysporum* en el invernadero Ceiba la Cuchilla, ubicado en Valle del Yaqui, Sonora. La inoculación se realizó mediante una herida en las raíces, sumergiéndola en la suspensión de esporas durante 30 minutos, inmediatamente después, se procedió al trasplante. Mediante aspersion se aplicaron tres concentraciones del EHA a los 7 y 14 días después de la inoculación y trasplante. Durante la evaluación de la severidad de la enfermedad en las plantas, pudo observarse que al día 49 después del trasplante (DDT), la severidad del daño disminuyó hasta 26.44 %, en las plantas tratadas con una concentración de 1 y 2 % de EHA, seguido del EHA al 0.5 % con 33.33 %. Coincide la reducción de la severidad con el incremento en el contenido de AS y AJ en las hojas de las plantas. Se deduce de estos resultados que el EHA elicit la producción de AS y AJ en la planta de

tomate, reduciendo los síntomas de la enfermedad provocada por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y evitar que esta se siga desarrollando.

Palabras clave: Extracto hidroalcohólico de ajo, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Solanum lycopersicum* ácido salicílico y ácido jasmónico.

ABSTRACT

In Sonora, about 800 hectares are devoted to agriculture protected tomato crop. One of the main threats to this crop is the fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, causing heavy losses. Chemical methods and resistant cultivars to control are used, but most of them are ineffective because pathogens developed resistance. Many compounds as salicylic acid (SA) and jasmonic acid (AJ) applied exogenously induced signal molecules such, which activate defense system naturally of plants to fend off pests. The main objective of this study was to evaluate the effect of hydroalcoholic garlic extract (*Allium sativum*) (EHA) to induce the defense system of tomato plants (*Solanum lycopersicum*) inoculated with *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. Fresh garlic was used to obtain hydroalcoholic garlic extract (*Allium sativum*) (EHA). Compounds in EHA were quantified by HPLC. Content of allicin was $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ and as degradation products of allicin was quantified diallyl trisulfuro (DATS) of $206 \mu\text{g/mL}^{-1}$, E-ajoene of $7.6 \mu\text{g/mL}^{-1}$ and $3.2 \mu\text{g/mL}^{-1}$ of Z ajoene. The inoculant solution of Forl was obtained of a strain isolated from tomato plants with symptoms caused by *Fusarium oxysporum* in Ceiba la Cuchilla greenhouse, located in Valle del Yaqui, Sonora. Spore concentration in the suspension was adjusted to a final concentration of 1×10^7 spores/mL. For the inoculation, the root was wounded and immersed in the *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* solution for 30 minutes, then proceeding to transplantation. After inoculated through aspersion 3 concentrations of EHA were applied at 7 and 14 days after transplant. During the evaluation of disease severity in plants it could be observed those 49 days after transplant, the disease severity was reduced at 26.66 % in treated plants with a concentration of 1 and 2 % of EHA, followed by EHA at 0.5 % with 33.33 % of severity. Coinciding reducing the severity with increasing content of AJ and AS in plant leaves. Deducing from these results that EHA elicits production of AS and AJ in the tomato plant, reducing the symptoms of the disease caused by *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* and prevent its further development.

Key word: Hydroalcoholic garlic extract, *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, *Solanum lycopersicum*, salicylic acid and jasmonic acid

I. INTRODUCCIÓN

Las plagas, los patógenos y las malezas pueden llegar a provocar pérdidas entre un 20 % a un 40 % en cultivos de todo el mundo (FAO, 2012). Para el caso del tomate (*Solanum lycopersicum*) se han reportado pérdidas de hasta un 50 % debidas principalmente al ataque de patógenos (Borboa *et al.*, 2009). Estas pérdidas económicas se presentan tanto en cultivos de invernaderos como en campos agrícolas (Secretaría de Desarrollo Agropecuario, 2011). El cultivo de tomate, constantemente está expuesto al ataque de microorganismos que causan enfermedades (Riveros-Angarita, 2010), una de las más importantes de este cultivo es ocasionada por el hongo *Fusarium oxysporum*. Este hongo provoca grandes pérdidas especialmente en variedades susceptibles cultivadas en lugares con climas cálidos, donde la mayor parte del año presentan altas temperaturas (Mandal *et al.*, 2009).

La principal herramienta para controlar la incidencia de *Fusarium oxysporum* en los cultivos de tomate, son el uso de fungicidas y de variedades genéticamente modificadas o injertos resistentes al ataque. Sin embargo, estos métodos han perdido eficacia debido a la naturaleza del suelo, la resistencia a los fungicidas desarrollada por los patógenos y la aparición de nuevas especies. Por lo que el controlar la enfermedad ocasionada por este hongo es un reto cada vez mayor. En la actualidad, la búsqueda de sustitutos a los agroquímicos de síntesis, se ha dirigido a la extracción de compuestos naturales, particularmente de origen fúngicos (Martínez, 2012), como el uso de aceites esenciales y extractos de plantas, que puedan ser empleados en la agricultura orgánica para activar las defensas de las plantas (El-Ghany *et al.*, 2015). El extracto de ajo ha mostrado eficiencia antifúngicas a nivel laboratorio y en el campo. Sin embargo, ninguno de estos trabajos ha evaluado el efecto del ajo sobre los mecanismos de defensa (Sesan *et al.*, 2015). Se ha reportado que los

mecanismos de defensa pueden ser activados mediante el uso de elicitores, estimulando la producción de señales móviles que involucran las defensas a través de la acumulación de metabolitos secundarios (Villa-Martínez *et al.*, 2014). Es por esto, que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de la aplicación de un extracto de ajo en plantas de tomate para inducir el sistema de defensas contra *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y reducir los efectos adversos de la infección.

II. ANTECEDENTES Y JUSTIFICACIÓN

II.1. Cultivo del Tomate (*Solanum lycopersicum*)

El cultivo de tomate esta muy extendido a nivel mundial (Kalia y Palansiamy, 2014). México se encuentra en el décimo lugar de productores de todo el mundo con una producción anual de 3 millones de toneladas con una superficie sembrada de 58 mil hectáreas bajo cielo abierto, de las cuales 20 mil hectáreas están bajo agricultura protegida (SAGARPA, 2015; Cruz-Ponce, 2015). En Sonora, este cultivo tiene una gran importancia, alrededor de 800 hectáreas están dedicadas a la producción de tomate bajo agricultura protegida. Este tipo de agricultura genera alrededor de 1,691 empleos fijos y más de 7,049 empleos eventuales/año (Reho, 2014).

El tomate es una planta perenne que se cultiva de manera anual. Las flores son pequeñas de color amarillo y presenta hojas compuestas, con foliolos peciolados. En las axilas de las hojas se forman yemas que producen tallos secundarios de importante desarrollo y capacidad productiva (León y Arosamena, 1980). El fruto de la planta de tomate es una baya que puede ser de forma ovalada, redonda o periforme que puede llegar a alcanzar hasta los 750 g (SAGARPA, 2010).

Este cultivo, es susceptible a diversas enfermedades ocasionadas por hongos, virus y bacterias desde la siembra hasta la cosecha. Existen cerca de 200 enfermedades del tomate, para cuyo control depende en gran medida del uso de agroquímicos, cultivares resistentes y protección a través del manejo integrado de plagas. Sin embargo, el alto costo, implicaciones ambientales y de regulación sanitaria al uso de agroquímicos, han llevado a los investigadores a buscar inductores de defensa para reducir el uso de plagicidas.

II.2. Problemas Fitosanitarios

El cultivo de tomate se puede ver afectado por problemas fitosanitarios que causan pérdidas cuantitativas en la producción. Una de las principales enfermedades asociadas a este cultivo, es ocasionada por los hongos del género *Fusarium*. Dentro de este género se encuentra *Fusarium oxysporum* que ha sido objeto de numerosos estudios, debido a que produce enfermedades en alrededor de 120 plantas de interés comercial para el hombre (Michielse y Rep, 2009). Puede ocasionar marchitez, podredumbre y chancros, además de reducir hasta un 60 % el rendimiento de cultivos hortícolas y ornamentales (Ma *et al.*, 2013). La incidencia de *Fusarium sp.* ha sido reportada en cultivos de tomate en diferentes partes del mundo, afectando el 45 % de la producción en la India, 90 y 95 % en Tunisia y Canadá, respectivamente y 100 % en Estados Unidos (McGovern, 2015).

Fusarium oxysporum son ascomicetos filamentosos y cosmopolitas, tienen un micelio bien desarrollado, septado y conidióforos característicos (Villa-Martínez *et al.*, 2014). Parasitan más de 100 especies de plantas gimnospermas y angiospermas debido a su capacidad de vencer los mecanismos de defensa de las plantas (Bosland, 2013). En los cultivos de tomate, se presentan dos formas especiales de *Fusarium oxysporum*: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol) y *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl) (Szczechura *et al.*, 2013).

II.2.1. *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Fol)

En México, en los últimos años se ha reportado una disminución gradual en la superficie dedicada al cultivo de tomate, debido a diversos factores, entre ellos, la creciente incidencia de plagas y enfermedades radiculares (Carrillo *et al.*, 2003). La más importante en la actualidad por su impacto y distribución, es el marchitamiento vascular o fusariosis ocasionada por *Fusarium oxysporum* f. sp.

lycopersici. Ésta enfermedad fue descrita por primera vez por G. E. Masee en Inglaterra en 1895. La marchitez vascular producida por Fol, disminuye en un 60 % el rendimiento y afecta la calidad del producto (Ascencio-Álvarez *et al.*, 2008). Fol, ha afectado al menos 32 países con gran diversidad de condiciones, principalmente con clima cálidos y suelos con textura arenosa (Cai *et al.*, 2003). La enfermedad, se ha presentado en cultivos intensivos de tomate a cielo abierto, así como en cultivares susceptibles bajo condiciones de invernadero (Peñuelas-Rubio, 2014). Se han reportado tres razas del hongo (Fol) causantes de la marchitez vascular, que son morfológicamente idénticas pero se distinguen por su virulencia en los cultivos de tomate que contienen diferentes genes de resistencia (Cai *et al.*, 2003) (Álvarez-Zamorano, 2004).

La raza 1 y la resistencia al locus *I* de *Solanum pimpinellifolium* PI-79532 se describió inicialmente en 1886 (Booth, 1971; Bhon y Tucker 1939). La raza 2 se reportó en 1945 en Ohio (Alexander y Tucker, 1945) y la resistencia a esta raza se encontró en el locus (1-2) del híbrido natural *S. esculentum* x *S. pimpinellifolium* PI-126915 (Alexander y Hoover, 1955). La raza 3 capaz de atacar los cultivares con los loci para resistencia 1 y (1-2) se observó en Queensland, Australia en 1978 (Grattidge y O' Brien, 1982) y posteriormente en varios estados americanos: California, Florida, Georgia, Arkansas y Carolina del Norte y Tennessee (Marlatt *et al.*, 1996; Cai *et al.*, 2003); también se ha encontrado en México en los estados de Sinaloa, Baja California y Morelos (Hernández-Martínez *et al.*, 2014). Las razas en Fol, pueden ser diferenciadas por pruebas de patogenicidad, utilizando cultivares de tomate con distintos genotipos que actúan como hospederos diferenciales (McGrath *et al.*, 1988). En la actualidad la medida más eficiente para controlar Fol es a través del uso de cultivares resistentes. Casi todas las variedades que se utilizan son resistentes a la raza 1 y 2, y muy pocas a la raza 3.

Los síntomas que la planta empieza a presentar cuando es infectada por Fol, ocurren al inicio de la floración y se intensifica durante la producción de frutos (Beckman, 1987). Inicia con un amarillamiento ascendente del follaje principalmente en las hojas más viejas afectando la mitad de los folíolos y se

extiende a toda la planta ocasionando una clorosis que a veces se presenta en las hojas de un sólo lado de la planta, y en ocasiones sólo en la mitad de éstas (Carrillo *et al.*, 2003). Las hojas afectadas pueden permanecer adheridas al tallo (Salas-Gómez, 2013), en el cual muestran necrosis en los tejidos vasculares que se tornan de color café en forma de anillo, la cual se extiende hasta las ramas superiores de la planta (Álvarez-Zamorano, 2004). Las plantas enfermas muestran reducción de tamaño, amarillamiento de las hojas inferiores, marchitez de hojas, pudrición necrótica en los tallos y en las raíces laterales.

Fol entra a la planta por medio de las raíces, ya sea por penetración en las raíces o por heridas naturales, como la formación de raíces secundarias en la corteza. La penetración vascular depende de la presencia de células infectadas, senescentes o necróticas, o por circunstancias en la planta que proporciona la entrada a través de heridas (Mes *et al.*, 2000). La diseminación de esporas en los haces vasculares, se lleva a cabo cuando el micelio se ramifica y produce microconidios en su interior, que son desprendidos y llevados por el flujo ascendente del xilema (Salas-Gómez, 2013).

II.2.2. *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* (Forl)

Fusarium oxysporum f. sp. *radicis-lycopersici*, es la segunda enfermedad más importante del tomate producida por el género *Fusarium* (Peñuelas-Rubio, 2014). Es una forma especial extendida en zonas donde las temperaturas del aire y del suelo es cálida la mayor parte del año (Cifuentes *et al.*, 1994; Mandal *et al.*, 2009). Forl ha sido inventariado para diferentes países en condiciones de invernadero o de campo abierto: en Estados Unidos de América del Norte (Leary y Endo, 1971), Japón (Yamamoto *et al.*, 1974); Canadá (Jarvis *et al.*, 1975); Israel (Krukin *et al.*, 1982); Francia y Grecia (Malathrakis, 1985).

En México, este patógeno ha sido reportado en importantes estados productores como Sinaloa (Apodaca *et al.*, 2004) y Morelos (Domínguez, 2012). Su distribución es cosmopolita y en muchos países se ha detectado en periodos

calurosos. La temperatura óptima para su desarrollo es de 18 a 20°C y bajo condiciones de estrés hídrico (FAO, 2013). Forl puede infectar nuevas áreas mediante semillas contaminadas, suelo infestado, viento, plantas enfermas, herramientas contaminadas o por composta. El patógeno causa pudrición de la corona y puede sobrevivir en el suelo por muchos años. La infección ocurre después de la plantación y comienza a penetrar por la raíz a través de heridas o cuando se da la formación de nuevas raíces (Szczuchura *et al.*, 2013). Los síntomas, ocurren al inicio de la floración o poco después de la formación de los primeros frutos, así como también se han observado en plantas recién trasplantadas (Tello y Lacasa, 1998).

Los síntomas que produce Forl son marchitamiento irreversible generalizado en toda la planta que se combina o no con un amarillamiento de las hojas más viejas, que posteriormente progresa a las hojas superiores de la planta. En otras ocasiones, las hojas se tornan cloróticas (amarillas) desde la base hasta la yema terminal, deteniendo la planta su crecimiento, pero sin llegar a morir (Tello y Lacasa, 1988). Otro signo característico de la enfermedad se observa en el sistema radicular, ya que Forl ocasiona podredumbre de color marrón tanto en las raíces primarias como en las secundarias (Salas-Gómez, 2013). En ocasiones, la epidermis de la raíz principal no manifiesta podredumbre alguna, pero la médula está deteriorada por una podredumbre húmeda de intenso color marrón (Tello y Lacasa, 1988). La raíz primaria y las secundarias pueden pudrirse por completo y ascender 25 cm, provocando la muerte de la planta (Álvarez-Zamorano, 2004; Hernández *et al.*, 2005). El cuello de la planta muestra podredumbre marrón que rodea, la zona de unión entre raíces y tallo. Se desarrolla de manera interna en el tallo por medio de conidios (Singha *et al.*, 2011), ocasionando lesiones necróticas extensivas en la base del tallo. El xilema aparece, como una continuación de la podredumbre medular del tallo, con una necrosis marrón que puede llegar hasta la copa (Tello y Lacasa, 1988). Las plantas infectadas se marchitan, mueren o pueden permanecer en un estado de debilitamiento (Szczuchura *et al.*, 2013).

Existen evidencias de que *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopresici*, tiene la capacidad de producir moléculas que suprimen la defensa de las plantas. Este hongo, produce la tomatinasa enzima que detoxifica compuestos antifúngicos producidos por las plantas de tomate como la α -tomatina, transformándola en su forma no tóxica. Ésta, se combina con los grupos 3β -hidroxil de los esteroides de la membrana de los hongos provocando pérdida en su integridad (Szczechura *et al.*, 2013; González *et al.*, 2012). Sin embargo, en *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* se reporta alta tolerancia a la enzima α -tomatina, debido a la presencia de enzimas como la tomatinasa Tom1 que la degrada (González *et al.*, 2012). Es por esto que las plantas, utilizan mecanismos de defensa que median la resistencia natural e inducida en la interacción con *Fusarium oxysporum*. Las enzimas β -1, 3 glucanasa y quitinasa son inducidas en plantas de tomate infectadas por For1. Se ha reportado la acumulación de quitinasa alrededor de los tejidos dañados por las hifas del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis lycopersici*. La quitinasa y la β -1, 3 glucanasa juegan un papel importante en respuesta a la infección por hongos inhibiendo su crecimiento (Szczechura *et al.*, 2013).

II.3. Mecanismos de Defensa *Solanum lycopersicum*-*Fusarium oxysporum*

La resistencia de la planta a las enfermedades, está asociada con un número de respuestas de defensa, activadas por el hospedante después de ponerse en contacto con los patógenos. Para evitar esta colonización de patógenos, las plantas de tomate pueden utilizar diversos mecanismos de defensas donde combinan cambios físicos, químicos y moleculares. Estas defensas, responden a un amplio espectro de patógenos tales como hongos, virus y bacterias. Los mecanismos, pueden ser constitutivos o inducidos y le otorgan a la planta la capacidad de enfrentar un ataque por microorganismos y evitar que éstos se sigan desarrollando (Madriz-Ordeña, 2002).

II.3.1. Defensas Constitutivos

En este tipo de defensa se incluye la formación de barreras estructurales que no son tóxicas, no inhiben la producción de enzimas patogénicas y poseen suficiente resistencia mecánica para resistir el avance del patógeno. Estas defensas se presentan de manera pasiva, ya que se pueden encontrar siempre en concentraciones suficientes para evitar el desarrollo de patógenos, pero la concentración incrementa con el avance de la infección (Ahmad Dar *et al.*, 2015).

Entre las defensas constitutivas de las plantas, están las defensas físicas como la cutícula, espinas, pelos y tricomas, con el fin de bloquear la entrada o penetración del patógeno. Si el patógeno consigue atravesar las barreras preformadas, la planta puede crear otras nuevas como respuesta al estímulo del patógeno. Entre ellas se encuentran los procesos de lignificación que ocasionan un engrosamiento en la pared celular y procesos de suberización en partes que no han sido infectadas. La planta también puede desarrollar defensas bioquímicas que incluye compuestos tóxicos o repelentes en contra del ataque de patógenos y herbívoros (Vos *et al.*, 2013). Entre ellas, se encuentran la producción de fenoles, lignina, taninos, saponinas, antocianinas, flavonoides, glucosinolatos, lectinas, glucanasas y quitinasas.

II.3.2. Defensas Inducidas

La defensa inducida que se encuentra de manera activa, ya que se basa en el reconocimiento del invasor, seguido de una transducción de señales que conduce a la activación de las defensas (Rangel-Sánchez *et al.*, 2010). Las sustancias químicas y los factores bióticos son los elicitores que provocan la activación de señales para que se dé un cambio en el metabolismo de la planta (Villa-Martínez *et al.*, 2014). La resistencia inducida puede expresarse

localmente en el sitio del ataque por el patógeno o sistémicamente, en partes no infectadas de la planta.

Existen distintos tipos de mecanismos inducibles. Uno de ellos es la reacción hipersensible en la cual se da una respuesta rápida a la infección por un patógeno, impidiendo que se siga desarrollando, ocasionando una muerte celular programada en el sitio de infección. A diferencia de la necrosis que es causada por toxinas, la reacción hipersensible se lleva a cabo mediante el reconocimiento de un patógeno y por las condiciones de estrés a la que la planta se enfrenta (Van Doorn *et al.*, 2011). Además, éste mecanismo de defensa está genéticamente programado y es acompañado de la activación de genes, seguido de una síntesis de fitoalexinas y acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis.

La reacción hipersensible se caracteriza por la acumulación de ácido salicílico y la producción de especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno y el radical superóxido. Si la respuesta de defensa es suficiente, el patógeno no seguirá creciendo y se producirá la muerte en la región infectada (Rangel-Sánchez *et al.*, 2010). Las especies reactivas de oxígeno, son consideradas como la segunda vía de señalización en la defensa de las plantas. Según Villa-Martínez *et al.*, (2014) inicialmente se pensó que la reacción hipersensible se presentaba solamente en interacciones incompatibles en donde el patógeno era detectado por la planta y no permitía su desarrollo.

Por otro lado, se pueden producir fitoalexinas, las cuales son compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se inducen en las plantas que se encuentran en contacto con un patógeno. La expresión de fitoalexinas, puede ser regulada por hormonas, factores de transcripción y proteína quinasas activas (Lin *et al.*, 2014). Su síntesis se lleva a cabo mediante moléculas inductoras como β -glucanos, glicoproteínas y lípidos de la pared celular en células vivas (Anaya-Lana, 2003). Las fitoalexinas, se acumulan en la planta después de su exposición a microorganismos o estímulos similares provocando inhibición del crecimiento de hongos, así como efectos bactericidas.

En algunos casos los mecanismos de defensas van acompañados de la expresión de un conjunto de genes con actividad antifúngica en las plantas. Se reconoce que las proteínas más importantes son enzimas hidrolíticas como la quitinasa y la 1,3 glucanasa que ayudan a degradar los componentes de la pared celular de los hongos (Gómez-Lim, 2002). Cuando estos genes se activan, la resistencia en las plantas contra los hongos se mejora significativamente.

Otra respuesta de defensa, es la resistencia sistémica adquirida. Ésta, es una de las más efectivas, ya que es eficiente contra un amplio espectro de patógenos tales como hongos, bacterias o virus (Gozzo y Faoro, 2013). La resistencia sistémica adquirida, implica la producción de señales móviles como el incremento de los niveles de ácido salicílico y sus derivados ácido salicílico-glucósidos. Además de involucrar la expresión de genes para activar los mecanismos de resistencia en partes no infectadas (Rangel-Sánchez *et al.*, 2010). Esta activación de señales, puede darse dentro de 4-6 horas después de que la planta es infectada por el patógeno (Kachroo y Robin, 2013).

En la resistencia sistémica adquirida, se pueden identificar dos etapas: en la primera, se da una resistencia local y se producen defensas en las partes cercanas a la infección por el patógeno (Fu y Dong, 2013). Y en la segunda se presenta una resistencia sistémica en donde se envían defensas a los tejidos alejados al ataque (Díaz-Puentes, 2012). Así, la infección predispone a la planta a resistir efectivamente otros ataques (Kachroo y Robin, 2013). La principal ventaja de este mecanismo de defensa es que no induce una resistencia directa sobre la plaga a controlar, pues su principio se basa en la estimulación de defensas de la planta y no sobre el organismo plaga.

II.3.3. Metabolitos que Participan en los Mecanismos de Defensa Inducidos

Se han realizado investigaciones en donde se ha encontrado que las hormonas de crecimiento como la auxina, ácido giberélico, brasinoesteroides y el ácido abscísico participan en la inmunidad de la planta (Yang *et al.*, 2013). También el

ácido salicílico, ácido jasmónico y el etileno actúan como señalizadores para activar una amplia gama de respuesta de defensa induciendo la resistencia sistémica adquirida. El ácido salicílico provee resistencia en contra de patógenos biotróficos y el ácido jasmónico y etileno contra necrotróficos (Glazebrook, 2005).

El ácido jasmónico, ha sido identificado como un señalizador antagonista del ácido salicílico para activar las respuestas de defensa en las plantas. Su función varía según el tipo de célula, el estado de desarrollo y la respuesta a diferentes estímulos. Los jasmonatos inducen la estimulación indirecta (emisiones volátiles como metil jasmonato) y directa (proteínas G) de los mecanismos de resistencia para evitar el ataque de patógenos (Ahmad Dar *et al.*, 2015). En plantas sanas, la concentración de ácido jasmónico y sus derivados son muy bajos, pero inicia su acumulación al ser infectadas por patógenos o tratadas con elicitores (Vidhyasekaran, 2015).

Wolski *et al.* (2010), aplicaron de manera exógena ácido jasmónico y un extracto de una planta del género *Astragalus* a *Amelanchier alnifolia* para mejorar la respuesta de defensas contra el hongo *Entomosporium mespili*. Los dos inductores utilizados, permitieron la acumulación endógena de ácido jasmónico y la síntesis de genes involucrados en la defensa de las plantas como el PR-1, PR-2, PR-5.

Se ha reportado también, que el ácido salicílico también favorece los mecanismos de defensa de las plantas. Mandal *et al.* (2009), aplicaron 200 μM de ácido salicílico de manera exógena en raíces y hojas de plantas de tomate para inducir la resistencia contra *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*. Se observó que el ácido salicílico libre endógeno en las raíces se incrementó 10 veces los valores que en las plantas control. Disminuyó el oscurecimiento vascular y el marchitamiento de la planta. Además se observó un incremento en las plantas tratadas a las 168 horas, la actividad de la fenilalanina amonio liasa, enzima clave del metabolismo secundario y de peroxidasa, enzima que cataliza la oxidación de un amplio número de sustratos orgánicos e inorgánicos, utilizando el poder oxidante del peróxido de hidrógeno.

Según Shah y Zeier (2013), se han realizado estudios en plantas de *Arabidopsis thaliana* y de *Nicotiana tabacum*, los cuales confirman que la acumulación y señalización por ácido salicílico son críticos para conferirle resistencia a plantas infectadas. Se ha reportado que al crear mutantes deficientes en la enzima isochorismato sintasa, la cual es necesaria para la síntesis de ácido salicílico, se presenta una deficiencia en la resistencia sistémica adquirida. Lo cual evidencia la importancia de esta molécula en el proceso de defensa.

II.4. Alternativas al Uso de Agroquímicos para el Control de *F. oxysporum*

Con el fin de proteger los cultivos contra *Fusarium oxysporum*, se utiliza una diversidad de fungicidas químicos. El uso excesivo de éstos, ha generado impacto en el medio ambiente y en la salud humana, así como también ha tenido implicaciones en el desarrollo de la resistencia del patógeno a los fungicidas (Sbaihat et al., 2015).

En los últimos 60 años, se han realizado investigaciones importantes sobre el uso de elicitores. Esto, para reducir el uso de agroquímicos y disminuir los efectos secundarios indeseables (Gurjar et al., 2012). Con el desarrollo de nuevos sistemas se pretende evitar pérdidas de la producción en los cultivos, reducir las implicaciones negativas en cuestiones de salud pública y al desgaste ambiental (Villa-Martínez et al., 2014).

La necesidad de buscar alternativas que ayuden a los agricultores a reducir la dependencia de los químicos lleva a buscar fungicidas de origen natural efectivos contra patógenos (Martínez, 2012). Algunos, están dirigidos a compuestos derivados de fuentes vegetales, como aceites esenciales y extractos vegetales con propiedades antifúngicas que impidan la infección. A estos agentes que inducen cualquier tipo de defensa son llamados elicitores (Sbaihat et al., 2015).

II.4.1. Extractos Vegetales

De los extractos vegetales, se obtienen diversos compuestos con propiedades antimicrobianas para eliminar patógenos. Estos compuestos son principalmente fenoles y terpenos, los cuales pueden ser obtenidos de raíces, cortezas, semillas, brotes, hojas y frutos. El mecanismo de acción de los compuestos fenólicos y de los terpenos se centra principalmente en sus efectos sobre las membranas celulares, en la interrupción de la membrana citoplasmática y en la inhibición de las proteínas celulares (Lanzotti *et al.*, 2013).

En la actualidad, existen varios productos comerciales a base de extractos vegetales que inducen la resistencia sistémica adquirida. Entre ellos encontramos fungicidas como Messenger®, Serenade® y Milsana® (Martínez, 2012). Según Singh *et al.* (2012), existen algunas limitaciones al utilizar extractos vegetales para reducir enfermedades en plantas. Entre ellas se encuentran que los métodos no están estandarizados, la rápida degradación, la efectividad solamente *in vitro* y son menos efectivos que los agentes sintéticos.

Estudios *in vivo* realizados en Mysore, India por Ramaiah y Garampalli (2015), donde utilizaron medios de cultivos con extractos vegetales para inhibir a *Fusarium oxysporum* en concentraciones (10 %, 20 %, 40 % y 60 %) de 15 diferentes plantas con actividad antifúngica. Encontraron que 3 de los extractos utilizados presentaron diferencias significativas inhibiendo el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* a concentraciones del 60 %. Los extractos que reportaron mayor actividad antifúngica fueron la hierba mora (*Solanum indicum*) con 78.33 %, la acederilla (*Oxalis latifolia*) con 70.33 % y el neem (*Azadirachta indica*) con 75 %.

Otros estudios hechos por Singha *et al.* (2011) usaron extracto crudo de betel (*Piper betle*), para controlar la marchitez de *Fusarium* ocasionada por la forma especial de *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* en plantas de tomate. En el betel se encontró presencia de saponinas, flavonoides, fenoles y taninos. Estos compuestos, inducen una elevada acumulación de compuestos fenólicos en las plantas infectadas en comparación con las plantas control, indicando que el

extracto utilizado puede reducir los síntomas y el desarrollo del hongo. El alto contenido de compuestos fenólicos, es esencial para la defensa contra patógenos. En las plantas control los compuestos fenólicos disminuyeron el día 21, mientras que las plantas tratadas alcanzaron sus niveles máximos el día 28.

II.4.2. Aceites Esenciales

Además de los extractos vegetales, también se han utilizado aceites esenciales de plantas para inhibir el crecimiento de hongos. Estas sustancias, son altamente volátiles y se encuentran almacenadas, principalmente, en los tricomas de las plantas aromáticas (Martínez, 2012). Un ejemplo de ello, es el estudio realizado por Pawar y Thaker (2006), que evaluaron los efectos de 75 aceites esenciales para controlar a *Fusarium oxysporum f. sp. cicer* (FOC) y *Alternaria porri*. Encontraron que los aceites de canela (*Cinnamomum zeylanicum*), casia (*Cinnamomum cassia*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y hierba de limón (*Cymbopogon citratus*) fueron los aceites más efectivos para la inhibición de los hongos. Otra planta que se ha empleado en la inhibición de hongos es el ajo (*Allium sativum*), la cual posee un sin número de actividades biológicas tales como antibiótico, antimicrobiano, antifúngico, antioxidante, antiinflamatorio y anticarcinogénico (Córdova-Betancourt, 2010; Block, 1985).

II.5. Ajo (*Allium sativum*) y sus Propiedades Antifúngicas

El ajo, está constituido por agua en un 65 %, carbohidratos, al menos 33 compuestos azufrados, proteínas, 17 aminoácidos libres, derivados fenólicos, fibra, minerales, saponinas y vitamina A y C (Navarro, 2007; Londhe *et al.*, 2011). Además, en el género *Allium*, se han identificado compuestos con propiedades antimicrobianas como las saponinas, flavonoides, fenoles, alcaloides, péptidos e

incluso proteínas (Lanzotti *et al.*, 2013). Estas propiedades, han sido utilizadas para inhibir el crecimiento de varios hongos.

De los compuestos del ajo destacan los derivados azufrados a partir de aliína (sulfóxido de S-alil-cisteína), con concentraciones de 5 a 14 mg por gramo de peso fresco (Lanzotti *et al.*, 2013). La aliína, constituye el principal sustrato para la enzima aliinasa que, una vez liberada de su compartimento intracelular por molienda o corte, transforma a la aliína en alicina (dialiltiosulfonato) (Kyung, 2012). La aliína, por sí sola no funciona como antifúngico, pero al ser transformado en alicina, adquiere esa actividad (Bayan *et al.*, 2014).

La alicina inhibe el crecimiento de patógenos debido a que presenta un grupo –S(O)-S-, el cual reacciona con los grupos tiol (-SH) de las proteínas para formar disulfuros (Kyung, 2012). Al bloquear los grupos sulfidrilo de las proteínas inactivan su función o impide que se forme la estructura cuaternaria de las enzimas. Se sabe que los grupos sulfidrilos son los que bloquean, ya que al revertir el efecto antifúngico, impide la formación de estos enlaces (Gándara-Ledezma *et al.*, 2015). Está demostrado que la adición de cisteína y glutatión reduce el efecto de inhibición de la alicina debido a la interacción entre aminoácidos y enlaces disulfuros (Lanzotti *et al.*, 2013).

La alicina ha tenido éxito a nivel laboratorio como agente antifúngico. Pero al momento de aplicar un tratamiento en campo con éste compuesto, es necesario tomar en cuenta varios aspectos ya que se considera un agente inestable. Se ha reportado que la alicina a altas temperaturas de 80°C pierde el efecto, mientras que a bajas temperaturas de 6°C aun presenta actividad contra patógenos (Slusarenko *et al.*, 2008). La degradación de la alicina permite la formación de nuevos compuestos azufrados como dialil disulfuro (DADS), dialil trisulfuro (DATS) y ajoenos. La formación de estos compuestos, puede variar según las condiciones de temperatura y tiempo de almacenamiento, la polaridad de solventes, el pH y los métodos de extracción que se utilicen (Iberl *et al.*, 1990).

Se ha reportado que la alicina al ser mezclada con solventes medianamente polares, o sin solvente se produce principalmente 3-vinil-[4H]-1-2-ditiína (51 %), 2-vinil [4H]-1-3-diftina (19 %) y en menor cantidad ajoeno (12 %)

y sulfuros (18 %). La alicina en alcoholes como el etanol, almacenado durante 30 minutos se degrada principalmente en trisulfuros de dialilo (83 %) y disulfuros de dialilo (10 %), ajoeno (1 %) y vinil-ditiínas (1 %) (Iberl *et al.*, 1990; Córdova-Betancourt, 2010). Por otro lado, la alicina mezclada con aceite se transforma en 3-vinil-[4H]-1-2-ditiína y 2-vinil [4H]-1-3-diítina según Iberl *et al.* (1990).

Alkhail (2005), utilizaron extractos de ajo, hierba de limón (*Cymbopogon proximus*), la alcaravea (*Carum carvi*), el neem y el clavo de olor en contra de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, *Botrytis cinerea* y *Rhizoctonia solani*. Encontraron que las plantas tratadas con extracto ajo se vio mejorada un 95 % de eficiencia en comparación con los otros extractos. Los otros extractos utilizados tuvieron una eficiencia mayor del 60 %.

Según Sesan *et al.* 2015, realizaron un estudio en donde probaron 9 extractos vegetales *in vitro* contra *Botrytis cinerea* en el arbusto *Ribes nigrum L.* 6 de los extractos: *Hyssopus officinalis*, *Satureja hortensis*, *Allium sativum*, *Tagetes patula* y *Mentha*, mostraron una eficiencia antifúngica entre el 80 y el 100 %. *Allium sativum* y *Mentha*, presentaron eficiencia solo en las concentraciones más altas del extracto. Estos extractos además de *H. officinalis* presentaron un efecto inhibitorio en el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* en *Ribes nigrum L. in vitro*. Estos mismos autores, realizaron el estudio *in vivo* donde aplicaron los mismos extractos *Ribes nigrum L.* *Satureja hortensis* presentó un efecto de inhibición del 96.6 % y *Allium sativum* de 92.5 % en concentraciones de 10 %. Sesan *et al.* (2015) clasifica al extracto de ajo con una fuerte actividad antifúngica. Los resultados del efecto antifúngico del ajo de más del 90 % de efectividad, concuerdan con los obtenidos en laboratorio en la investigación realizada por Alkhail, (2005).

Con lo anterior, se demuestra que algunos trabajos realizados con extracto de ajo han tenido éxito como antifúngicos a nivel laboratorio y en el campo. Sin embargo, ninguno de estos trabajos ha evaluado el efecto del ajo sobre el sistema adquirido de defensa de las plantas de tomate.

III. HIPÓTESIS

La aplicación de un extracto de ajo rico en alicina y sus derivados, en plantas de tomate variedad Tiny tim cherry, inducen la resistencia sistémica adquirida contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* mediante la acumulación de ácido salicílico y ácido jasmónico

IV. OBJETIVOS

IV.1. General

Evaluar en plantas de tomate inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* el efecto del extracto hidroalcohólico de ajo (EHA) sobre el desarrollo de la planta y el contenido de ácido salicílico y ácido jasmónico.

IV.2. Específicos

- Evaluar en las plantas de tomate inoculadas y tratadas foliarmente con EHA los siguientes parámetros físicos: altura de la planta, número de hojas y contenido de clorofila como parámetros del desarrollo de la planta.
- Evaluar la severidad de la infección de la planta de tomate por *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, después de la aplicación del extracto de ajo.
- Cuantificar por HPLC el contenido de ácido salicílico y jasmónico en hojas y tallos de plantas de tomate, inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, después de la aplicación del extracto de ajo.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se llevó a cabo en las instalaciones del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C. (CIAD), en Hermosillo, Sonora, México en el laboratorio de Ecología Química. El estudio experimental se realizó de manera *in vitro* con 8 unidades experimentales por cada tratamiento. Los tratamientos fueron: un testigo absoluto, un testigo con herida, un testigo inoculado con el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y tres tratamientos con herida, inoculados con el hongo y con EHA en tres niveles de concentración de 0.5, 1 y 2 %.

V.1. Material Vegetal

Se utilizaron plántulas de tomate (*Solanum lycopersicum* var. *Tiny tim cherry*). Las plántulas se obtuvieron a partir de semillas certificadas propagadas en un invernadero localizado en la ciudad de Obregón, Sonora. Se crecieron durante 21 días en condiciones de invernadero, para posteriormente ser trasladadas a una cámara de crecimiento con condiciones controladas de luz y temperatura (25 °C, fotoperiodo de 16 h luz/ 8 h oscuridad, 100 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica y 80 % de humedad relativa). Veintiocho días después de germinación, se aplicó enraizador (Magic root) al 2 % para evitar efectos en la condición y el desarrollo de la planta por falta de nutrientes.

Después de 45 días de la germinación, las plántulas fueron trasplantadas a bolsas para trasplante de 3 kg, conteniendo tierra preparada marca Nutrigarden como sustrato. Ya que las plántulas fueron trasplantadas se procedió a designar y aplicar aleatoriamente los tratamientos a cada planta.

V.2. Extracto Hidroalcohólico de Ajo (EHA)

La obtención del EHA se realizó con una metodología establecida por Vargas-Arispuro *et al.* (2008). El extracto se obtuvo mediante el proceso de maceración, para el cual se emplearon 5 g de dientes de ajo fresco pelado. Se mezcló con 30 mL de agua en una licuadora durante 1 minuto.

El macerado resultante se incubó durante 20 minutos a 30°C. Después se realizó una centrifugación durante 20 minutos a 15000 g a 4°C. Se agregó 1.0 mL de etanol por cada mL de sobrenadante y esta mezcla pasó a una segunda centrifugación durante 20 minutos a 8000 g y 4°C. Finalmente, el sobrenadante resultante se analizó por HPLC para cuantificar la cantidad inicial de alicina y compuestos de degradación presentes en el extracto.

V.3. Obtención e Inoculación de *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*

Para la obtención del inóculo de esporas, se siguió la metodología establecida por Camacho *et al.* (2012). Se utilizaron esporas de una cepa aislada de *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* de cultivos sonorenses de tomate bajo condiciones de invernadero, proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIBAA en ITSON centro. Se usó como medio de cultivo agar papa dextrosa a una temperatura de 28° C por 7 días. Después de que el medio se solidificó, el hongo se mantuvo en resiembra hasta el día del experimental para mantenerlo activo. El hongo desarrollado, se recolectaron las esporas agregándolas a una solución de Tween 80 al 0.02 %.

Una vez que se obtuvo la solución se llevó a cabo el conteo de esporas con cámara de Neubauer (Hernández y Rangel, 2012), hasta obtener una concentración de 1×10^7 esporas/mL.

V.4. Inoculación de las plantas

Las plántulas de tomate se extrajeron del semillero, después se llevó a cabo un lavado en las raíces para eliminar el sustrato. Con un bisturí se hicieron pequeñas heridas en las raíces adventicias para sumergirlas en la solución inoculante [1×10^7 esporas/mL] de Forl durante 30 minutos (**Figura 1**). Posteriormente se realizó el trasplante.



Figura 1. Procedimiento realizado para inocular las plantas de tomate.

V.5. Tratamientos de Inducción en Plantas

Los tratamientos se asignaron completamente al azar: tres tratamientos con EHA al 0.5, 1 y 2 %, un grupo control absoluto, uno con heridas y otro inoculado, cada uno con 8 plántulas, de las que se tomaron mediciones físicas y material vegetal

para análisis químico (**Tabla 1**). La aplicación de los tratamiento del extracto de ajo, se llevó a cabo por el método de aspersión al follaje a los 7 y 14 días después del trasplante e inoculación con *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*.

Tabla 1. Tratamientos de inducción

Tratamiento	Plantas
1	Testigo absoluto
2	Heridas
3	Inoculadas + heridas
4	Inoculadas + heridas + EHA 0.5 %
5	Inoculadas + heridas + EHA 1 %
6	Inoculadas + heridas + EHA 2 %

V.6. Evaluación de la Severidad e Incidencia de la Enfermedad

Se evaluó la enfermedad de las plantas de tomate utilizándose una escala hedónica propuesta por Apodaca *et al.*, (2004) y Clavijo-Castro (2014). Se asignó una escala hedónica de 0 a 5 (**Tabla 2**). Se consideraron como plantas sanas cuando no mostraron síntomas visibles a la enfermedad. En las plantas que presentaron hojas marchitas, disminución en su crecimiento de la planta y/o daño en el hipocótilo se les consideró como plantas resistentes a *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici*. En el caso donde las hojas de la planta presentan marchitez o defoliación severa, disminución en el crecimiento o muerte se consideraron como susceptibles al ataque de Forl.

Tabla 2. Escala para evaluar la severidad por *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

Clase	Intensidad de la enfermedad
0	Sin síntomas visibles a la enfermedad
1	Puntos necróticos en hipocotílo
2	Hojas marchitas, oscurecimiento en la base del hipocotílo o disminución en el crecimiento de la planta
3	Marchitez, lesión necróticas 1-5 cm y disminución en el crecimiento de la planta
4	Lesión necrótica 6-10 cm, defoliación y disminución en el crecimiento.
5	Muerte de la planta

(Apodaca *et al.*, 2004; Clavijo-Castro, 2014)

Para llevar a cabo la evaluación de la severidad, se midió índice de clorofila (UC), altura (cm) y número de hojas cada 7 días después de la aplicación del tratamiento durante 49 días. El índice de clorofila, se midió empleando el equipo SPAD 502 de Minolta. El equipo mide la absorción en longitudes de onda de 650 y 940 nm para estimar niveles de la clorofila. La medición se realizó en la por triplicado en la tercer hoja, posteriormente se obtuvo un promedio de (ic). La altura de la planta se midió con un flexómetro desde la base del tallo hasta el ápice de la planta (Ubaldo-Vázquez, 2014). Y se realizó un conteo desde la hoja basal hasta la última hoja, incluyendo en esta variable las hojas muertas. Se calculó la severidad en porcentaje utilizando la fórmula propuesta por Townsend y Heuberguer (1943) (1).

$$S = \left(\sum nv/5N \right) x100 \quad (1)$$

S= Severidad

n= Plantas por categoría

v= Valor de la categoría

N= Plantas por unidad experimental

V.7. Diseño Experimental

Se aplicó un diseño experimental completamente al azar. El análisis estadístico fue un ANOVA (de una vía) en el paquete estadístico NCSS 2007. Se analizaron durante 7 semanas los síntomas de las plantas: índice de clorofila, altura y número de hojas, además de la concentración de ácido salicílico y ácido jasmónico como variables respuestas. Se realizó una comparación de medias por el método de Tukey-Kramer con un nivel de probabilidad de $p < 0.05$. El índice de clorofila, altura y número de hojas, se analizaron mediante estadística descriptiva.

V.8. Determinación del Ácido Salicílico y Jasmónico

Se tomaron hojas y tallos para realizar una evaluación antes y después del trasplante, así como también después de aplicar el extracto de ajo. Se realizó la primera colecta de material foliar, para hacer las evaluaciones y determinar la concentración inicial del ácido salicílico y jasmónico en los tejidos. La concentración de estos metabolitos se midió durante 49 días, con muestreos cada 7° día después de aplicar los tratamientos. Las hojas y tallos se cortaron de la planta y fueron envueltos en papel aluminio con etiquetado, para inmediatamente ser congelados en nitrógeno líquido y almacenados a un congelador a -80°C para su conservación hasta el posterior análisis.

El proceso de análisis se basó en la metodología utilizada por Guzmán-Téllez *et al.*, (2014) y Arbona y Gómez-Cárdenas (2008) y constó de dos fases: 1) Preparación de la muestra para la extracción, 2) Cuantificación de la concentración de ácido salicílico y ácido jasmónico.

Para la extracción de la muestra se pesó 1 g de tejido de la hoja. El material vegetativo, se colocó en tubos de 30 mL. Se le agregó 10 mL de agua desionizada. Posteriormente se homogenizó con un homogenizador Ultra-Turrax. Los tubos se centrifugaron a 4000 g durante 45 minutos a 4°C . Se descartó el

precipitado y el sobrenadante se ajustó a un pH de 3.0, con una solución de ácido acético al 15 %. Se prepararon dos muestras de 3 ml c/u de este precipitado y se les agregó 2 mL de éter etílico. Se agitó y la fase orgánica se recuperó y se secó con nitrógeno gaseoso. El residuo seco resultante se resuspendió con 500 μ L de fase móvil A/B (50/50). Después se filtró utilizando un filtro de PTFE de 0.45 μ m (PALL). El filtrado se utilizó para la determinación del ácido salicílico y del ácido jasmónico, utilizando un cromatógrafo de líquidos marca Agilent Technologies modelo 1260 infinity. Se utilizó el programa computacional OpenLab ChemStation (Agilent Technologies) para el análisis.

El equipo consta de una bomba cuaternaria, un detector de arreglo de diodos y un inyector manual Rheodyne 7725i, la columna utilizada fue Phenomenex Luna de 250 * 4.6 mm de 5 μ m de partícula. La fase móvil consistió de dos fases, la A 94.9 % H₂O, 0.1 % HCOOH (ácido fórmico) y 5 % CH₃CN (acetonitrilo) y la fase B 5 % H₂O, 94.9 % CH₃CN y 0.1 % HCOOH, en una proporción 60-40 la cual se trabajó de manera isocrática a 1 mL por minuto durante 20 min a temperatura ambiente. La longitud de onda empleada fue 303 nm para los dos compuestos. Se utilizaron estándares de ácido salicílico y ácido jasmónico marca Sigma para realizar curvas de calibración, ubicar los tiempos de retención y determinar la concentración.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIONES

VI.1 Material Vegetal

La **Figura 2**, muestra una imagen de las plántulas de tomate Cherry, con una germinación del 100 % a los 45 días después de la siembra. Estas plántulas, se inocularon con *Fusarium osyporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y posteriormente se les aplicó el tratamiento correspondiente a cada uno de los grupos.



Figura 2. Plántulas de tomate en semilleros (45 días posteriores a la germinación)

VI.2 Extracto Hidroalcohólico de Ajo

Se obtuvo un extracto hidroalcohólico de ajo con las características descritas por Vargas-Arispuro *et al.*, (2008), con una concentración de $130 \mu\text{g mL}^{-1}$ de alicina, lo cual nos indica que es un extracto de ajo rico en alicina, ya que según

los valores de referencia de 101 y 353 $\mu\text{g mL}^{-1}$ se clasifica como un extracto rico en alicina (Jansen *et al.*, 1987; Lawson *et al.*, 1991). Se ha reportado ampliamente que la alicina se degrada a otros compuestos dependiendo de algunos factores como: la polaridad de los solventes con los que fue extraída, el tiempo de almacenamiento y la temperatura de preparación y almacenamiento (Iberl *et al.*, 1990).

En el EHA, se cuantificaron los compuestos de degradación presentes. Se obtuvo una concentración de 206 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de dialil trisulfuro (DATS), 7.6 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de E-ajoeno y 3.2 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de Z-ajoeno como productos de la degradación de la alicina. Estos resultados son similares a los valores reportados por Gándara-Ledezma *et al.*, (2015) e Iberl *et al.*, (1990) donde reporta 276 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de DATS y 4.71 $\mu\text{g mL}^{-1}$ de E-ajoeno, respectivamente.

VI.3 Obtención de Esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*

Se obtuvo una suspensión de esporas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* con una concentración de 1×10^7 esporas/mL a partir de la cepa proporcionada por el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del CIBAA en ITSON centro.

VI.4. Evaluación de la Severidad e Incidencia de la Enfermedad

La evaluación de la severidad de la enfermedad provocada por Forl en las plantas de tomate, se realizó durante 7 semanas cada 7 DDT. En todas las plantas inoculadas con *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* se encontró respuesta del patógeno, algunas lesiones encontradas se muestran en la **Figura 3**. Como se esperaba, las plantas testigo absoluto y las heridas no presentaron síntomas a la enfermedad ya que no fueron inoculadas con el hongo (**Figura 4**). Todas las

plantas inoculadas con Forl, presentaron síntomas característicos en diferentes grados ocasionados por la infección: marchitez en las hojas y defoliación, disminución en el crecimiento y afectaciones en el tallo como puntos y lesiones necróticas en los haces vasculares (**Figura 4**).

Las plantas más afectadas fueron las plantas heridas + inoculadas ya que mostraron síntomas visibles desde la segunda semana, presentando una severidad del 100 % en la séptima semana después de la inoculación. En lo que respecta a los tratamientos con EHA (**Figura 5**), los resultados muestran que los valores mínimos de severidad fueron de 26.44 % y se presentaron en los tratamientos con concentraciones de 1 y 2 % de EHA, seguido del tratamiento con EHA 0.5 % con 33.33 % (**Figura 5**). Lo anterior, muestra un efecto positivo de la aplicación del EHA en cuanto al control de la enfermedad ya que en relación a la severidad presentada por las plantas heridas + inoculadas, las plantas tratadas tuvieron una recuperación entre el 66 y 73 % de reducción de daños, lo que significa que los síntomas ocasionados por el hongo disminuyeron, en estas plantas.

Este efecto en la reducción de la severidad de la enfermedad en plantas de tomate tratadas con EHA, podría atribuirse a los mecanismos de defensa que inducen la acumulación de metabolitos secundarios como el AS y AJ, como lo demostró Díaz-Puentes (2012) donde, estos metabolitos, indujeron la expresión de genes involucrados en la defensa en condiciones de estrés. Por lo que podemos inferir que la aplicación exógena del EHA funcionó como activador de la resistencia sistémica adquirida en las plantas de tomate.



Figura 3. Puntos y lesiones necróticas en los haces vasculares de los tallos en las plantas heridas + inoculadas.



Testigo absoluto



Heridas



Inoculadas



EHA 0.5 %



EHA 1



EHA 2 %

Figura 4. Plantas de tomate testigo absoluto e inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. *sp. radicum-lycopersici*, y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo

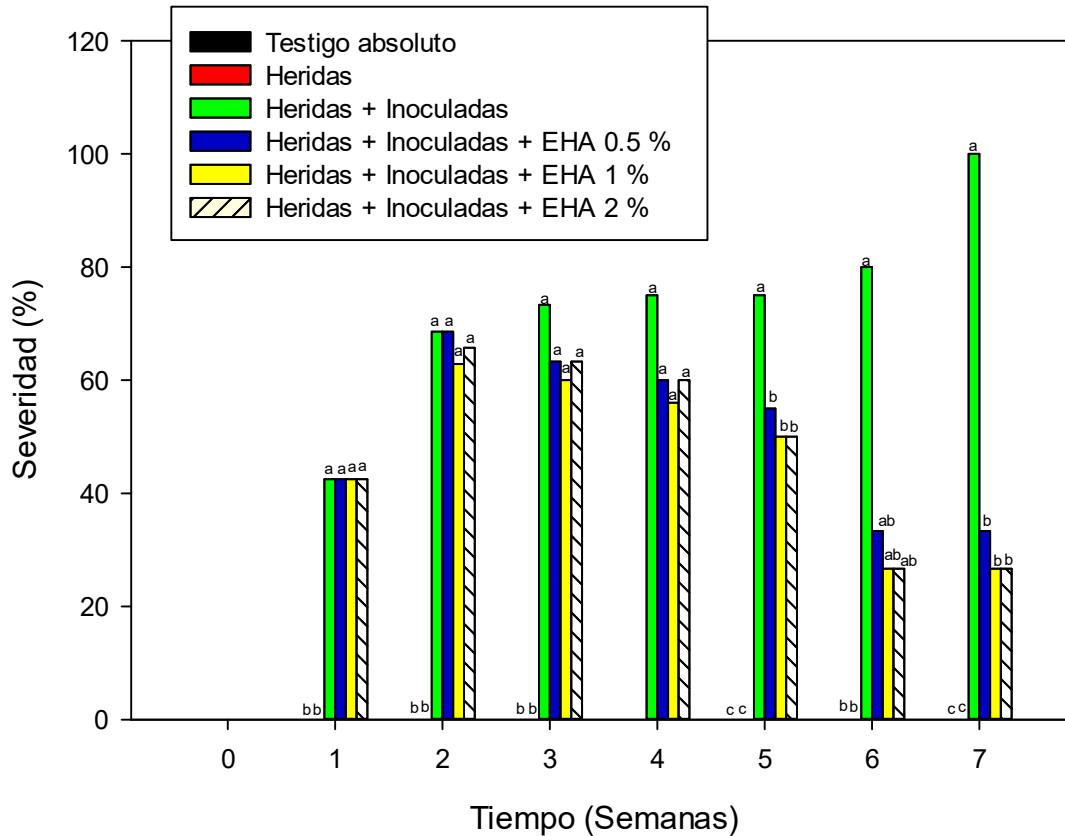


Figura 5. Porcentaje de severidad de la enfermedad de Forl en plantas de tomate, testigo e inoculadas con Forl, y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo en diferentes concentraciones. Datos normales. Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

VI.5. Evaluación de la Altura de las Plantas

Las mediciones de la altura que se realizaron en las plantas de tomate desde el día inicial hasta los 21 días del experimental (3^a semana), no mostraron diferencias significativas entre los tratamientos ($p > 0.05$) (**Figura 6**). Posterior a este periodo de tiempo, las plantas heridas + inoculadas presentaron la menor altura, manteniendo esta tendencia hasta el final del experimental (49 DDT). Esta respuesta se atribuye a que las plantas no lograron controlar el ataque por Forl, el cual pudo infectar libremente a través de las heridas que se hicieron en las raíces y se propagó intercelularmente. Esta reportado que cuando el patógeno entra a los haces vasculares de la planta, el micelio se ramifica y produce la

diseminación de esporas en el interior, las cuales son transportadas hacia el ápice por el flujo ascendente del xilema (Agrios 2007). Esto provocó que la planta no tuviera un crecimiento normal, ya que el hongo invade los tejidos parenquimatosos de la planta (Salas-Gómez, 2013). Esta disminución en el crecimiento, es un síntoma característico de plantas infectadas por *Fusarium oxysporum f. sp. radicis-lycopersici* (Roberts *et al.*, 1995; Apodaca *et al.*, 2004; Peñuelas-Rubio, 2014) efecto que pudo observarse en diferentes grados en todas las plantas que fueron inoculadas.

En lo que respecta a las plantas heridas + inoculadas + EHA 0.5 %, estas alcanzaron una altura promedio de 53.4 ± 1.69 cm, superior a la altura de las plantas heridas + inoculadas (34.9 ± 0.42 cm), pero estadísticamente menor ($p < 0.05$) al tratamiento con 2 % de EHA en la séptima semana (**Figura 6**). La altura promedio de las plantas en este tratamiento fue menor, en contraste con los resultados obtenidos por Sagitov *et al.* (2011), estos autores reportan que la aplicación de un extracto de ajo con una concentración 0.5 % en plantas infectadas con *F. oxysporum f. sp. lycopersici* fue más eficiente que una concentración de 4 %, ya que las plantas presentaron una altura de 154.2 cm y 125 cm, respectivamente. Los resultados indican que al igual que las plantas heridas + inoculadas, la concentración de 0.5 % del EHA, no logró controlar el ataque por el hongo ocasionando un menor crecimiento vegetativo.

Por otra parte, se puede observar en la **figura 6** que en la cuarta y quinta semana, la aplicación del EHA al 2 % en las plantas de tomate registró un incremento en la altura superior a los otros tratamientos, sin embargo, estos valores de altura es similar ($p < 0.05$) a la de las plantas testigo absoluto y a las plantas con EHA al 0.5 y 1 %. Esta tendencia en las plantas con EHA al 2 % se mantuvo hasta la séptima semana alcanzando la mayor altura, seguido de las plantas a las que se les aplicó el EHA de 1 % y de las plantas testigo absoluto. La respuesta que se observó en las plantas a las que se les aplicó el EHA muestra que las concentraciones de 1 y 2 % mejoraron el desarrollo, protegiendo a las plantas de tomate aun cuando estuvieran infectadas con *Fusarium oxysporum f.*

sp. radialis-lycopersici, siendo el EHA al 2 %, el tratamiento más efectivo. El efecto del ajo como promotor de crecimiento vegetativo y reproductivo en plantas, ha sido reportado por algunos autores como Fatema y Ahmad, (2005), quienes encontraron que un extracto acuoso de ajo aplicado en plantas de cacahuate infectadas con nemátodos, mostró la mejor respuesta en el crecimiento de la planta y además evitó el desarrollo de la plaga.

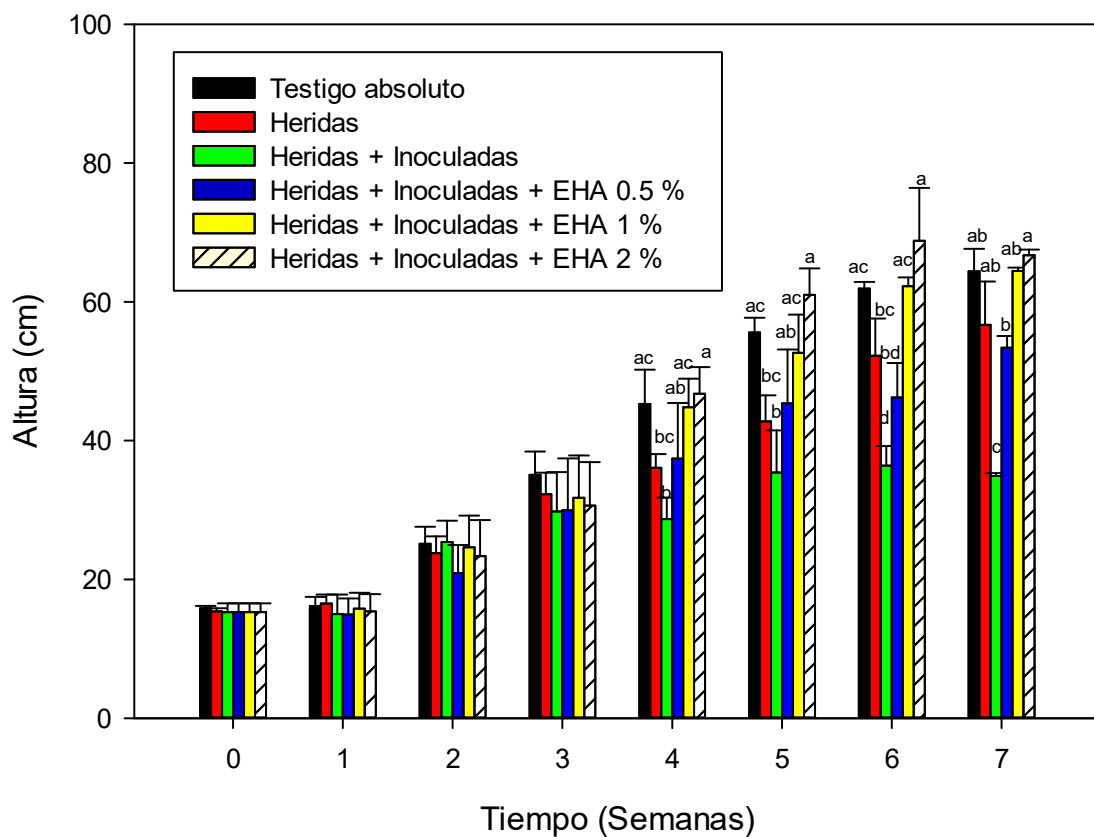


Figura 6. Evaluación de la altura de plantas de tomate, testigo e inoculadas con Forl y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo con diferentes concentraciones. Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

VI.6. Contenido de Clorofila

Las unidades de clorofila o unidades SPAD después del trasplante, fueron superior a las 40 unidades SPAD para todas las plantas. Estos valores concuerdan con diversos trabajos que reportan rangos normales de lecturas SPAD en cultivos de tomate con valores entre los 41.3 y 56.11 (uc) (Mendoza *et al.*, 1998; Ferreira *et al.*, 2006). Se puede observar que en el transcurso del experimento el índice de clorofila en las plantas testigo absoluto y en las heridas, disminuyó acorde al desarrollo de la planta (**Figura 7**).

Esta reportado por Wilcox (1994), que este comportamiento se debe al desarrollo normal de la planta ya que además de disminuir el contenido de clorofila en las hojas, disminuye también el contenido de nitrógeno por demanda de crecimiento vegetativo y para distribirse en la planta completa y en el fruto. Sin embargo, en ocasiones, un decremento en el índice de clorofila puede variar debido a diversos factores, como son el genotipo de la planta, la concentración de nitrógeno o por estrés por diversas condiciones ambientales o por la presencia de patógenos (Mendoza *et al.*, 1998; Hiderman *et al.*, 1992). Pudiendo ser esta la razón del decremento de clorofila de las plantas inoculadas en nuestro experimento (**Figura 7**), en donde en la segunda y tercera semana, las plantas inoculadas con Forl presentaron valores de clorofila significativamente menores ($p < 0.05$) que los controles.

Las plantas inoculadas que no recibieron tratamiento de EHA, no lograron recuperar los valores de clorofila durante el experimental, sin embargo, las plantas tratadas con EHA, lograron incrementar las UC. Específicamente, los valores para los tratamientos de 1 y 2 % de EHA incrementaron significativamente ($p < 0.05$), siendo superiores que los de las plantas herida + inoculadas, alcanzando valores similares al del control absoluto, esto durante la séptima semana del experimental. El índice de clorofila más alto que se presentó fue en las plantas testigo absoluto con 38.41 ± 1.01 (UC), seguido de las plantas con EHA 1 y 2 % con valores de 38.71 ± 0.44 y 36.98 ± 2.71 (uc), respectivamente (**Figura**

7). Se ha reportado que en plantas afectadas con *F. oxysporum* no logran llevar a cabo procesos fotosintéticos, ya que reduce dramáticamente la tasa de asimilación fotosintética, y posiblemente la energía absorbida se esté direccionando a procesos de fotorrespiración para reducir el daño ocasionado por las especies reactivas de oxígeno generadas en condiciones de estrés (Cruz-Aguilar *et al.*, 2012). Lo cual explicaría la disminución en la tasa de crecimiento de las plantas ante las condiciones a las que están expuestas.

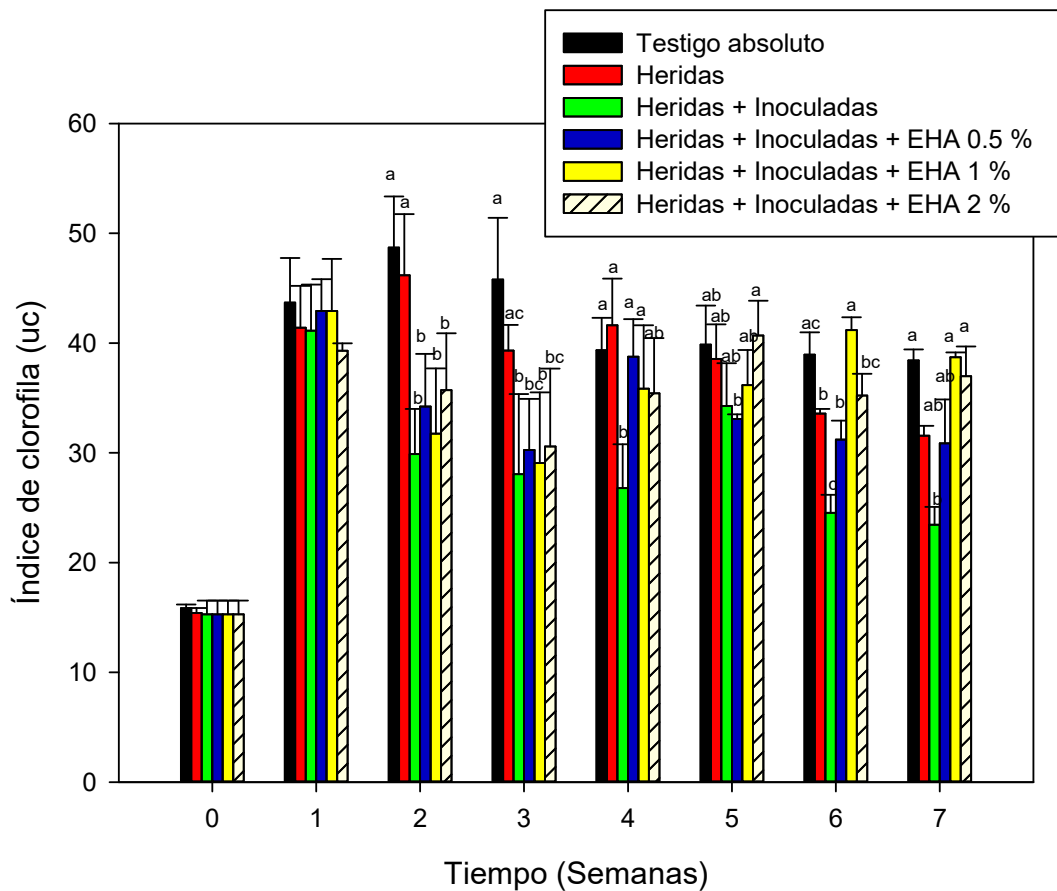


Figura 7. Contenido de clorofila en plantas de tomate, testigo e inoculadas con Forl, y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo en diferentes concentraciones. Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

VI.7. Número de Hojas

El efecto del EHA sobre el número de hojas en las plantas de tomate inoculadas con For1 se muestra en la **Figura 9**. Durante la 7^a semana del experimental las plantas testigo absoluto presentaron mayor número de hojas ($p < 0.05$), seguido de las plantas a las que se les aplicó EHA y posteriormente las heridas, estas presentaron un mayor número de hojas aunque no se encontraron diferencias significativas al compararse con las plantas inoculadas sin EHA. Las plantas a las que se les aplicó el EHA 0.5, 1 y 2 % presentaron $9.70 \pm 4.0.98$, 13.70 ± 0.70 y 14.20 ± 1.97 hojas, respectivamente. Las plantas más afectadas por el patógeno fueron las plantas heridas + inoculadas ya que presentaron menor número de hojas a los 49 DDT con 7.50 ± 2.96 hojas, mostrando diferencias significativas ($p < 0.05$) con respecto al testigo absoluto (**Figura 9**).

Se ha reportado que *F. oxysporum* produce epinastía o decaimiento de las hojas, que gradualmente se va haciendo más severa (Cruz-Aguilar *et al.*, 2012). A medida que *F. oxysporum* se desarrolla, afecta cada vez un mayor número de hojas y de ramas produciendo una defoliación severa. Este efecto se relaciona con la deshidratación ocasionada por la obstrucción del sistema hidráulico a causa de la invasión por el patógeno, así como también de la reacción de la planta al producir geles, gomas o tilosas para impedir el avance del patógeno (Cruz-Aguilar *et al.*, 2012). Los síntomas que se presentaron en las hojas de las plantas evaluadas, concuerdan con los síntomas que caracterizan la infección de *F. oxysporum*, ya que se observó marchitez en las hojas principalmente en la parte inferior extendiéndose hasta la parte superior de la planta en las plantas inoculadas causando defoliación y necrosis (**Figura 8**) (Tello y Lacasa, 1988).



Figura 8. Marchitez en plantas inoculadas con Forl.

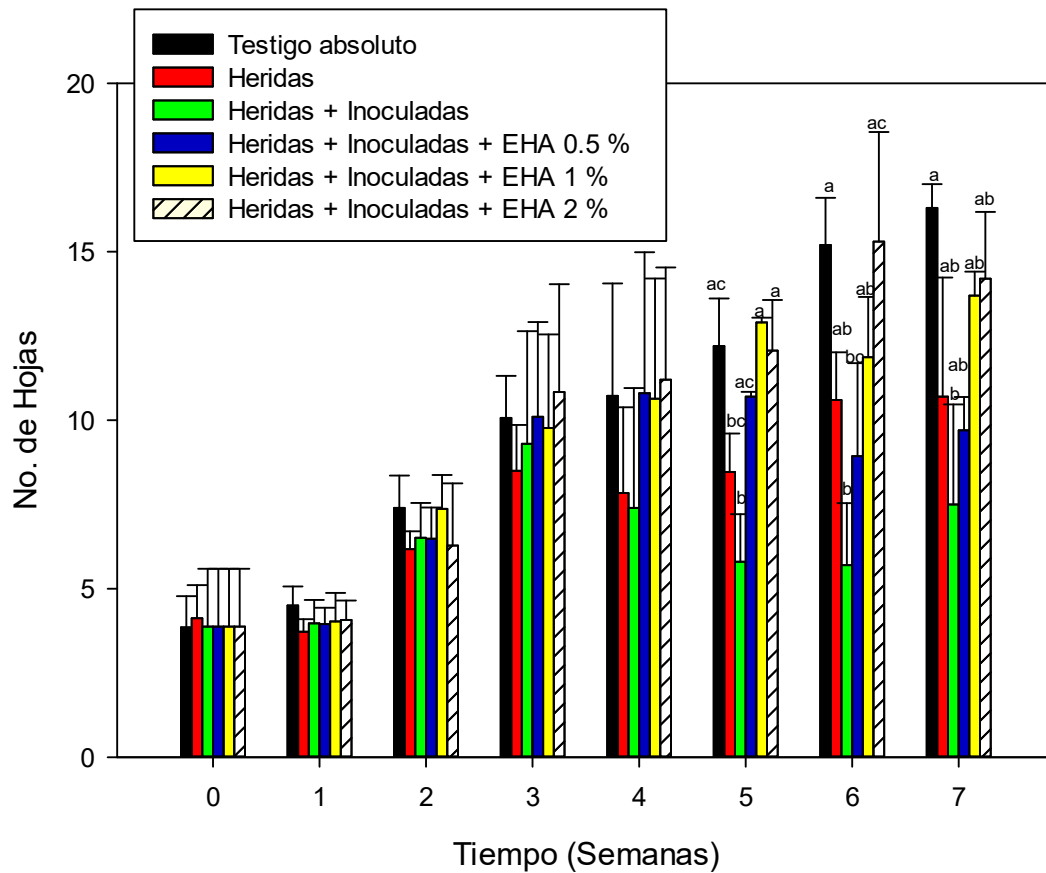


Figura 9. Número de hojas en plantas de tomate, testigo e inoculadas con Forl, y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo con diferentes concentraciones Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

VI.8. Cuantificación de Ácido Salicílico (AS)

Los resultados obtenidos en la cuantificación de ácido salicílico se muestran en la **Figura 10**. En las plantas testigo absoluto se puede observar que los niveles basales de AS detectados en el día inicial fue de $0.10 \pm 0.09 \mu\text{g g}^{-1}$, concentración menor a la detectada en las plantas heridas e inoculadas donde se obtuvo una concentración de $0.24 \pm 0.0035 \mu\text{g g}^{-1}$. Durante las últimas semanas, las plantas testigo absoluto mostraron un incremento en la acumulación de AS alcanzando la máxima concentración de $0.77 \pm 0.24 \mu\text{g g}^{-1}$ en la séptima semana, cerca de la etapa de floración. En condiciones óptimas, se ha reportado que los niveles basales de AS para plantas de la familia Solanaceae es de 0.10 hasta $10 \mu\text{g g}^{-1}$ según la especie (Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011). En tomate cv. Río Grande se ha llegado a detectar niveles basales de hasta $4 \mu\text{g g}^{-1}$ (Guzmán-Téllez *et al.*, 2014). Estudios recientes, han demostrado que los niveles endógenos basales de AS pueden aumentar de 2 a 5 veces, durante el inicio o en la transición a la floración, así como en plantas infectadas con patógenos necróticos como *Fusarium oxysporum* (Davies, 1995; Swarupa *et al.*, 2014; Rivas-San Vicente y Plasencia, 2011). Pudiendo ser esta la razón en el incremento en la concentración de AS que presentaron las plantas de tomate intencionalmente inoculadas con Forl de nuestra evaluación.

En las plantas heridas + inoculadas la concentración endógena de AS comienza a incrementar después de la cuarta semana alcanzando la máxima concentración de $0.78 \mu\text{g g}^{-1}$ en la quinta semana, superando significativamente a los demás tratamientos ($p < 0.05$). En las plantas inoculadas con Forl y tratados con EHA 1 y 2 %, la variación en la concentración de AS, muestra un incremento significativo en la tercera y sexta semana después de realizar el trasplante, para posteriormente iniciar un decremento las semanas posteriores (**Figura 10**). El máximo incremento de AS que se presentó en los tratamientos con el EHA de 1 y 2 %, concuerda con la disminución de los síntomas observados durante la evaluación de la severidad de la enfermedad (**Figura 5**). El incremento en las concentraciones de AS endógeno en las plantas con EHA de 1 y 2 %, mostró un

efecto protector contra Forl, mejorando el crecimiento y desarrollo de la planta, así como la resistencia contra el patógeno.

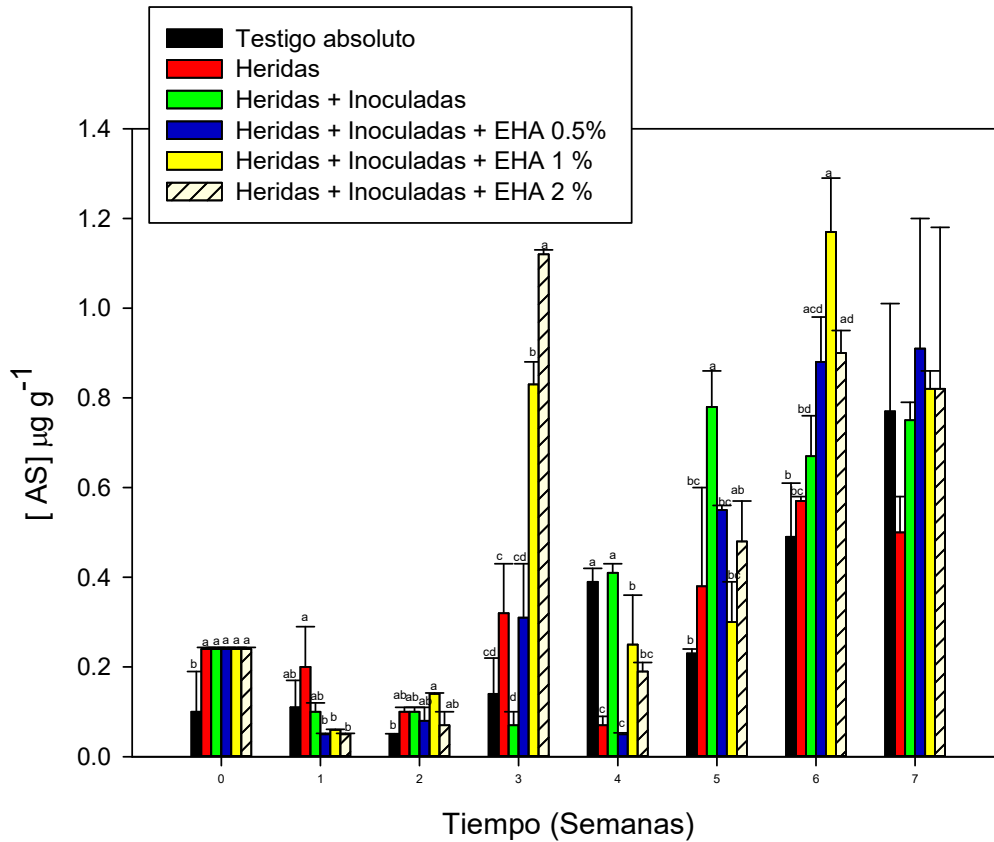


Figura 10. Concentración de AS en plantas de tomate, testigo e inoculadas con Forl, y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo en diferentes concentraciones. Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

Estudios anteriores, han reportado que el aumento endógeno de AS mejora significativamente las características de crecimiento de la planta incluyendo la altura de la planta, el número y color de las hojas, el diámetro del vástago, el peso seco y fresco de la planta, así como también la tasa fotosintética (Hayat et al., 2013). Para el caso de nuestros resultados, el incremento en la concentración de AS coincide con la mejora del desarrollo de la planta así como la resistencia al patógeno, lo que concuerda con el papel importante reportado

del AS en la acción protectora contra patógenos. Probablemente por la capacidad que tiene de inducir la transcripción de proteínas de defensa (PR) en las que codifican enzimas quitinasa, glucanasas, endohidrolasas, y β -1, 3-glucanasa para contribuir con la resistencia sistémica adquirida (RSA) contra diversos patógenos por su actividad antifúngica (Heil y Bostock, 2002; González-Morales, 2011; Hayat y Ahmad, 2007).

VI.9. Cuantificación de Ácido Jasmónico (AJ)

En la **Figura 11** se presentan los resultados obtenidos en la cuantificación de AJ en plantas de tomate sanas, heridas e inoculadas con Forl y que recibieron los tratamientos con EHA. Se puede observar que el día inicial, las plantas a las que se les realizó la herida y/o inoculadas con Forl, presentan un contenido de AJ de $0.89 \pm 0.04 \mu\text{g g}^{-1}$, significativamente mayor ($p < 0.05$) que las plantas testigo absoluto con $0.74 \pm 0.04 \mu\text{g g}^{-1}$. Estudios anteriores, demuestran que los niveles endógenos de AJ en las plantas, aumentan cuando se produce algunas situaciones de estrés por daño en la pared celular, como por heridas, sequía y por ataque por patógenos y plagas (González-Morales, 2011).

Los resultados muestran que tanto la herida como la inoculación de Forl y la aplicación de los tratamientos, provocaron un incremento en el contenido de AJ en las plantas de tomate. A partir de la segunda semana, se observó en las plantas inoculadas con el patógeno + tratadas con EHA 1 y 2 % un incremento significativo de 1.3 veces en el contenido de AJ, con respecto a las plantas heridas + inoculadas (**Figura 11**). Posteriormente, en las semanas de la cuarta a la séptima semana, el contenido de AJ fue gradualmente a la baja en todos los tratamientos, aunque conservando niveles altos, lo que nos indica que la planta está pasando por alguna situación de estrés (González-Morales, 2011). El incremento que se presentó en la concentración de AJ en la segunda y tercer semana, puede atribuirse a la aplicación de los tratamientos de 1 y 2 % de EHA,

y que estas concentraciones sean suficientes para inducir las respuestas de defensa (Montoliu-Vidal, 2010).

El AJ, juega un papel importante como mediador entre el estrés biótico y la estimulación de las respuestas de defensa junto con el AS para reducir los síntomas de la enfermedad ocasionados por Forl (Montoliu-Vidal, 2010). Se ha reportado que el AJ no participa de forma aislada en la activación de los procesos que regula sino que hay una sinergia con el AS a bajas concentraciones, lo que le permite inducir la expresión de genes involucrados en la defensa en condiciones de estrés (Díaz-Puentes, 2012), lo que concuerda con los resultados observados en el incremento de los metabolitos secundarios con la disminución de los síntomas de la enfermedad a partir de la tercera semana.

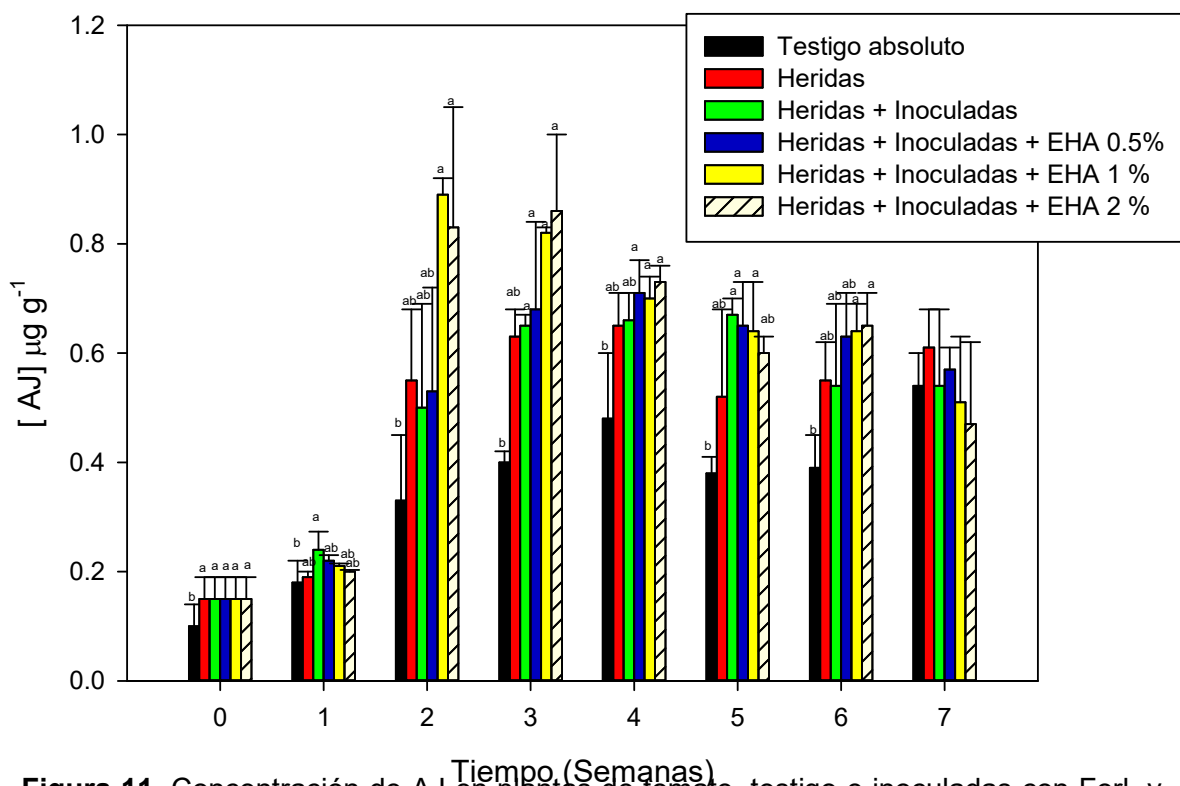


Figura 11. Concentración de AJ en plantas de tomate, testigo e inoculadas con Forl, y tratadas foliarmente con extracto hidroalcohólico de ajo en diferentes concentraciones. Letras diferentes significa diferencia significativa entre tratamientos ($p < 0.05$).

En plantas de tomate, se ha reportado que el AJ induce inhibidores de proteasas y polifenoloxidasas, mostrando un efecto en la disminución de plagas que atacan al cultivo (Michelena et al., 2005). Situación que también se ha reportado en otros cultivos por daño producido por estrés biótico y abiótico, que induce la activación de genes inhibidores de proteasas y de la vía de los fenilpropanoides como la chalcona sintasa (CHS), la fenilalanina amonio liasa (PAL) y el 3-hidroxil-3-metilglutaril-CoA reductasa (HMGR) (Creelman y Mullet, 1997). Estos genes, dan lugar a la síntesis de fitoalexinas, compuestos antimicrobianos de bajo peso molecular que se sintetizan y se acumulan en las plantas después de ser expuestos a patógenos (Montoliu-Vidal, 2010).

VII. CONCLUSIONES

La aplicación del extracto hidroalcohólico de ajo con concentración de 2 % tiene potencial como elicitador de metabolitos secundarios como AS y AJ en planta joven de tomate para resistir la infección de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*, ya que logró incrementar 14 veces la acumulación de ácido salicílico y 1.3 la de ácido jasmónico con respecto a las plantas heridas e inoculadas. Además de mejorar los parámetros de desarrollo de la planta y de reducir hasta un 73 % la severidad de la enfermedad en las plantas de tomate inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*.

VII. REFERENCIAS

1. Agrios, G.N. (2007). Fitopatología. Limusa. Segunda edición, 831 pp.
2. Ahmad-Dar T. M., Uddin M., Masroor A. and Khan, Hakeem K.R., Jaleel H. (2015). Jasmonates counter plant stress: A Review. Environmental and Experimental Botany, 115, 49-57.
3. Alexander, L. J., and Tucker, C. M. (1945). Physiologic specialization in the tomato wilt fungus *Fusarium oxysporum* f. *lycopersici*. Journal of Agricultural Research, 70(9).
4. Alexander, L. and Hoover, M. (1955). Disease resistance in wild species of tomato. Ohio Agricultural Experiment Station, 51, 1-76.
5. Alkhail, A. A. (2005). Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi. Pakistan Journal of Biological Sciences, 8(3), 413-417.
6. Álvarez-Zamorano, R. (2004). Enfermedades del tomate y chile Bell. Memorias del IV Simposio Nacional de Horticultura. Invernaderos: Diseño, Manejo y Producción,). Torreón, Coahuila, México, 69-99.
7. Anaya-Lana A. L. (2003). Ecología química. Plaza y Valdez. México. 349 pp.
8. Apodaca-Sánchez, M. A., Zavaleta-Mejía, E., Osada, K. S., y García-Espinoza, R. (2004). Pudrición de la corona del chile (*Capsicum annum* L.) en Sinaloa, México. Revista Mexicana de Fitopatología, 22, 22-29.
9. Arbona, V. and Gómez-Cadenas, A. (2008). Hormonal modulation of citrus responses to flooding. Journal of Plant Growth Regulation, 27(3), 241-250.
10. Ascencio-Álvarez, A., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Rodríguez-Herrera, S. A., Flores Olivas, A., Jiménez-Díaz, F. y Gámez-Vázquez, A. J. (2008). Marchitez vascular del tomate: I. Presencia de razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder y Hansen en Culiacán, Sinaloa, México. Revista mexicana de fitopatología, 26(2), 114-120.
11. Bayan, L., Koulivand, P. H. and Gorji, A. (2014). Garlic: a review of potential therapeutic effects. Avicenna Journal of Phytomedicine, 4(1), 1-14.
12. Beckman, C.H. (1987). The nature of the wilt diseases of plants. The American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota. USA. 80 pp.

13. Bhon, G.W. and C. M. Tucker (1939). Immunity to *Fusarium* wilt in tomato. *Science*. 89:603-604.
14. Block, E. (1985). The chemistry of garlic and onion. *Scientific American*, 251(3), 114-9.
15. Booth, C. (1971). The species of *Fusarium*. The Genus *Fusarium* spp. Commonwealth Mycological Institute Kew, Surrey, England. 130-155 pp.
16. Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, E. O., Acedo-Félix, E., Ponce, J. F., Cruz, M., Grimaldo-Juárez, O. y García-Ortega, A. M. (2009). Detección de *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis* en el tomate del estado de Sonora, México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 32(4), 319-326.
17. Bosland, P. W. (2013). *Fusarium oxysporum*, a pathogen of many plant species. *Genetics of Plant Pathogenic Fungi*, 6, 281-289.
18. Cai, G., Gale, L. R., Schneider, R. W., Kistler, H. C., Davis, R. M., Elias, K. S. y Miyao, E. M. (2003). Origin of race 3 of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* at a single site in California. *Phytopathology*, 93(8), 1014-1022.
19. Camacho A., Giles A., Ortegón M., Palao B., Serrano B. y Velázquez O. (2012). Técnicas para el análisis microbiológico de alimentos. Segunda edición. Facultad de Química. UNAM, 1-9.
20. Carrillo-Fasio J. A., Montoya-Rodríguez T. J., García-Estrada R. S., Cruz-Ortega J. E., Márquez-Zequera I. y Sanduño-Barajas, J. (2003). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* Snyder y Hansen, en Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) en el Valle de Culiacán, Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21 (2):123-127.
21. Cifuentes, D., Marquina, J. T. y Anadón, J. L. C. (1994). Diferenciación de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* y su detección en planta mediante marcadores RAPD. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*, 20(4), 919-926.
22. Clavijo-Castro S.D. (2014). Búsqueda de resistencia a la pudrición causada por *Fusarium* spp. en Capsicum. Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. Palmira, Colombia, 75 pp.
23. Córdova-Betancourt M. A. (2012). Extracción y purificación de alicina a partir de ajo (*Allium sativum* L.): Implicaciones analíticas. Tesis de Maestría en Ciencias, Instituto Politécnico Nacional, Santa Cruz, Xoxocotlán, Oaxaca, 80 pp.
24. Creelman, R. A. and Mullet, J. E. (1997). Biosynthesis and action of jasmonates in plants. *Annual review of plant biology*, 48:355-81.
25. Cruz-Aguilar M., Hoyos-Carvajal L. y Mellgarejo L. M. (2012). Respuesta fisiológica y bioquímica de gulupa (*Pasiflora edulis sims*) afectada por fusariosis

(*Fusarium spp.*). Tesis de Maestría en Ciencias Agrarias con Énfasis en Fisiología de Cultivos. Universidad Nacional de Colombia. Bogotá, Colombia.

26. Cruz-Ponce, P. (2013). Hortalizas. Obtenido de <http://www.hortalizas.com/horticultura-protegida/produccion-de-tomates-en-invernadero-en-mexico/> [Acceso 16/08/16].
27. Davies P.J. (1995). Plant Hormones. Physiology, Biochemistry and Molecular Biology. Dordecht: Kluwer Academic Publishers: New York, 486-508.
28. Díaz-Puentes, L. N. (2012). Resistencia sistémica adquirida mediada por el ácido salicílico. Biotecnología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial, 10(2).
29. Domínguez G. (2012). Aislamiento, identificación y distribución de *Fusarium spp.* en jitomate cultivado en suelo bajo invernadero Morelos, México. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Morelos, México.
30. El-Ghany, A., Roushdy, M. M. and Mohamed, A. A. (2015). Efficacy of certain plant extracts as safe fungicides against phytopathogenic and mycotoxigenic fungi. Agriculture and Biological Sciences Journal, 1(3), 71-75.
31. FAO (2012). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/010/i0142s/i0142S06.pdf> [Acceso 6/Abril/2015].
32. FAO (2013). El cultivo de tomate con buenas prácticas agrícolas en la agricultura urbana y periurbana, s.l.: s.n. Disponible en: <http://www.fao.org/3/a-i3359s.pdf>. [Acceso 3/Abril/2015].
33. Fatema, S. and Ahmad, M. U. (2005). Comparative efficacy of some organic amendments and a nematicide (Furadan-3G) against root-knot on two local varieties of groundnut. Plant Pathology Journal, 4(1), 54-57.
34. Ferreira, M. M. M., Ferreira, G. B., Fontes, P. C. R. and Dantas, J. P. (2006). Índice spad e teor de clorofila no limbo foliar do tomateiro em função de doses de nitrogênio e da adubação orgânica, em duas épocas de cultivo/spad index and chlorophyll content in tomato leaves as a function of nitrogen doses and organic fertilization. Ceres, 53(305).
35. Fu, Z. Q. and Dong, X. (2013). Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense. Annual review of plant biology, 64, 839-863.
36. Gándara-Ledezma, A., Corrales-Maldonado, C., Rivera-Domínguez, M., Martínez-Télez, M. Á. and Vargas-Arispuro, I. (2015). Post-harvest control of gray mold in table grapes using volatile sulfur compounds from *Allium sativum*. Journal of the Science of Food and Agriculture, 95(3), 497-503.
37. Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annual Review Phytopathology, 43, 205-227.

38. Gómez-Lim M. A. (2002). Genes involved in plant defences mechanisms. *Fruit and Vegetable Biotechnology*, 4, 114-135.
39. González, I., Yailén, A. and Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*-tomate. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1), 1-7.
40. González-Morales S. (2011). Respuesta de defensa relacionada con la aplicación del extracto de *Heliopsis longipes* en la patosistema tomate- *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. Tesis Doctoral en Ciencias en Parasitología Agrícola. Universidad Autónoma Agraria, Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México.
41. Gozzo, F. and Faoro, F. (2013). Systemic acquired resistance (50 years after discovery): moving from the lab to the field. *Journal of agricultural and food chemistry*, 61(51), 12473-12491.
42. Grattidge, R. and R. G. O'Brien (1982). Occurrence of a third race of *Fusarium* wilt of tomatoes in Queensland. *Plant Disease*, 66:165-166.
43. Gurjar, M. S., Ali, S., Akhtar, M. and Singh, K. S. (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*, 3(3), 425.
44. Guzmán-Téllez, E., Montenegro, D. D. and Benavides-Mendoza, A. (2014). Concentration of salicylic acid in tomato leaves after foliar aspersions of this compound. *American Journal of Plant Sciences*, 5, 2048-2056.
45. Hayat S. and Ahmad A. (2007). *Salicylic acid. A plant hormone*. Springer. India.
46. Hayat S., Ahmad A. and Nasser-Alyemeni M. (2013). *Salicylic Acid. Plant Growth and Development*. Springer. New York, USA.
47. Heil, M. and Bostock, R. M. (2002). Induced systemic resistance (ISR) against pathogens in the context of induced plant defenses. *Annals of botany*, 89(5), 503-512.
48. Hernández C.F.D., De la Garza M. G., Gallegos M. G., Padrón C. E., Sánchez A. A. y Lira S. R. H. (2005). Efectividad biológica de bacterias rizosféricas esporuladas sobre el complejo de hongos de la marchitez del chile. *Phyton International Journal of Experimental Botany* 170-180.
49. Hernández R. y Rangel E. A. (2012). Búsqueda de cepas de antagonistas a hongos causantes de marchitez vascular en tomate. *Revista Electrónica de Divulgación de la Investigación. Revista de la Universidad del SABES*. 2, 1-9.
50. Hernández-Martínez, R., López-Benítez, A., Borrego-Escalante, F., Espinoza-Velázquez, J., Sánchez-Aspeytia, D., Maldonado-Mendoza, I. E. y López-Ochoa, L. A. (2014). Razas de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en predios tomateros en San Luis Potosí. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 5(7), 1169-1178.

51. Hiderman, J., Makino, A., Kurita, Y., Mae, T. and Ojima, K. (1992). Changes in the levels of chlorophyll and light-harvesting chlorophyll a/b protein of PS II in rice leaves aged under different irradiances from full expansion through senescence. *Plant and cell physiology*, 33(8), 1209-1214.
52. Iberl, B., Winkler, G. and Knobloch, K. (1990). Products of alliin transformation: ajoenes and dithiins, characterization and their determination by HPLC. *Planta Medica*, 56(02), 202-211.
53. Jansen, H., Müller, B. and Knobloch, K. (1987). Alliin characterization and its determination by HPLC. *Planta Médica*, 53(06), 559-562.
54. Jarvis W. R., Thorpe H. and MacNeil B. H. (1975). A food and root disease of tomato caused by *Fusarium oxysporum*. *Canadian Plant Disease Survey Report*. 60: 1027-1031.
55. Kachroo, A. and Robin, G. P. (2013). Systemic signaling during plant defense. *Current opinion in plant biology*, 16(4), 527-533.
56. Kalia P. and M. Palansiamy (2014). Tomato. Alien gen transfer in crop plants. 2, 347-380.
57. Krikun, J., Nachmias, A., Cohn, R. and Lahkim-Tsrer, L. (1982). The occurrence of *Fusarium* crown and root rot of tomato in Israel. *Phytoparasitica*, 10(2), 113-115.
58. Kyung, K. H. (2012). Antimicrobial properties of allium species. *Current opinion in biotechnology*, 23(2), 142-147.
59. Lanzotti, V., Bonanomi, G. and Scala, F. (2013). What makes *Allium* species effective against pathogenic microbes?. *Phytochemistry reviews*, 12(4), 751-772.
60. Lawson, L. D., Wang, Z. Y. J. and Hughes, B. G. (1991). Identification and HPLC quantitation of the sulfides and dialk(en)yl thiosulfinates in commercial garlic products. *Planta médica*, 57(04), 363-370.
61. Leary J.V. and Endo R. M. (1971). *Fusarium*-induced root rot of staked tomatoes. *Phytopathology*. 61, 900.
62. León G. H. y Arosamena D. M. (1980) El cultivo de tomate para consumo en fresco en el Valle de Culiacán. Sin. SARH-INIA-CAEVACU. 125 p.
63. Lin, Y. M., Shih, S. L., Lin, W. C., Wu, J. W., Chen, Y. T., Hsieh, C. Y. and Cheng, C. P. (2014). Phytoalexin biosynthesis genes are regulated and involved in plant response to *Ralstonia solanacearum* infection. *Plant Science*, 224, 86-94.
64. Londhe, V. P. (2011). Role of garlic (*Allium sativum*) in various diseases-an overview. *Journal of pharmaceutical research and opinion*, 1(4).

65. Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F. and Kazan, K. (2013). *Fusarium* pathogenomics. Annual review of microbiology, 67, 399-416.
66. Malathrakis, N. E. (1985). Tomato crown and root rot caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici* in Greece. Plant pathology, 34(3), 438-439.
67. Mandal, S., Mallick, N. and Mitra, A. (2009). Salicylic acid-induced resistance to *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in tomato. Plant Physiology and Biochemistry, 47(7), 642-649.
68. Marlatt, M. L., Correll, J. C., Kaufmann, P. and Cooper, P. E. (1996). Two genetically distinct populations of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* race 3 in the United States. Plant Disease, 80(12), 1336-1342.
69. Martínez, J. A. (2012). Natural fungicides obtained from plants. Fungicides for Plant and Animal Diseases. 2, 3-18.
70. Masee G. (1895). The "sleepy disease" of tomatoes. Gardeners' Chronicle 3 (17), 705-707.
71. McGovern, R. J. (2015). Management of tomato diseases caused by *Fusarium oxysporum*. Crop Protection, 73, 78-92.
72. McGrath, D.J. (1988). BHRS 2-3 *Fusarium* wilt-resistant tomato. HortScience. 23:1093-1094.
73. Mendoza, M., González, G. A., Santelises, A. A., Etcheveres, J. D., y Rincón, J. A. (1998). Estimación de la concentración de nitrógeno y clorofila en tomate mediante un medidor portátil de clorofila. Terra, 16, 135-141.
74. Mes, J. J., Van Doorn, A. A., Wijbrandi, J., Simons, G., Cornelissen, B. J. and Haring, M. A. (2000). Expression of the *Fusarium* resistance gene I-2 colocalizes with the site of fungal containment. The Plant Journal, 23(2), 183-193.
75. Michelena, G., Almeida, G., Altuna, B., Eng, F., Legrá, S., Oliveros, M. y Armenteros, S. (2005). Efecto inhibitor del ácido jasmónico sobre el crecimiento de bacterias y hongos. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal. 39 (3): 3-7.
76. Michielse, C. B. and Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. Molecular plant pathology, 10(3), 311-324.
77. Montoliu Vidal, A. (2010). Respuestas fisiológicas de los cítricos sometidos a condiciones de estrés biótico y abiótico. Aspectos comunes y específicos. Tesis Doctoral en Ingeniera Agrónoma. Universitat Jaume I, Castellón de la Plana, Valencia, España, 196 pp.
78. Navarro, M. C. (2007). Posibilidades terapéuticas del bulbo de ajo (*Allium sativum*). Revista de Fitoterapia, 7(2), 131-151.

79. Madriz-Ordeñana, K. M. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Revista Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica, 63, 22-32.
80. Pawar, V. C. and Thaker, V. S. (2006). Evaluation of the Anti-*Fusarium oxysporum* f. sp. *cicer* and Anti-*Alternaria Porri* Effects of Some Essential Oils. *World Journal Microbiology Biotechnology*.
81. Peñuelas-Rubio O. (2014). Evaluación de extractos de *Larrea tridentata* sobre el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopercisis* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.) bajo condiciones de invernadero. Tesis Doctoral en Ciencias en Especialidad en Biotecnología. Instituto Tecnológico de Sonora. Cd. Obregón, Sonora. 119 pp.
82. Ramaiah, A. K. and Garampalli, R. K. H. (2015). In vitro antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 5(1), 22-27.
83. Rangel-Sánchez, G., Castro-Mercado, E., Reyes de la Cruz, H. y García-Pineda, E. (2010). El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Revista de la DES Ciencias Biologicas Agropecuarias*, 12(2), 90-95.
84. Reho A. I. (2014). Sonora avanza en agricultura protegida. <http://www.hortalizas.com/horticultura-protegida/sonora-avanzando-en-la-agricultura-protegida/>. [Acceso 24/05/2015].
85. Rivas-San Vicente, M. and Plasencia, J. (2011). Salicylic acid beyond defence: its role in plant growth and development. *Journal of Experimental Botany*, 62(10), 3321-3338.
86. Riveros Angarita, A. S. (2010). Inducción de Resistencia en Plantas. Ibagúe, Tolima, Colombia: Universidad de Tolima. Pp 237.
87. Roberts P. D., Mcgovern R. J. and Datnoff L. (1995). *Fusarium* crown and root rot of tomato in Florida. Ed. Cooperative Extension Service. University of Florida, 2-3 pp.
88. SAGARPA (2010). Monografía de Cultivos. Jitomate, s.l.: Subsecretaría de Fomento a los Agronegocios <http://www.sagarpa.gob.mx/agronegocios/Estudios/Paginas/monografias.aspx> [Acceso: 18/01/2016].
89. SAGARPA, 2015. Atlas Agroalimentario 2015. http://nube.siap.gob.mx/publicaciones_siap/pag/2015/Atlas-Agroalimentario-2015. [Acceso: 16/08/16].
90. Sagitov, A.O., El-Habbaa G. M. and El-Fiki I. A. (2011). Studies on tomato wilt caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* in Kazachestan. Effect of exogenous application of garlic and black peper extracts as resistance inducer treatments on the wilt disease incidence and some plant growth parameters. *Исследования Результаты (КазНАУ), г. Алматы, 2011. 1(049), 113-119.*

91. Salas-Gómez A. L. (2013). Efecto del extracto de *Jatropha dioica* Sessé en el control de *Fusarium oxysporum* en tomate (*Solanum lycopersicum* L.). Tesis de Maestría en Ingeniería de Sistemas de Producción. Universidad Autónoma Agraria, Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, 87 pp.
92. Sbaihat, L., Takeyama, K., Koga, T., Takemoto, D. and Kawakita, K. (2015). Induced resistance in *Solanum lycopersicum* by algal elicitor extracted from *Sargassum fusiforme*. *The Scientific World Journal*, 5, 1-9.
93. Secretaría de Desarrollo Agropecuario (2011). Cultivo de jitomate. Investigación y Capacitación Agropecuaria. http://portal2.edomex.gob.mx/icamex/investigacion_publicaciones/horticola/jitomate/index.htm [Acceso: 03/04/2016]
94. Şesan, T. E., Enache, E., Iacomi, B. M., Oprea, M., Oancea, F. and Iacomi, C. (2015). Antifungal activity of some plant extracts against *Botrytis cinerea* Pers. in the blackcurrant crop (*Ribes nigrum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 14, 29-43.
95. Shah, J. and Zeier, J. (2013). Long-Distance Communication and Signal Amplification in Systemic Acquired Resistance. *Frontiers in Plant Science*, 4, 1-16.
96. Singh M., S. Ali, M. Akthat y K. Suraj (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*. 3, 425-433.
97. Singha, I. M., Kakoty, Y., Unni, B. G., Kalita, M. C., Das, J., Naglot, A. and Singh, L. (2011). Control of *Fusarium* wilt of tomato caused by *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* using leaf extract of *Piper betle* L.: a preliminary study. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 27(11), 2583-2589.
98. Slusarenko, A. J., Patel, A. and Portz, D. (2008). Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. *European Journal of Plant Pathology*, 121(3), 313-322.
99. Swarupa, V., Ravishankar, K. V. and Rekha, A. (2014). Plant defense response against *Fusarium oxysporum* and strategies to develop tolerant genotypes in banana. *Planta*, 239(4), 735-751.
100. Szczechura, W., Staniaszek, M. and Habdas, H. (2013). *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*—the cause of fusarium crown and root rot in tomato cultivation. *Journal of plant protection research*, 53(2), 172-176.
101. Tello J. C. y Lacasa A. (1988). "La podredumbre del cuello y de las raíces", causada por *Fusarium oxysporum* f. s.p. *radicis-lycopersici*, nueva enfermedad en los cultivos de tomate (*Lycopersicum esculentum* Mill.) españoles. *Boletín de sanidad vegetal. Plagas*. 14:307-312
102. Townsend, G. and Heuberguer, J. (1943). Methods for estimating losses caused by diseases in fungicide experiments. *Plant Disease Reporter* 60:340-343.

103. Ubaldo-Vázquez G. (2014). Actividad antifúngica del extracto etanólico de *Flourensia cernua* DC para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* en el cultivo de tomate. Tesis de Maestría en Ingeniería de Sistemas de Producción. Universidad Autónoma Agraria, Antonio Narro, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México, 147 pp.
104. Van Doorn, W. G., Beers, E. P., Dangl, J. L., Franklin-Tong, V. E., Gallois, P., Hara-Nishimura, I. and Mur, L. A. J. (2011). Morphological classification of plant cell deaths. *Cell Death and Differentiation*, 18(8), 1241-1246.
105. Vargas-Arispuro, I., Corrales-Maldonado, C., and Martínez-Téllez, M. Á. (2008). Compounds derived from garlic as bud induction agents in organic farming of table grape. *Chilean journal of agricultural research*, 68(1), 94-101.
106. Vidhyasekaran, P. (2015). Plant hormone signaling systems in plant innate immunity). *Signaling and communication plants*, 2, 27-244.
107. Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J. M. y Martínez-Escudero, E. (2014). Situación Actual en el Control de *Fusarium spp.* y Evaluación de la Actividad Antifúngica de Extractos Vegetales. *Acta Agronómica*, 64(2), 194-205.
108. Vos, I. A., Pieterse, M. J. and Van-Wees, C. M. (2013). Costs and Benefits of Hormone-Regulated Plant Defenses. *Plant Pathology*, 62, 43-55.
109. Wilcox, E. G. (1994). Tomato. Nutrient deficiencies of toxicities in crop plants. APS Press. American Phytophthological Society, 127-141.
110. Wolski, E. A., Henriquez, M. A., Adam, L. R., Badawi, M., Andreu, A. B., El Hadrami, A. and Daayf, F. (2010). Induction of defense genes and secondary metabolites in saskatoons (*Amelanchier alnifolia* Nutt.) in response to *Entomosporium mespili* using jasmonic acid and Canada milkvetch extracts. *Environmental and Experimental Botany*, 68, 273-282.
111. Yamamoto I., Komada H., Kuyasu K., Saito M. and Ezuka A. (1974). A new race of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* inducing root rot of tomato. *Proceedings of the Kansai Plant Protection Society*, 16:17-29.
112. Yang, D. L., Yang, Y. and He, Z. (2013). Roles of plant hormones and their interplay in rice immunity. *Molecular plant*, 6(3), 675-685.