

MÉTODOS DE INOCULACIÓN Y EVALUACIÓN DE EXTRACTOS BOTÁNICOS E ISOTIOCIANATOS DE LA FAMILIA BRASSICACEAE EN EL CONTROL DE LA ROYA DEL GLADIOLO

S. Ortega-Centeno¹; D. Guillén-Sánchez¹;
M. Ramos-García²; R. Troncoso-Rojas³;
R. Villanueva-Arce⁴; E. Bosquez-Molina⁵;
L. L. Barrera-Necha²; S. Bautista-Baños^{2†}

¹Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Morelos, Campus Oriente. Nicolás Bravo s/n. Parque Industrial Cuautla, Xalostoc, Morelos, C.P. 91690. MÉXICO

²CEPROBI-IPN. Carr. Yauatepec-Jojutla km. 8.5 San Isidro Yauatepec, Morelos C. P. 63731. MÉXICO; Correo-e: sbautis@ipn.mx ([†]Autora responsable)

³CIAD. Apdo. Postal 1735, Carr. a la Victoria km. 0.6 Col. Ejido La Victoria, Hermosillo, Sonora C. P. 83000. MÉXICO

⁴UPIBI-IPN. Av. Acueducto s/n, Barrio La Laguna, Ticomán. C. P. 07340. D. F. MÉXICO

⁵Universidad Autónoma Metropolitana-Iztapalapa, Av. San Rafael Atlixco 186 Michoacán y la Purísima, Col. Vicentina. C. P. 09340. D. F. MÉXICO

RESUMEN

La roya del gladiolo causada por *Uromyces transversalis* (Thümen) G. Winter, es una enfermedad de importancia cuarentenaria para México. Este hongo se controla mediante continuas aplicaciones de fungicidas químicos lo cual puede provocar resistencia, así como daños a la salud humana y contaminación al medio ambiente.

Los objetivos de este estudio fueron: identificar métodos adecuados de inoculación de *U. transversalis* en plantas de gladiolo en condiciones de laboratorio e *in vivo*, identificar los isotiocianatos principales presentes en los extractos provenientes de plantas de la familia Brassicaceae y conocer su potencial fungicida junto con el de los isotiocianatos de bencilo y fenilo sobre *U. transversalis* en condiciones de campo e invernadero.

Los experimentos se llevaron a cabo en los municipios de Yauatepec y Ayala, Morelos y en el Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional.

Las variables evaluadas en campo fueron índice de severidad, área afectada, porcentaje de infección y progreso de la enfermedad, en invernadero sólo las dos últimas. Los métodos de inoculación por aspersión y nebulización permitieron la infección en tres y dos plantas, respectivamente. Los principales isotiocianatos presentes en los extractos alcohólicos aplicados fueron el fenilo, bencilo, 2-feniletilo, alilo y propilo. En los experimentos realizados en Yauatepec y Ayala, se determinó que las plantas tratadas con los extractos a la concentración de 0.1 %, tuvieron un porcentaje de infección menor que las tratadas con las concentraciones al 0.2 y 0.5 %. En condiciones de invernadero, los isotiocianatos de fenilo y bencilo ejercieron un buen control del hongo. No se observó fitotoxicidad en las plantas tratadas con los extractos e isotiocianatos en condiciones de invernadero y en campo.

PALABRAS CLAVE ADICIONALES: *Uromyces transversalis* (Thümen) G. Winter, productos naturales

GLADIOLUS RUST INOCULATION METHODS AND EVALUATION OF ISOTHIOCYANATES OF BOTANICAL EXTRACTS FROM PLANTS OF THE BRASSICACEAE FAMILY IN RUST CONTROL

ABSTRACT

Gladiolus rust caused by *Uromyces transversalis* (Thümen) G. Winter is listed as a major quarantine disease in Mexico. In Mexico, this fungus is controlled by continuous fungicide applications, which can result in fungus resistance, risk to human health and environmental

pollution. The objectives of this research were to identify the most adequate method of artificial inoculation of *U. transversalis* on gladiolus plants under laboratory conditions and *in vivo*, to identify the main isothiocyanates of the extracts from plants of the Brassicaceae family, and to determine their fungicidal potential together with the isothiocyanates of benzyl and phenyl to control this fungus under field and greenhouse conditions. Experiments were carried out in the regions of Yautepec and Ayala, Morelos, Mexico, and at the Center for Development of Biotic Products (CEPROBI) at the Instituto Politécnico Nacional. The main parameters evaluated in the field were disease severity, affected area, percentage infection and disease progress. In the greenhouse only percentage of infection and disease progress were studied. The results associated with artificial inoculation by the methods of spraying and steaming resulted in infection of 2 to 3 plants. The main isothiocyanates identified in the extracts applied were phenyl, benzyl, 2-phenylethyl, alyl and propyl. In the experiments carried out in Yautepec and Ayala, plants treated with the extract at the concentration of 0.1 % had a lower percentage infection than those treated at 0.2 % and 0.5%. Under greenhouse conditions, the isothiocyanates of phenyl and benzyl exerted good control of the fungus. In plants treated with extracts and isothiocyanates under greenhouse and field conditions no phytotoxicity was observed.

ADDITIONAL KEY WORDS *Uromyces transversalis* (Thümen) G. Winter, natural products,

INTRODUCCIÓN

El gladiolo (*Gladiolus* sp.) es una de las flores más importantes en el mundo. Ocupa el quinto lugar entre las plantas bulbosas y es una de las más apreciadas dentro de las ornamentales por la diversidad de sus colores (Linares 2004; Beltrán, 2005)). En México, la producción de gladiolo se concentra en algunos estados, siendo el Estado de México el principal productor de flores de corte (80 % de la producción nacional). Actualmente, Morelos se ha convertido en un estado productor importante. Los principales municipios productores en este estado son: Yautepec, Ciudad Ayala, Huitzilac y Coatlán del Río con una superficie de 500 ha aproximadamente dedicadas a las variedades 'Blanca Espuma', 'Blanca Borrego', 'Roja Borrego', 'Rosa Blanca' y 'Salmón', principalmente (Cabrera y Orozco, 2003).

Los principales problemas fitosanitarios son causados por hongos, siendo actualmente *Uromyces transversalis* (Thümen) G. Winter, el patógeno más importante causante de la roya del gladiolo; una de las enfermedades más destructivas ya que puede ocasionar pérdidas del 100 % de la producción y hace imposible su cultivo sin el uso de fungicidas (Ferreira, 1989). En México, su presencia fue detectada en noviembre de 2004, en los estados de México, Puebla y Morelos (SAGARPA, 2005a) y posteriormente en Michoacán, Guerrero, Oaxaca, Sinaloa y Veracruz (Brown, 2005). Dentro de las alternativas de control de esta enfermedad, se tiene el uso de variedades resistentes como 'Melody', 'Chopin', 'White goddess', entre otras (Garibaldi y Aloj, 1980). Otros autores reportan que las aplicaciones semanales de fungicidas comerciales como Flint® 50 Gs, Plantvax®, Captan®, Amistar® 50 y Manzate®, han tenido un control significativo de la enfermedad junto con la quema de residuos (Garibaldi y Aloj, 1980; SAGARPA, 2005b; CESVMOR, 2006).

En la naturaleza, los diferentes tipos de roya son consideradas como parásitos obligados, pero algunas de ellas pueden crecer bien en medios de cultivo especiales a nivel laboratorio (Agris, 2007), y aunque la producción de

inóculo es relativamente sencilla, los métodos de inoculación pueden variar porque la deposición directa de las uredosporas sobre el tejido susceptible, no garantiza que el proceso de infección sea efectivo por fallas durante la germinación y crecimiento del hongo, así como por la estructura física del tejido (Ferreira y Rijkenberg, 1991).

Actualmente, existe la tendencia de utilizar menos agroquímicos sintéticos en la agricultura, lo que ha motivado investigaciones que generen alternativas más 'amigables' con el medio ambiente, menos tóxicas para la salud humana y con menor probabilidad de generar resistencia en los hongos (Bautista-Baños *et al.*, 2000). De esta manera, el uso de técnicas naturales y biológicas basadas en la aplicación de compuestos naturales de origen animal o vegetal ha tomado auge (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007). Grainge y Ahmed (1988), mencionaron que se conocen aproximadamente 2,400 especies vegetales con propiedades fungicidas, nematocidas, bactericidas e insecticidas; de las cuales cerca de 400 presentan propiedades fungicidas contra 142 diferentes especies de hongos fitopatógenos. Sin embargo, las familias con mayor potencial fungicida son: Apiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Fabaceae, Lamiaceae, Ranunculaceae y Rosaceae entre otras. Monfort *et al.* (2007), reportaron que las especies de Brassicaceae como el nabo (*Brassica napus* L.), brócoli (*B. oleracea* L.), rábano (*Raphanus sativus* L.) y espinaca (*Spinacia oleracea* L.), pueden ser una alternativa viable a la utilización del bromuro de metilo contra microorganismos del suelo

Las propiedades antifúngicas de las plantas de la familia Brassicaceae se atribuyen principalmente a los isotiocianatos que se forman al ser dañadas, los cuales son responsables en parte de su particular sabor y están entre los agentes naturales del control orgánico más efectivos de enfermedades causadas por hongos (Stoewsand, 1995; Smolińska *et al.*, 1997; 2003; Shapiro *et al.*, 2005). Estos compuestos son productos de amplio espectro, biodegradables que no inducen resistencia en hongos (Troncoso *et al.*, 2005). Se ha reportado que algunas mezclas comerciales de isotiocianatos fueron efectivas en

el control e inhibición del crecimiento micelial de algunos hongos fitopatógenos y del suelo tales como *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, *Monilinia laxa* (Adher. et Ruhl.), *Mucor piriformis* Fisch., *Penicillium expansum* Link, *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.; Ex.) Fr. Lind., *Rhizoctonia solani* Kühn, y *Fusarium oxysporum* Schlecht, los cuales inhibieron la germinación de clamidosporas de este último y de las oosporas de *Pythium irregulare* Buisman (Shetty *et al.*, 2000; Smolinska *et al.*, 2003; Tiznado Hernández y Troncoso-Rojas, 2006; Sellam *et al.*, 2007).

Los objetivos de este estudio fueron: 1) evaluar diferentes métodos de inoculación de *U. transversalis*, 2) identificar los principales isotiocianatos presentes en los extractos evaluados y 3) evaluar el potencial fungicida de extractos botánicos provenientes de la familia Brassicacea e isotiocianatos en el control de la roya del gladiolo en campo e invernadero.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención y preparación del inóculo

Urediniosporas de *U. transversalis* se colectaron directamente de hojas de gladiolo cultivadas en el ejido 'El Chirimoyo' en Yautepec, Morelos. Las pústulas se localizaron en las hojas primarias infectadas, las cuales se cortaron desde la base y colocaron en hojas de papel periódico en cajas tipo Walter con perforaciones para trasladarse al laboratorio de Fitopatología del Centro de Desarrollo de Productos Bióticos (CEPROBI) del Instituto Politécnico Nacional en Yautepec, Morelos. Las hojas infectadas se colocaron en prensas. Cuando las hojas estaban completamente secas, aproximadamente 15 días después de la colecta, se extrajeron las urediniosporas por raspado de las pústulas con una aguja de disección esterilizada y se almacenaron en frascos color ámbar de 10 mL a temperatura ambiente (25 °C) para su uso posterior. Las urediniosporas se colocaron en un vaso de precipitados, se les agregó agua destilada esterilizada (20 mL) y unas gotas de Tween 20® (0.05 %) hasta formar una solución anaranjada. Con la ayuda de un hemacitómetro, se contó el número de urediniosporas en la solución, la cual contenía aproximadamente 2×10^5 urediniosporas mL⁻¹.

Evaluación de métodos de inoculación de *U. transversalis*

a) *Inoculación en porciones de hoja*. Se colectaron hojas de plantas sanas de las variedades 'Rosa Blanca', 'Blanca Espuma', 'Salmón' y 'Amarilla'. Siguiendo la metodología modificada de Hsiang *et al.* (2004), se cortaron trozos de hoja (4-7 cm de largo), se desinfectaron con hipoclorito de sodio (1 %), y se lavaron con agua destilada esterilizada. Al mismo tiempo, se cortaron círculos de papel filtro (10 cm de diámetro) los cuales se humedecieron en ácido giberélico y se colocó dentro de cada caja de Petri.

Los métodos de inoculación fueron tres: por suspensión, contacto y transferencia. En el caso de la suspensión, se realizó una punción (herida) en las hojas con una aguja de disección esterilizada en donde se depositaron aproximadamente 0.5 mL de la suspensión de urediniosporas (2×10^5). En el método por contacto, los trozos de hojas con herida, se inocularon por frotación con hisopos esterilizados humedecidos con la solución de urediniosporas. En el método por transferencia, los trozos de hojas sanas se frotaron con hojas infectadas (Hsiang *et al.*, 2004). Las porciones de hoja inoculadas se colocaron en cajas Petri, las cuales se sellaron e incubaron en condiciones de luz artificial, oscuridad, y luz fluorescente (2,700 lux) a temperatura ambiente (28 ± 2 °C) durante todo el periodo de incubación. Se realizaron cuatro repeticiones en cada caso y por variedad en un arreglo completamente al azar. El experimento se repitió dos veces.

b) *Pruebas en macetas*. Se utilizaron plantas de gladiolo de la variedad 'Peter Pears' por ser de las variedades más susceptibles a la roya. Los cormos se plantaron en macetas de 25.4 cm en una mezcla comercial a base de lombricomposta (Fernatol®), Turba (Sun Shine Mix® 3) y fibra de coco en proporción 50:30:20. Las plantas se colocaron bajo condiciones de laboratorio (25 °C \pm 2, 80 % HR) o invernadero (28 °C \pm 2, 70 % HR). Las inoculaciones se realizaron una vez que las plantas comenzaron a formar la espiga floral (tres meses). En estas pruebas, se evaluaron cuatro métodos de inoculación: espolvoreo, inyección, aspersión y nebulización (Roelfs *et al.*, 1992). En el método por espolvoreo, una vez que las hojas se limpiaron con agua destilada, el inóculo (aproximadamente, 1.8×10^6 urediniosporas) se mezcló con talco comercial (1:2) y se aplicó en ambos lados de las hojas. En el segundo método, la solución de urediniosporas (2×10^5 urediniosporas mL⁻¹) se inyectó en las hojas en la parte del macollo. En el tercer método, se asperjaron aproximadamente 20 mL de la solución de urediniosporas con la concentración antes mencionada con un atomizador (500 mL) hasta cubrir totalmente la hoja. Para el último método, se construyó una cámara con material de herrería cubierto con plástico transparente sellado con silicón. En el interior de la cámara se colocó una base de unicel (2.5 cm de grosor) cubierta con una esponja húmeda. Se adaptó una compresora de aire (1 HP, Campbell Hausfeld). En la boquilla de salida se colocó una unidad de aerógrafo (Badger) con un depósito de agua que contenía 150 mL de la suspensión de urediniosporas antes mencionada, la cual fue expulsada en el interior de la cámara nebulizadora.

Las plantas inoculadas por los primeros tres métodos, se colocaron en cámaras húmedas (28 °C, 80 % HR, 24 h) y posteriormente se cultivaron en condiciones de luz y oscuridad a 25 °C \pm 2. Se utilizaron seis macetas en cada caso con tres plantas por maceta, mientras que en el último método, se nebulizaron 18 plantas durante 12 h con intervalos de 5 min. Al finalizar los ciclos de nebulización, las plantas se colocaron a temperatura ambiente (28 °C \pm

2; 75 % HR). Los experimentos se realizaron en un diseño bloques al azar y se repitió dos veces.

Preparación de los extractos vegetales

En el mercado local se compró coliflor, brócoli y rábanos. De los dos primeros se utilizaron las inflorescencias, y del tercero la raíz principal. Se lavaron con agua corriente, colocándose sobre un papel secante y se picaron. El material cortado se pesó en proporciones similares de 500 g cada uno, los cuales se colocaron en un recipiente con 3 L de alcohol etílico al 70 %, y se dejó reposar (30 días) con la finalidad de extraer los compuestos con potencial fungicida. De la solución obtenida, se filtró y se preparó una solución 'stock' (1:20) extracto:agua de la cual se prepararon las siguientes concentraciones: 0.1, 0.2 y 0.5 %, v/v. Las soluciones se colocaron en frascos color ámbar.

Identificación de isotiocianatos

La identificación de los isotiocianatos presentes en los extractos preparados se realizó en el laboratorio de Biotecnología Vegetal del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C., Sonora, México, utilizando la metodología reportada por Troncoso *et al.* (2005). La identificación se realizó en extractos alcohólicos recién preparados, con un mes de reposo, en la solución stock y en los extractos acuosos a las concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.5 %. Se tomó una muestra de los volátiles del espacio de cabeza del vial, mediante la técnica de microextracción en fase sólida (MEFS). Se utilizó una fibra de polidimetilsiloxano de 100 mm (Supelco Inc., Bellefonte, PA), la cual se insertó a través de la septa de teflón/silicón y después de 10 min de exposición, se retiró e insertó en un cromatógrafo de gases para su desorción. Los analitos se identificaron utilizando un cromatógrafo de gases (VARIAN, Palo Alto) modelo 3400 cx acoplado a un espectrómetro de masas como detector (SATURNO 3). Se utilizó una columna capilar de sílica fundida DB-5 de 0.25 milímetros de diámetro y 30 metros de largo (J & W Scientific, Folsom, CA), utilizando helio como gas acarreador con flujo de 5.5 ml·min⁻¹. Las condiciones cromatográficas fueron: temperatura del inyector, 200 °C, temperatura del detector 280 °C, temperatura del horno, 40 °C por 1 minuto con incrementos de 4 °C·minuto⁻¹ hasta 180 °C, una energía de ionización de 70 eV con un rango de masas de 30 a 280 m/z. Se compararon los tiempos de retención de cada uno de los analitos detectados, con los obtenidos de sustancias de referencia, así como por adición de estándares y sus correspondientes datos espectrales.

Evaluación de los extractos vegetales en campo: Áreas de estudio y tratamientos aplicados

En el Cuadro 1 se detallan los tratamientos aplicados en las áreas de estudio de Yautepec y Villa Ayala. Para la aplicación de los extractos se utilizaron mochilas de

aspersión manual (SOLO®) de 15 L. Las aplicaciones comenzaron a los 20 días de edad de la planta (var. 'Blanca Espuma') que contaba con dos hojas desarrolladas. Se calibró el equipo de acuerdo con la dosis y se asperjaron las plantas hasta cubrir toda el área foliar. En relación a los tratamientos con fungicidas, en Yautepec, en las dos primeras aplicaciones se asperjó Captan® + Manzate®, en la tercera y cuarta aplicación se utilizó sólo Amistar® y en la quinta no se aplicaron fungicidas mientras que en Villa Ayala, se utilizó únicamente el fungicida Amistar®. En ambas áreas de estudio, se realizaron cinco aplicaciones con un intervalo de siete días. Se registró diariamente la temperatura y humedad relativa, durante tres meses.

Variables evaluadas

Se evaluó el índice de severidad y porcentaje del área infectada. El progreso de la enfermedad se cuantificó semanalmente por cinco semanas. La severidad se evaluó como un índice modificado de la escala originalmente propuesta para *Puccinia recondita* en hojas de trigo propuesta por el Instituto para la Protección de las Plantas (IPO, Wageningen, Netherlands, por sus siglas en inglés). Para determinar la cantidad de pústulas presentes en una hoja, se tomó el promedio de pústulas por cm², en el que se evaluaron solamente las seis primeras hojas de la planta, después se ponderó el porcentaje e índice de severidad correspondiente (Cuadro 2). Al final del experimento (fin del desarrollo de la vara floral) se cuantificó el número de plantas infectadas por tratamiento y el resultado se expresó en porcentaje de infección.

Unidad y diseño experimental

Los experimentos se realizaron en una superficie de 400 m² subdividida en 25 cuadrantes de 16 m² c/u (4 x 4) equivalente a cinco surcos de 4 m. Se tuvieron cinco repeticiones por tratamiento. El análisis de los datos se realizó por medio de un análisis de varianza (ANOVA) para el diseño completamente al azar y la comparación de medias por diferencia mínima significativa (DMS, $P \leq 0.05$). El análisis se realizó en el paquete estadístico SIGMA STAT versión 2.1.

CUADRO 1. Tratamientos aplicados en las áreas de estudio de Yautepec y Villa Ayala, Morelos.

Número de tratamiento	Área de estudio	
	Yautepec	Villa Ayala
1	Extracto alcohólico 0.1 %	Extracto alcohólico 0.1 %
2	Extracto alcohólico 0.2 %	Extracto alcohólico 0.1 % + Amistar® 2gL ⁻¹
3	Extracto alcohólico 0.5 %	Extracto alcohólico 0.2 % + Amistar® 2gL ⁻¹
4	Agua	Agua
5	Captan® 50 1·gL ⁻¹ + Manzate® 1·gL ⁻¹ o Amistar®	2·gL ⁻¹ Fungicida Amistar®

CUADRO 2. Relación entre el número de pústulas de *U. transversalis*, presentes en las hojas de gladiolo, el porcentaje del área dañada y el índice de severidad.

Número de pústulas	Porcentaje del área dañada	Índice de severidad
1-29	1-4	1
30-59	5-9	2
60-99	10-19	3
100-99	20-39	4
200-299	40-59	5
300-449	60-89	6
Más de 450	90-100	7

Evaluación de extractos vegetales e isotiocianatos en condiciones de invernadero

Se utilizaron cormos de gladiolo de la variedad 'Roja Borrega' de Villa Guerrero, Estado de México. Los cormos se plantaron en macetas de 10 pulgadas. Se utilizó como sustrato la mezcla descrita anteriormente. Se plantaron dos cormos por maceta y cultivaron en un invernadero tipo túnel de 60 m² (5 x 12 X 3m) con cubierta de plástico lechoso y laterales con malla antiáfidos ubicado en el campo experimental del CEPROBI. Se siguieron los cuidados en riego, fertilización, control de plagas y enfermedades de acuerdo a lo aconsejado por el manual técnico fitosanitario del cultivo de la gladiola (SAGARPA, 2005b). La inoculación con *U. transversalis* se realizó cuando las plantas de gladiolo tenían tres hojas desarrolladas. Se realizaron dos tipos de inoculación, en la primera las plantas se inocularon por aspersión de acuerdo con la metodología antes mencionada. Se aplicó por aspersión la solución de urediniosporas (2×10^5) con un atomizador manual (500 mL) en plantas sanas. Otra forma de inoculación consistió en llevar al invernadero 10 plantas cultivadas en campo e infectadas severamente con *U. transversales*. Las plantas infectadas se distribuyeron estratégicamente entre las plantas sanas. Se mantuvo una humedad relativa de 60 %. Los tratamientos probados fueron los siguientes: T1: Extracto alcohólico 0.1 %, T2: Bencil-isotiocianato 0.1 % (Sigma-Aldrich), T3: Fenil-isotiocianato 0.1 % (Sigma-Aldrich), T4: Agua y T5: Amistar® (2g·L⁻¹). Para la aplicación de los isotiocianatos se utilizaron círculos de papel filtro de 1.5 cm de diámetro a los cuales se les agregó 3 µl de cada concentración de isotiocianato. Se colocaron en el centro de cada maceta las cuales se cubrieron por 24 h con bolsas de plástico, con la finalidad de que los volátiles se concentraran durante ese tiempo. Las aspersiones con el fungicida y extractos comenzaron cuando las plantas presentaron síntomas de infección y presencia de pústulas de *U. transversalis* (30 días de edad y cuatro hojas desarrolladas).

Variables evaluadas

Se evaluó el porcentaje de infección y progreso de la

enfermedad semanalmente por cinco semanas. La primera evaluación se inició siete días antes de la primera aplicación. Se tomó como muestra 12 macetas con dos plantas c/u. Se seleccionaron las macetas centrales. Se tomaron datos de temperatura y HR.

Unidad, diseño experimental y análisis estadístico

La unidad experimental fueron 25 lotes de 12 macetas (24 plantas por lote) dentro de un invernadero de 60 m² dividido en tres secciones con cuatro pasillos y un total de 300 macetas. La distribución de los tratamientos se hizo de acuerdo a un diseño completamente al azar. Se realizó un análisis de varianza y la comparación de medias por DMS (Diferencia Mínima Significativa $P \leq 0.05$). Se utilizó el paquete estadístico SIGMA STAT versión 2.1.

RESULTADOS

Evaluación de métodos de inoculación de *U. transversalis* en condiciones de laboratorio y en maceta

En los tres métodos de inoculación probados en las porciones de hojas de gladiolo, no se observó infección por *U. transversalis*. De las pruebas de inoculación en maceta, sólo en los métodos de aspersión y nebulización localizada se observó una infección mínima de tres a dos plantas con *U. transversalis* (Cuadro 3). La escasa infección se produjo en las primeras dos hojas basales de las plantas. Las pústulas presentes en las hojas aparecieron 10 y 11 días después de la inoculación.

Composición de los extractos aplicados

Los resultados del análisis cromatográfico de los extractos aplicados presentaron diferentes tipos y concentraciones de isotiocianatos (Cuadro 4). En el extracto alcohólico recién preparado, se identificó únicamente el isotiocianato 2-feniletilo en una concentración baja de 0.210 mg·mL⁻¹ mientras que, en los extractos de un mes de almacenamiento y a las concentraciones de 0.1, 0.2 y 0.5 % se identificaron además a los isotiocianatos de fenilo, y bencilo. En la solución 'stock', además de observarse las concentraciones más altas de isotiocianatos también se

CUADRO 3. Relación de plantas infectadas, número de pústulas y tiempo de aparición de la infección en las hojas de gladiolo inoculadas con diferentes métodos.

Método de inoculación	Número de plantas infectadas	Número de pústulas	Tiempo de aparición de la infección
Espolvoreo	0	0	0
Inyección	0	0	0
Aspersión	3	5	11 días
Nebulización	2	2	10 días

CUADRO 4. Identificación y concentración de isotiocianatos presentes en los extractos aplicados en campo e invernadero.

Extracto	Concentración de isotiocianatos mg·mL ⁻¹				
	Alil	Propil	Fenil	Bencil	2-Feniletill
Extracto alcohólico recién preparado					0.210
Extracto de 1 mes de almacenamiento			2.332	1.925	0.978
Solución 'stock'	0.048	0.022	10.146	11.268	8.226
Extracto al 0.1 %			1.758	2.419	1.612
Extracto al 0.2 %			2.032	3.265	2.732
Extracto al 0.5 %			3.158	3.477	6.108

identificaron los isotiocianatos con los grupos alilo y propilo aunque en concentraciones muy bajas (0.048 y 0.022 mg·mL⁻¹).

Evaluación de los extractos vegetales en campo. Índice de severidad, porcentaje de área afectada, porcentaje de infección y progreso de la enfermedad.

Aunque hubo diferencias significativas, en general, el índice de severidad fue muy similar entre los tratamientos tanto en la parcela de Yautepec (5) como en la de Villa Ayala (1) (Cuadro 5). En relación al porcentaje del área afectada de las hojas, éste varió en la parcela de Yautepec de 35 a 58 %, mientras que en las plantas de las parcelas de Villa Ayala el área afectada fue de 2 a 5 %.

CUADRO 5. Índice de severidad y porcentaje del área infectada por *U transversalis* en plantas de gladiolo tratadas con los extractos de Brassicaceas a diferentes concentraciones en parcelas ubicadas en los municipios de Yautepec y Villa Ayala, Morelos.

Tratamientos	Índice de severidad*	Área afectada (%)
<i>Parcelas de Yautepec</i>		
Extracto 0.1%	5 a	41
Extracto 0.2 %	5 a	45
Extracto 0.5 %	5 a	58
Agua	5 a	47
Combinación de fungicidas	4 b	35
<i>Parcelas de Ayala</i>		
Extracto 0.1 %	1 a	2
Extracto al 0.1 % y Amistar®	1 a	3
Extracto 0.2 % y Amistar®	1 a	2
Agua	2 b	5
Amistar®	1 a	3

*Letras iguales en columnas indican similitud estadística DMS ($P \leq 0.05$).

En los tratamientos llevados a cabo en el municipio de Yautepec hubo diferencias estadísticas en el porcentaje de infección ($P \leq 0.05$). Las plantas de los tratamientos con extracto al 0.1 % y fungicidas, respectivamente ((T1 y T5) presentaron el porcentaje menor de infección (38 y 41 %, respectivamente), mientras que en las tratadas con el extracto al 0.5 % (T3) se observó el porcentaje mayor de infección (71 %) (Figura 1a). En general, en los tratamientos de Ayala, Mor. el porcentaje de infección fue menor en contraste con lo observado en el municipio de Yautepec. También hubo diferencias significativas en el porcentaje de infección ($P \leq 0.05$). En las plantas tratadas con el extracto al 0.1 %, la combinación del extracto al 0.1 % con el fungicida Amistar (T2) y el fungicida solo (T5), el porcentaje de la infección fue de 15 %, mientras que con el tratamiento control (T4) fue de 32 % aproximadamente (Figura 1b).

En Yautepec, la enfermedad se manifestó desde la segunda evaluación (siete días) mientras que en Ayala hasta la cuarta evaluación (21 días) (Figura 2a, 2b). En general, la manifestación de de la enfermedad fue similar hasta los 14 días de evaluación en Yautepec, incrementándose a los 28 días en las plantas tratadas con el extracto a las concentraciones de 0.2 y 0.5 %. Para el municipio de Ayala, se observó que el desarrollo de la enfermedad fue similar

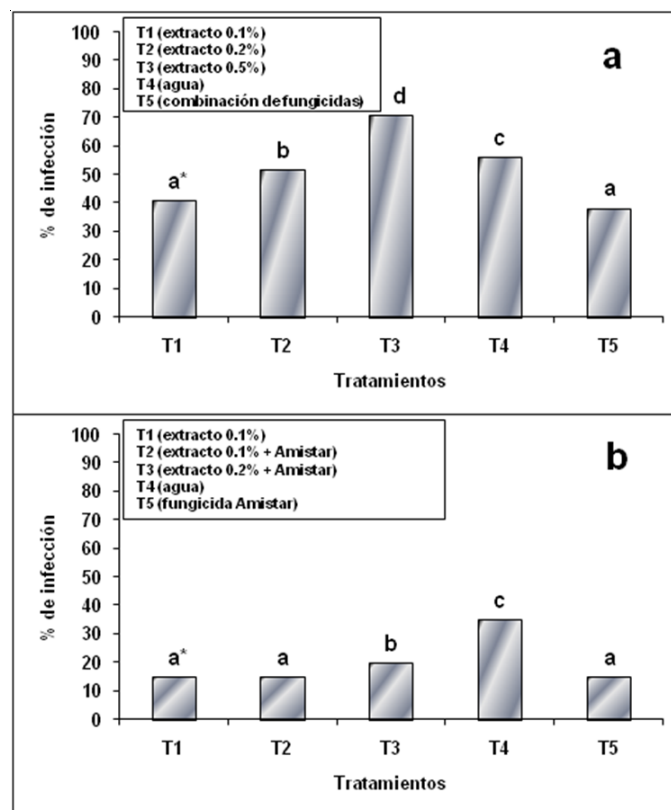


FIGURA 1. Porcentaje de infección de plantas de gladiolo infectadas por *Uromyces transversalis*, tratadas con extractos de Brassicaceas en parcelas ubicadas en a) Yautepec y b) Villa Ayala, Morelos. Letras iguales en columnas indican similitud estadística, DMS ($P \leq 0.05$).

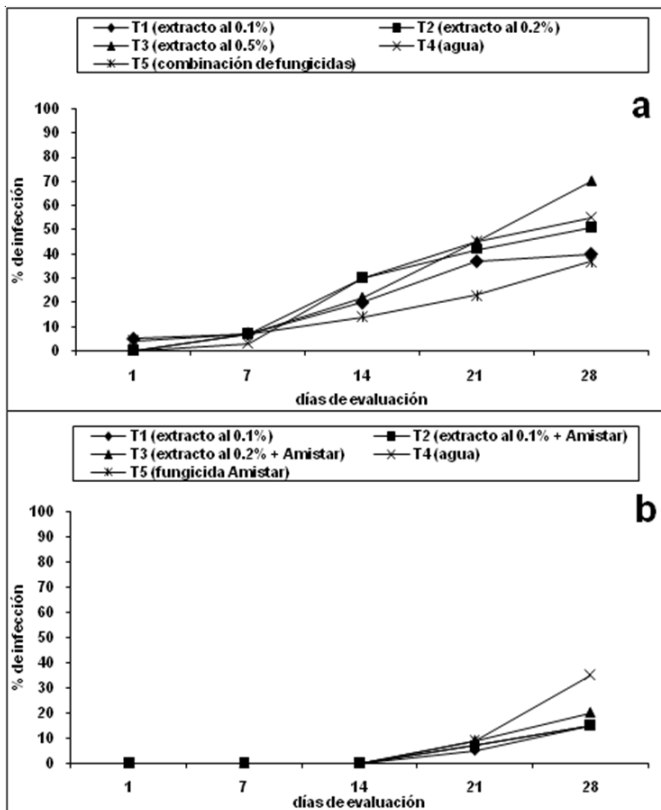


FIGURA 2. Progreso de la enfermedad causada por *Uromyces transversalis* en plantas de gladiolo tratadas con extractos de Brassicaceas, en parcelas ubicadas en la región de a) Yautepec y b) Villa Ayala, Morelos.

hasta los 21 días de evaluación, incrementándose a los 28 días en las plantas tratadas con agua.

Tratamientos bajo condiciones de invernadero. porcentaje de infección y progreso de la enfermedad

Se observaron diferencias estadísticas entre los tratamientos respecto al porcentaje de infección del gladiolo en condiciones de invernadero ($P \leq 0.05$) (Figura 3). En general, la infección causada por *U. transversalis* fue baja en todos los tratamientos cayendo en un intervalo de 4 a 12 %. La infección menor se observó en las plantas tratadas con el isotiocianatos de fenilo (4 %) y la mayor en las plantas tratadas con agua (12 %) (Figura 3).

En relación al desarrollo de la enfermedad, en las primeras evaluaciones (días 1 y 7) no se observaron síntomas de la enfermedad en ninguno de los tratamientos aplicados, en la siguiente evaluación (día 14), las plantas tratadas con el extracto al 0.1 % presentaron un porcentaje de infección del 3 %, mientras que las plantas tratadas con los isotiocianatos de fenilo y bencilo la infección fue del 4 y 6 %, respectivamente. Las plantas tratadas con la combinación de fungicidas tuvieron un porcentaje de infección del 8 %. En la cuarta evaluación (día 21), se observaron porcentajes de infección de 7, 10 y 12 %, en

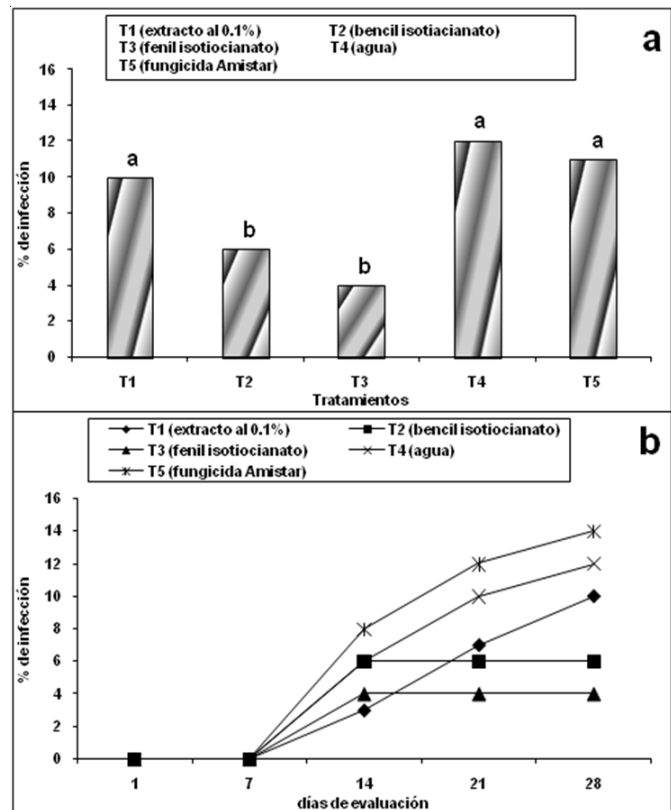


FIGURA 3. Porcentaje de infección a) y progreso de la enfermedad b) causada por *Uromyces transversalis* en plantas de gladiolo tratadas con extractos de Brassicaceas e isotiocianatos bajo condiciones de invernadero. Letras iguales en columnas indican similitud estadística, DMS ($P \leq 0.05$).

las plantas tratadas con el extracto al 0.1 %, agua y Amistar®, respectivamente, mientras que en las plantas tratadas con los isotiocianatos la infección no se incrementó. En la última evaluación (día 28), las plantas tratadas con Amistar® alcanzaron un porcentaje promedio de 14 % de infección, seguido de las plantas testigo (12 %) y plantas tratadas con el extracto al 0.1 % (14 %).

DISCUSIÓN

En los experimentos relacionados con la evaluación de los diferentes métodos de inoculación de *U. transversalis* en condiciones de laboratorio, no se tuvo éxito en lograr la infección en los segmentos de hojas de gladiolo, a diferencia de los resultados presentados por Hsiang *et al.* (2004), quienes lograron inocular *Puccinia hemerocallidis* en segmentos de hoja de liliis (*Hemerocallis* sp.) con la metodología probada en nuestro estudio. La roya es un parásito obligado y no puede vivir o desarrollarse en medios artificiales o en condiciones que no sean su hospedante principal o alterno. Siguiendo algunos métodos de inoculación *in vivo* propuestos por Roelfs *et al.* (1992), se observó una mínima incidencia de *U. transversalis* con el método de aspersión, sin embargo, en

futuras evaluaciones habría que considerar diversos aspectos tales como temperatura, concentración del inóculo, número de plantas y época del año que pudieran tener efecto sobre el éxito o no de la infección de *U. transversalis*.

En los experimentos realizados en Yautepec, los extractos al 0.1 % tuvieron un efecto fungicida sobre *U. transversalis*, similar a la aplicación de los fungicidas ya que en ambos se presentó el menor porcentaje de infección (41 y 38 %, respectivamente). Las plantas que presentaron una infección mayor que los tratamientos anteriores fueron las tratadas con los extractos a las concentraciones de 0.2 y 0.5 %, y agua. En previos estudios se comprobó que estos extractos a diferentes concentraciones, en lugar de inhibir, estimularon la población de algunos hongos como *Phytium* sp (Mazzola *et al.*, 2001).

En los experimentos realizados en el área de Ayala, se decidió continuar con la aplicación del extracto a la concentración de 0.1 % ya que en los experimentos realizados en Yautepec éste fue el que mostró mejores resultados. Por otro lado, se decidió probar el sinergismo entre los extractos y los fungicidas químicos que los productores de estas dos regiones utilizan para controlar la roya del gladiolo. En las plantas tratadas con el extracto al 0.1 %, extracto 0.1 % + Amistar® y, sólo Amistar®, el porcentaje de infección fue del 15 %, mientras que las plantas tratadas con el extracto al 0.2 % + Amistar® y, agua se observó un porcentaje de infección de 20 y 35% respectivamente. Estos resultados nos indican que no hubo el sinergismo esperando entre el fungicida y el extracto a 0.1 %. Es importante mencionar que la aplicación de los extractos en combinación con los fungicidas químicos no generó ningún tipo de fitotoxicidad en las plantas de gladiolo, ya que al final de las evaluaciones las plantas que fueron objeto de estudio mostraron el mismo porte y la misma calidad que las cultivadas por el productor.

En la presente investigación, en la región de Villa Ayala, la población de plantas infectadas fue menor hasta en un 30 % en comparación con los experimentos realizados en Yautepec, una explicación para esto es que los métodos de cultivo implementados por los productores del municipio de Ayala, son totalmente distintos a los empleados por los productores del municipio de Yautepec, en el primero, se aplica el fungicida Amistar® a los diez días de emergencia de los cormos y semanalmente se llevan a cabo las aplicaciones, mientras que en Yautepec primero se aplican fungicidas preventivos con Captán® y Manzate® (captán y mancozeb) y posteriormente realizan dos aplicaciones de Amistar®. En Villa Ayala, el índice de severidad fue 40 % menor comparado con el experimento realizado en Yautepec, debido probablemente a las bajas temperaturas y HR promedio registradas durante el periodo de las evaluaciones (25 °C y 36 %).

En esta investigación también se evaluó el efecto fungicida de los isotiocianatos de bencilo y fenilo sobre el

porcentaje de infección y el índice de severidad de *U. transversalis* en plantas de gladiolo cultivadas en condiciones de invernadero. Se observó que el porcentaje de infección fue en general bajo durante el desarrollo de la planta; en promedio la infección fue del 12 %, sin embargo, fue suficiente para evaluar el potencial fungicida de los isotiocianatos, comprobándose que la menor infección se observó en las plantas tratadas con los isotiocianatos de fenilo (4 %) y bencilo (6 %), mientras que las plantas tratadas con el extracto al 0.1 % y el fungicida tuvieron un porcentaje de infección del 10 y 11 %, respectivamente. Con estos resultados se observó el efecto inhibitorio de los isotiocianatos de bencilo y fenilo sobre la infección causada por *U. transversalis*, sin embargo, al igual que en los experimentos realizados en Yautepec y Villa Ayala, los tratamientos con el extracto al 0.1 % y el fungicida químico, también fueron efectivos para el control de la enfermedad aunque no superaron la actividad de los isotiocianatos probados. Los isotiocianatos detuvieron totalmente la infección de *U. transversalis* y dejaron a las plantas de gladiolo libres de pústulas infecciosas. Ambos isotiocianatos; bencilo y fenilo detuvieron el desarrollo de *U. transversalis* desde la primera aplicación y durante las evaluaciones posteriores la infección no progresó. Otra observación importante fue que no hubo fitotoxicidad en las plantas tratadas con los isotiocianatos probados.

Los extractos de Brassicaceas, comenzaron a aplicarse en la agronomía como método alternativo a la utilización del bromuro de metilo (Masahiro *et al.*, 2006; Monfort *et al.*, 2007; Daugovish *et al.*, 2007) de acuerdo a los resultados obtenidos, los extractos de la familia Brassicaceas merecen seguir evaluándose bajo condiciones de campo e invernaderos sobre *U. transversalis*. La mayoría de las investigaciones realizadas con isotiocianatos se ha limitado a desarrollar investigaciones *in vitro* con microorganismos del suelo principalmente, por lo que estos resultados pueden ser el inicio de futuras investigaciones.

CONCLUSIONES

-Con los métodos de inoculación por suspensión de urediniosporas, transferencia y contacto en porciones de hoja de gladiolo, no se logró la infección de *U. transversalis*, mientras que, con los métodos de inoculación por aspersión y nebulización localizada hubo escasa infección.

-Los principales isotiocianatos identificados en los extractos aplicados a las plantas de gladiolo fueron: fenilo, bencilo, 2-feniletilo, alilo y propilo.

-Las plantas de gladiolo cultivadas en el municipio de Yautepec Morelos, tratadas con los extractos alcohólicos de plantas de la familia Brassicacea a 0.1 %, mostraron el porcentaje de infección menor, aunque esta concentración no superó el efecto de la mezcla de fungicidas. En esta

región, el índice de severidad varió según el experimento y tratamiento aplicado.

-Bajo condiciones de invernadero, los isotiocianatos de fenilo y bencilo aplicados tuvieron un efecto inhibitorio y permanente sobre el hongo *U. transversalis*.

LITERATURA CITADA

- AGRIOS, G. N. 2007. Fitopatología. editorial Limusa, D. F. México 856 p.
- BAUTISTA-BAÑOS, S.; BARRERA-NECHA, L. L.; GARCÍA-DOMINGUEZ, E.; HERNÁNDEZ-LÓPEZ, M. 2000. Potential use of plant extracts to reduce postharvest fungal rots of fruits and vegetables. pp. 143-154. En: Food Technology and Quality Evaluation. Ed. R. Dris y A. Sharma. Science Publishers Inc. Plymouth UK.
- BELTRÁN, M. 2005. Las flores de corte, una visión rápida. Memorias de la Expoflor Toluca, México, Febrero.
- BROWN, L. 2005. *Uromyces transversalis* Assessment of the Risk of Introduction Recommendations for Risk Mitigation for *Gladiolus* spp. Cut Flowers and Propagative Material from México. Ad. Hoc request. 29: 2-19.
- CABRERA, J.; OROZCO, R. 2003. Boletín técnico. Diagnostico sobre las plantas ornamentales en el estado de Morelos. SAGARPA, INIFAP, Fundación Produce Morelos A.C., SEDAGRO, Morelos, México. 38: 1-15.
- CESVMOR (Comité Estatal de Sanidad Vegetal del Estado de Morelos). 2006. Boletín técnico sobre la campaña "Caracterización fitosanitaria de ornamentales en el cultivo del gladiolo" Cuernavaca, Morelos, México.
- DAUGOVISH, O. 2007. Biofumigación de patógenos del suelo con derivados de mostaza: Una revisión bibliográfica y casos de estudio en California. pp. 203-213. En: Agricultura Sustentable y Biofertilizantes. Monterrey, México. Eds. Lira-Saldivar R. y Medina-Torres J. CIQA, Monterrey, México.
- FERREIRA, J. 1989. Evaluation of bitertanol and triadimefon for the control of gladiolus rust by *Uromyces transversalis*. Plant Disease 73: 987-990.
- FERREIRA, J.F.; RIJKENBERG, F.H.J. 1991. Ultrastructural morphology of *Uromyces transversalis* infection of resistant and susceptible gladiolus host and a nonhost zeamays. Phytopathology 81: 596-602.
- GARIBALDI, A.; ALOJ, B. 1980. Observations on biology and control of *Uromyces transversalis* (Thum) winter on gladiolus in southern Italy. Acta Horticulturae 109: 409-413.
- GRAINGE, M.; AHMED, S. 1988. Handbook of plants with pest control properties. John Wiley & sons, NY. USA. 470 p.
- HERNÁNDEZ-LAUZARDO, A.; BAUTISTA-BAÑOS, S.; VELÁZQUEZ-DEL VALLE, M. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana 2: 119-123.
- HSIANG, T.; COOK, S.; ZHAO, Y. 2004. Studies on biology and control of daylily rust in Canada. The Daylily Journal 59: 47-57.
- LINARES, O. 2004. Producción de Flor de Gladiolo. Documento presentado en el 1er Curso Teórico Práctico. Secretaría de la Reforma Agraria, México. Diciembre.
- MASAHIRO, K., ANDRIANTSOA, R.; YOKO, O.; MOTOAKI, T.; HITOSHI, H.; RYO, F. 2006. Induction of soil suppressiveness against *Rhizoctonia solani* by incorporation of dried plant residues into soil. Phytopathology 96: 1372-1379.
- MAZZOLA, M.; GRANATSTEIN, D.; ELFVING, D.; MULINIX, K. 2001. Suppression of specific apple root pathogens by *Brassica napus* seed meal amendment regardless of glucosinolato content. Phytopathology 91: 673-679.
- MONFORT, W.; CSINOS, A.; DESAEGER, J.; SEEBOLD, K.; WEBSTER, T.; DÍAZ-PÉREZ, J.C. 2007. Evaluating *Brassica* species as an alternative control measure for root-knot nematode (*M. incognita*) in Georgia vegetable plasticulture. Crop Protection 26: 1359-1368.
- ROELFS, A.; SINGH, R.; SAARI, E. 1992. Las royas del trigo: Conceptos y métodos para el manejo de esas enfermedades. CIMMYT. México, D.F. 81 p.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo Rural Pesca y Alimentación). 2005a. Manual técnico Fitosanitario del cultivo del Gladiolo. Cuernavaca, Morelos, México.
- SAGARPA (Secretaría de Agricultura Ganadería Desarrollo rural Pesca y Alimentación), SDR (Secretaría de Desarrollo Rural). 2005b. Plan Rector Sistema Producto Ornamental de Chiapas. Diagnostico Nacional. La floricultura en México. Chiapas, Septiembre.
- SELLAM, A.; LACOMI-VASILESCU, B.; HUDHOMME, P.; SIMONEAU, P. 2007. *In vitro* antifungal activity of brassinin, camalexin and two isothiocyanates against the crucifer pathogens *Alternaria brassicicola* and *Alternaria brassicae*. Plant Pathology 56: 296-301.
- SHAPIRO, T.; FAHEY, J.; WADE, K.; STEPHENSON, K.; TALALAY, P. 2005. Bulletin of Chemoprotective Glucosinolates and Isothiocyanates of Broccoli Sprouts. Department of Pharmacology and Molecular Sciences, The Johns Hopkins University, School of Medicine, Baltimore, Maryland, U.S.A.
- SHETTY, K.; SUBBARAO, V.; HUISMAN, O.; HUBBARD, J. 2000. Mechanism of broccoli-mediated *Verticillium* wilt reduction in cauliflower. Phytopathology 90: 305-310.
- SMOLINSKA, U.; MORRA, M.; KNUDSEN, G.; BROWN, P. 1997. Toxicity of glucosinolate degradation products from *Brassia napus* seed meal toward *Aphanomyces euteiches* f. sp. *pisi*. Phytopathology 87: 77-82.
- SMOLINSKA, U.; MORRA, M.; KNUDSEN, G.; JAMES, R. 2003. Isothiocyanates produced by Brassicaceae species as inhibitors of *Fusarium oxysporum*. Plant Disease. 87: 407-412.
- STOEWSAND, G. 1995. Bioactive organosulfur phytochemicals in *Brassica oleracea* vegetables. Food and Chemical Toxicology 33: 537-543.
- TIZNADO-HERNANDEZ, M.; TRONCOSO-ROJAS, R. 2006. Control of fungal diseases with isothiocyanates. Stewart Postharvest Review 1: 1-14.
- TRONCOSO, R.; ESPINOZA, C.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; TIZNADO, M.; GARCÍA, H. 2005. Análisis de los isotiocianatos present in cabbage leaves extract and their potencial application to control *Alternaria* rot in bell peppers. Food Research International 38: 701-708.
- TRONCOSO-ROJAS, R.; SÁNCHEZ-ESTRADA, A.; RUELAS, C.; GARCÍA, H.; TIZNADO-HERNÁNDEZ, M. 2005. Effect of benzyl isothiocyanate on tomato fruit infection development by *Alternaria alternata*. Journal of the Science of Food and Agriculture 85: 1427-1434.

