Evaluación in vitro de actividad inhibitoria de extractos de Moringa oleífera Lam. contra Fusarium oxysporum f. sp. quitoense, en plántulas de lulo (Solanum quitoense Lam.).

NÉSTOR FABIO HOLGUÍN OSORIO



UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y
BIOTECNOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2016

Evaluación in vitro de actividad inhibitoria de extractos de Moringa oleífera Lam. contra Fusarium oxysporum f. sp. quitoense, en plántulas de lulo (Solanum quitoense Lam.).

NÉSTOR FABIO HOLGUÍN OSORIO

Trabajo de grado presentado como requisito para optar al título de: Magister en Microbiología Agroindustrial

> Directora: DORA JANETH GARCÍA J. M.sc.

UNIVERSIDAD CATÓLICA DE MANIZALES
INSTITUTO DE INVESTIGACIÓN EN MICROBIOLOGÍA Y
BIOTECNOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MAESTRÍA EN MICROBIOLOGÍA AGROINDUSTRIAL
MANIZALES
2016

	Nota de aceptació
- Fir	ma de Director del Trabajo de Grado
	and the Director that Irabajo the Grado
Firma	del Presidente del Comité de Program
	Firma de Evaluador

DEDICATORIA

A Dios, dueño de la sabiduría A la memoria de mi padre A mi familia

AGRADECIMIENTOS

De manera muy especial, a la profesora Dora Janeth García Jaramillo por su paciencia y dedicación, sus enseñanzas académicas y personales y por el acompañamiento durante el desarrollo de este trabajo.

A la Doctora Gloria María Restrepo Franco, directora de Investigaciones y Posgrados, de la Universidad Católica de Manizales, por el apoyo permanente durante el desarrollo de la investigación.

Al Instituto de Investigación en Microbiología y Biotecnología Agroindustrial de la Universidad Católica de Manizales, por el apoyo permanente durante el desarrollo de la investigación.

El trabajo experimental de esta tesis se realizó mediante el apoyo de los laboratorios de Fitopatología y de Tejidos Vegetales del Departamento de Producción Agropecuaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Caldas. Tambien, del laboratorio de biotecnología y nanotecnología del TecnoParque Nodo – Cali, donde se realizo la obtención de los extractos.

Al profesor Walter Ricardo López, de la Universidad de Caldas, por su valiosa colaboración y las asesorías brindadas a lo largo del desarrollo del presente trabajo de investigación.

Al señor Luis Bernardo Gutiérrez, auxiliar del laboratorio de Fitopatología del Departamento de Producción Agropecuaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Caldas, por el apoyo técnico brindado a lo largo del desarrollo del presente trabajo de investigación.

A la Ingeniera Agrónoma Luz Dary Bastidas, del equipo técnico del Plan Frutícola del Valle del Cauca, por su asesoría técnica en la identificación de las plantas de lulo con síntomas de Marchitez vascular.

Al Medico Veterinario y Zootecnista Juan Carlos Mayor Rayo, profesor del programa de Medicina Veterinaria y Zootecnia de la Universidad del Tolima, por el apoyo brindado a lo largo del desarrollo del presente trabajo de investigación.

A mis compañeros de la Maestría, Jorge Andrés, Guido Ernesto, Susan Natalia y Margara Uribe, por su apoyo y amistad.

CONTENIDO

1	INTE	RODUCCIÓN;Error! Marcad	or no definido.	1
2	OBJI	JETIVOS;Error! Marcad	or no definido.	7
	2.1	Objetivo General;Error! Marcad	or no definido.	7
	2.2	Objetivos específicos;Error! Marcad	or no definido.	7
3	REF	FERENTE TEÓRICO;Error! Marcad	or no definido.	8
	3.1	Generalidades del cultivo de lulo (Solanum quitoense Lam.); Erro	or! Marcador	no
	definid	do. 8		
	3.1.1		Marcador	no
		inido.9	1 20 11	0
	3.1.2	•		
	3.1.3	1		
		Fitopatógeno		
	3.2.1			
	3.3	Generalidades de la planta Moringa oleífera Lam; Error! Marca		
	3.3.1	1 Moringa oleífera Lam	22	1
	3.3.2	2 Clasificación taxonomica	22	2
	3.3.3	3 Hábitat	23	3
	3.3.4	4 Composición química	23	3
	3.4	Cultivo de tejidos vegetales	24	4
	3.4.1	1 Embriogénesis somática	25	5
	3.4.2	2 Micropropagación de plantas	25	5
	3.4.3	3 Micropropagación de lulo Solanum quitoense Lam	20	6
	3.5	Estado del arte de la investigación	20	6
4	МАТ	TERIALES Y MÉTODOS	29	9
	4.1	Localización, recolección y tratamiento del material vegetal de M	. oleífera29	9
	4.2	Obtención de extractos	30	0
	4.2.1	1 Extracto etanólico	30	0
	4.2.2	2 Extracto acuoso	3	1
	423	3 Extracto oleoso	3	1

	4.3 Ais	slamiento e identificación de Fusarium oxysporum f. sp. quitoense	33
	4.2.1		20
	4.3.1	Sitio de recolección del material vegetal de lulo	33
	4.3.2	Desinfección del material vegetal.	34
	4.4 Pru	neba de patogenicidad	35
	4.5 Bio	pensayos	39
	4.5.1	Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos de <i>Moringa oleífera</i> . 3	39
	4.5.2	Determinación de la concentración mínima inhibitoria.	40
	4.5.3	Determinación de la fitotoxicidad de los extractos.	40
	4.5.3.1	Inhibición de la germinación de semillas	40
	4.5.3.2	Efecto fitotóxico sobre plántulas de lulo	41
	4.5.4	Evaluación del efecto de los extractos sobre la Marchitez vascular in vitro4	1 3
5	RESUL	TADOS Y DISCUSIÓN4	14
	5.1 Ob	tención de extractos	14
	5.2 Ais	slamiento e identificación de Fusarium oxysporum f. sp. quitoense	1 5
	5.2.1	Desinfección del material vegetal.	1 5
	5.2.2	Prueba de patogenicidad.	1 8
	5.3 Eva	aluación de la actividad inhibitoria de los extractos de <i>Moringa oleífera</i> crecimiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>quitoense</i>	
	5.4 De	terminación de la fitotoxicidad de los extractos	54
	5.5 Eva	aluación del efecto de los extractos sobre la Marchitez vascular in vitro	58
6	CONCI	LUSIONES	52
7	REFER	ENCIAS	55

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Clasisificacion taxonomica de <i>Moringa oleifera</i> Lam	22
Tabla 2. Tratamientos para la desinfección de las muestras vegetales de lulo	35
Tabla 3. Sintomas de la Marchitez vascular en lulo	37
Tabla 4. Escala de evaluación del efecto fitotóxico descrita por la Asociación Latinoa de Malezas (ALAM)	
Tabla 5. Rendimiento obtenido en las extracciones etanólica, acuosa y oleosa de oleífera Lam	•
Tabla 6. Resultados de los tratamientos de desinfección en diferentes concentra tiempos de inmersión en NaOCl	•
Tabla 7. Porcentaje de incidencia de la Marchitez vascular en lulo inoculado artificon Fusarium oxysporum f. sp. quitoense	
Tabla 8. Resultados de la actividad inhibitoria de los extractos de <i>Moringa oleifera</i> La el crecimiento micelial de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>quitoense</i>	
Tabla 9. Porcentaje de inhibicion de la germinacion de semillas de lulo por efec extractos de <i>Moringa oleifera</i> Lam	
Tabla 10. Porcentaje de incidencia de la Marchitez vascular <i>in vitro</i> en plántula tratadas previamente con extractos de <i>Moringa oleifera</i> Lam	

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Planta de <i>Moringa oleifera</i> Lam
Figura 2. Tratamiento del material vegetal de <i>Moringa oleifera</i> Lam30
Figura 3. Obtencion de extractos de <i>Moringa oleifera</i> Lam
Figura 4. Sintomas de la Marchitez vascular en lulo
Figura 5. Prueba de patogenicidad <i>in vitro con Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>quitoense</i> aislado de material de lulo enfermo
Figura 6. Evaluación del efecto fitotóxico de los extractos sobre la germinación de semillas de lulo
Figura 7. Evaluación del efecto fitotóxico de los extractos de Moringa sobre plántulas de lulo 42
Figura 8. Porcentaje de crecimiento de hongos en los explantes espuestos a los tratamientos de desinfeccion
Figura 9. Identificación macroscopica y microscopica del aislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f.sp. <i>quitoense</i>
Figura 10. Síntomas de la Marchitez vascular en plántulas de lulo inoculadas artificialmente con <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>quitoense</i>
Figura 11. Reaislamiento de <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>quitoense</i> . a partir de plántulas afectadas con Marchitez vascular
Figura 12 Efecto de Inhibición sobre el crecimiento micelial de <i>fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>quitoense</i> . por los extractos de Moringa oleífera Lam
Figura 13. Efecto fitotóxicode los extractos de <i>Moringa oleifera</i> Lam. sobre semillas y plántulas de lulo
Figura 14. Grado de fitotoxicidad en plántulas de lulo tratadas con extractos de <i>Moringa oleífera</i> Lam
Figura 15. Efecto de la Marchitez vascular <i>in vitro</i> sobre plántulas de lulo tratadas previamente con extractos de Moringa eleffera Lam

1. INTRODUCCIÓN

El lulo *Solanum quitoense* Lam. es una solanácea nativa de la región andina comprendida entre Colombia, Ecuador y Perú (Gómez *et al.*, 2014). El fruto tiene un alto valor nutritivo y propiedades nutraceuticas que la hacen muy apetecida en los mercados nacionales e internacionales, donde se utiliza como materia prima para la fabricación de alimentos procesados (Sierra y Vargas, 2015).

Colombia figura como uno de los mayores productores de lulo a nivel de América Latina; con una producción en 2013 de 69.000 t año⁻¹ y una tasa de crecimiento del 4,1% respecto al año 2012 (AGRONET, 2014); el 57,3% de la producción nacional, lo aportaron los departamentos de Antioquia, Huila y Valle del Cauca (DANE, 2014).

Según Criollo (2013), el 74% de los cultivos de lulo en Colombia se encuentran en fincas de economía campesina tradicional a cargo de pequeños y medianos productores, la mano de obra es netamente familiar, hay poca tecnología en el sistema de producción y el manejo de poscosecha es deficiente. Adicionalmente, el cultivo es afectado durante todas las etapas de su desarrollo por una diversidad de patógenos y enfermedades, que limitan la producción y la rentabilidad del mismo (Carreño et al., 2007). Entre las enfermedades consideradas de mayor importancia debido a su alta incidencia y difícil control, está la Marchitez vascular causada por el hongo Fusarium oxysporum (ICA, 2011); ésta, se caracteriza por producir clorosis ascendente, flacidez de las hojas, marchitamiento por pudrición vascular y radical y finalmente la muerte de la planta (ICA, 2011). Es una enfermedad de difícil manejo, debido principalmente a que el hongo produce estructuras de resistencia conocidas como clamidosporas, que es un tipo de espora asexual que se forma a partir de hifas y macroconidias, y a los medios de diseminación, como son el agua de riego y los aperos de labranza (Estupiñan y Ossa, 2007). Para el control de Fusarium oxysporum se utilizan fungicidas sistémicos, que actúan sobre el metabolismo celular mediante desnaturalizaciones no específicas de proteínas y enzimas, inhibiendo el crecimiento micelial y la germinación de esporas del microorganismo (Yossen, 2014; Okorski, 2015). Los fungicidas sistémicos, éstan considerados como sustancias moderadamente tóxicas con riesgo carcinogénico y teratogénica (Rouabhi, 2010).

En Colombia, el uso de plaguicidas químicos está muy extendido en las comunidades rurales del país, donde, según el Informe de Evaluación de Plaguicidas y Plan de Acción para su Uso Más Seguro - PERSUAP (2007), la falta de capacitación en el uso responsable de estas sustancias químicas, ocasiona problemas de salud humana, contaminación de aguas y suelos y daño en la biodiversidad local. Las intoxicaciones ocupacionales con plaguicidas son un problema de Salud Publica en Colombia y el mundo, debido a la morbilidad y mortalidad que ocasiona (Chaparro y Castañeda, 2015); hasta la semana 51 del año 2015, se reportó al Sistema de Vigilancia en Salud Publica (SIVIGILA), 32.985 casos de intoxicación por sustancias químicas, de los cuales 8.435 corresponden a intoxicaciones con plaguicidas. De igual modo, el uso de plaguicidas ha impactado de manera negativa el medio ambiente en Colombia, según el reporte de Sicard y Espinosa (2004), ecosistemas como la Ciénaga Grande de Santa Marta, la ciénaga de Zapatosa, los ríos Meta, Ariari, Cauca, Caquetá, Saldaña, San Jorge y Cesar, el altiplano Cundiboyacense, la selva Andina y la selva Amazónica, están afectados por contaminación con plaguicidas derivados de la actividad agrícola predominante en las aéreas advacentes.

En este contexto y con el objetivo de mitigar y reducir el impacto negativo en el medio ambiente ocasionado por el uso de plaguicidas sintéticos en el sector agropecuario, Colombia, a través de la Política Nacional de Producción Más Limpia, del Ministerio del Medio Ambiente, recomienda el desarrollo e implementación de tecnologías que permitan disminuir o sustituir el uso de plaguicidas sinteticos en la agricultura.

En este sentido, los plaguicidas elaborados a partir de extractos vegetales obtenidos de plantas con actividad biocida, se presentan como una alternativa viable para sustituir los plaguicidas botánicos (Ramírez-Mares y Hernández-Carlos, 2015), debido a los bajos costos de producción, efectividad y al poco o ningún riesgo que representa para la salud humana o para el medio ambiente (Moo-Koh *et al.*, 2014).

Dentro de las plantas superiores reportadas con actividad biocida, está *Moringa oleífera* Lam. árbol que pertenece a la familia *Moringaceae*, originario de las estribaciones de los Himalayas en la India y que se caracteriza por tener un crecimiento rápido, ser resistente a la sequía y poco exigente de suelo, aunque es de suelos arenosos o con buen drenaje (Radovich, 2011). Acerca de su actividad antimicrobiana, diversas investigaciones demuestran que los extractos preparados con hojas, semillas, corteza y flores de la planta, tienen actividad antimicrobiana (Cáceres *et al.*, 1991; Chuang *et al.*, 2007; Atieno *et al.*, 2011). En este sentido, Fahey *et al.* (2001), comprobó mediante análisis fitoquímicos, la presencia de glucosinolatos e isotiocianatos, moléculas asociadas a la actividad biocida de la planta (Abuye *et al.*, 2004).

De acuerdo con lo descrito anteriormente, el presente proyecto pretende evaluar la actividad inhibitoria de extractos de *Moringa oleífera* Lam. contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, agente causal de la Marchitez vascular en lulo. La evaluación de los extractos frente a la inhibición del crecimiento del patógeno en la plantas de lulo se realizó bajo condiciones *in vitro*.

PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA

En Colombia, el lulo *Solanum quitoense* Lam. es catalogado como el tercer cultivo semipermanente de mayor importancia en la economía familiar campesina, por los ingresos y mano de obra que genera (Fontagro, 2006), también, es uno de los más promisorios en el mercado nacional e internacional, por sus propiedades organolépticas y nutraceuticas (Sierra y Vargas, 2015). Sin embargo, a pesar de la importancia socioeconómica y el potencial agroindustrial del lulo, la producción nacional se caracteriza por estar dispersa y poco tecnificada (Criollo, 2013), además, se ve limitada por la diversidad de fitopatógenos que afectan el cultivo, que en la mayoría de los casos son endémicos de las zonas de producción, y el uso desmedido de plaguicidas para control de patógenos y enfermedades (García *et al.*, 2007).

Dentro de los fitopatógenos de importancia económica del lulo en Colombia, se encuentran hongos como: *Phytophthora infestans*, *Sclerotinia scclerotiorum*, *Coletotrichum gloeosporiodes*, *Fusarium oxysporum*, *Sclerotium rolfsii* y *Poma sacc* (García *et al.*, 2007). Se destaca entre estos, *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, organismo causal de la Marchitez vascular; enfermedad que se caracteriza por el amarillamiento de hojas, marchitez y necrosis vascular (Ochoa *et al.*, 2010). Esta enfermedad, es uno de los mayores limitantes fitosanitarios del cultivo de lulo en Colombia, debido a su amplia distribución, alta incidencia y a las pérdidas económicas que produce (ICA, 2011).

En el ámbito nacional, el manejo fitosanitario de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, incluye el uso de prácticas culturales, manejo microbiológico con hongos antagonistas como *Trichoderma* sp. y *Glicladium* sp. y control químico a base de fungicidas aplicados sobre el suelo y sobre las plantas (García *et al.*, 2007). Siendo, el control químico, el método más utilizado en zonas rurales, debido a su alta eficacia, amplio espectro y rápida acción (Muñoz, 2011).

Paralelo a los beneficios económicos aportados por el uso de plaguicidas en el control y erradicación de plagas de importancia económica, el uso indiscriminado e intensivo de estas sustancias químicas ha ocasionado desarrollo de resistencia en los patógenos,

contaminación ambiental y riesgos en la salud humana (Pérez, 2012); en este sentido, en Colombia se ha observado resistencia a fungicidas del grupo Qols en *Mycosphaerella fijiensis*, agente causal de la Sigatoka negra en plátano y banano (García y Dalides, 2014), también, según Cárdenas (2005), en la atmosfera de los municipios del Espinal (Tolima), Aguachica y San Alberto (Cesar) y en Urabá (Antioquia), se han detectado altas concentraciones de plaguicidas, debido probablemente a la fumigación aérea de las zonas productivas colindantes, igualmente, en un diagnostico de la calidad del recurso hídrico de la vereda Monterredondo (Antioquia). Así mismo, Tobon y López (2010), encontraron que las aguas de las quebradas Fray Juana y el Hato, utilizadas en la producción agropecuaria de la región, no son aptas para el consumo humano debido a las trazas de plaguicidas encontradas en ellas.

Debido a la problemática asociada al uso de plaguicidas sintéticos en Colombia, es necesario desarrollar plaguicidas botánicos que permitan controlar los patógenos y enfermedades asociadas a cultivos de importancia económica, como es el caso del lulo, y que no representen un peligro para la salud humana o animal ni para el medio ambiente. Por ello se plantea la necesidad de conocer y generar proyectos de investigación encaminados a la evaluación de extractos vegetales con propiedades biocidas reportadas.

JUSTIFICACIÓN

La Marchitez vascular es una de las mayores limitaciones fitosanitarias del cultivo de lulo en Colombia, debido a su alta incidencia y a las pérdidas económicas que causa (García *et al.*, 2007). El control químico es la principal medida para el control de esta enfermedad, siendo los fungicidas sistémicos los más usados (García *et al.*, 2007; ICA, 2011). Desafortunadamente, el uso indiscriminado de estas sustancias químicas ocasiona problemas de salud humana, contaminación de aguas y suelos y daño en la biodiversidad (PERSUAP, 2007). Frente a este panorama, es necesario fomentar los métodos biológicos para el control de enfermedades en los cultivos de interés económico para la región y el país, que minimicen los daños al medio ambiente y los problemas sobre la salud humana.

En este sentido, el presente trabajo de investigación pretende evaluar la actividad inhibitoria de *Moringa oleífera* Lam. contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* y contribuir al manejo biológico de la Marchitez vascular del cultivo de lulo.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar la actividad inhibitoria *in vitro* de extractos de *Moringa oleífera* Lam. contra *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, en plántulas de *Solanum quitoense* Lam.

2.2 Objetivos específicos

- Aislar, purificar e identificar *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, de cultivos infectados de *Solanum quitoense* Lam. mediante técnicas microbiológicas.
- Obtener extractos de *Moringa oleífera* Lam. procedentes de material seco de raíz, hojas, flores y semillas utilizando métodos químicos.
- Evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de los extractos vegetales contra *Fusarium* oxysporum f. sp. quitoense.
- Evaluar la actividad inhibitoria *in vitro* de los extractos vegetales en plántulas de lulo infectadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*.

3. REFERENTE TEORICO

3.1 Generalidades del cultivo de lulo (Solanum quitoense Lam.)

El lulo (*Solanum quitoense* Lam.), es una especie propia de Sur América, específicamente de las regiones andinas comprendidas entre Colombia, Ecuador y Perú (Lobo *et al.*, 2007), donde crece de manera silvestre entre los 1.200 y 2.300 msnm, preferiblemente, en lugares frescos de poca luminosidad, con temperaturas entre 14 - 18 °C y humedad relativa no mayor a 80% (Muñoz, 2011).

La planta pertenece al género *Solanum* de la familia *Solanáceae*, orden Tubiflorales, subclase Pentacíclica, clase Simpetala (Urbina, 2008). Es descrita por Revelo *et al.* (2010), como una planta herbácea, dicotiledónea y perenne que alcanza hasta 3 m de altura, produce tallos robustos con 4 a 6 ramificaciones distribuidas radialmente, las hojas son de color verde oscuro por el haz, y verde claro por el envés; de forma oblonga ovalada y con tamaños de hasta 40 cm de longitud y 34 cm de ancho, la inflorescencia es un racimo de 5 a 10 flores, color blanco o lila claro y el fruto es una baya globosa de color amarillo anaranjado cubierta de tricomas punzantes, de 4 a 6,5 cm de diámetro, con 400 a 800 semillas por fruto.

En el contexto regional, el cultivo de lulo se extiende desde Chile a México, siendo Colombia y Ecuador los mayores productores (DANE, 2014). Las principales variedades de lulo que se siembran en Colombia son: *Solanum quitoense* var. *Quitoense* sin espinas, *Solanum quitoense* var. *Septentrional* con espinas y el hibrido La Selva, material genético desarrollado por CORPOICA a partir del cruce de *Solanum quitoense* y *Solanum hirtum*; este híbrido presenta resistencia a nematodos del genero *Meloidogyne* spp. (Tamayo, 2001).

En Colombia el cultivo de lulo ocupó durante el año 2014, una superficie de 11.547 ha, de las cuales, 3.490 estaban en edad productiva, con un rendimiento de 9,6 t ha⁻¹ y una producción de 33.522 toneladas/año, la producción se concentró en 13 departamentos, siendo Antioquia, Huila y Cundinamarca, los mayores productores, con el 70,9% del total, el 29.1% restante lo aportaron los otros 10 departamentos (DANE - ENA, 2015). Según Fontagro (2006), el cultivo de lulo es el más representativo dentro de la economía campesina Colombiana, donde se constituye la principal fuente de trabajo y de ingresos

para cerca de 12.000 familias rurales. La producción la realizan pequeños y medianos productores en fincas de economía campesina, donde se ubican el 74% de los cultivos, el sistema de producción se caracteriza por utilizar baja tecnología y mano de obra familiar (Criollo, 2013).

3.1.1 Enfermedades del cultivo producidas por hongos.

En todos sus estados de desarrollo, el lulo *Solanum quitoense* Lam. es susceptible al ataque de una variedad de bacterias, hongos, nematodos y virus, la mayoría de ellos endémicos de las regiones donde se cultiva la planta (Tamayo *et al.*, 2001).

En Colombia, las principales enfermedades del lulo causadas por hongos son: la Pudrición algodonosa del tallo o Pudrición blanca por *Sclerotinia sclerotiorum*, la Marchitez vascular por *Fusarium oxysporum*, la Antracnosis del fruto por *Colletotrichum gloeosporioides*, la Gota o Tizón del lulo por *Phytophthora infestans* y la Pudrición del tallo por *Sclerotium rolfsii* (Angulo, 2006).

Los marchitamientos producidos por hongos o bacterias se consideran los problemas fitosanitarios mas limitantes del cultivo de lulo por los daños severos que ocasionan (ICA, 2011).

3.1.2 Marchitez vascular del lulo

La Marchitez vascular del lulo es ocasionada por el hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* (Ochoa *et al.*, 2010). Es una de las principales limitaciones fitosanitarias del cultivo, debido a la alta incidencia en las zonas de producción, su difícil manejo y las pérdidas económicas que provoca (ICA, 2011). La infección del patógeno se favorece por condiciones climáticas de alta humedad en suelo, aire y medios de propagación como la lluvia y las condiciones desfavorables de la planta (ICA, 2011).

Adicionalmente, la enfermedad suele empezar con la penetración asintomática de la epidermis, la corteza y la endodermis de la raíz, luego sigue la invasión del tejido vascular de los tallos, de ahí, los Microconidios formados por el micelio del hongo se dispersan al resto de la planta (Agrios, 2005). La invasión y colonización del tejido vascular coincide con la manifestación de los síntomas de la enfermedad; el patógeno

permanece limitado a las células del xilema y algunas células acompañantes, una vez muere la planta, invade el parénquima y esporula profusamente (Dita *et al.*, 2013).

El marchitamiento, la clorosis, el amarillamiento y la muerte de la planta se deben a la interferencia del flujo ascendente de agua y nutrientes, producido por la acumulación de micelio en el xilema, la presencia de toxinas y a los mecanismos de defensa de la planta (Tamayo, 2001).

3.1.3 Control químico

Para el control de patógenos y enfermedades en la agricultura, los plaguicidas sintéticos siempre han sido la primera opción (Muñoz, 2011), por su fácil manejo, amplio espectro, rápida acción, efectividad y menor costo (Agrios, 2005). El uso de plaguicidas ha permitido disminuir las pérdidas de cosecha e incrementar los rendimientos de los cultivos, aumentando la disponibilidad de alimentos (March, 2014). En el año 2007 se utilizaron en el mundo 2.400 millones de kilogramos de plaguicidas (Gómez-Arroyo *et al.*, 2013). De los plaguicidas usados mundialmente, el 40% corresponde a herbicidas, 33% insecticidas, 10% fungicidas y el 17% otros (Grube *et al.*, 2011). No obstante, los beneficios derivados del uso de plaguicidas en la agricultura, el uso inadecuado de éstos ha generado problemas de salud humana y daños al medioambiente (López *et al.*, 2012).

3.2 Fitopatógeno

3.2.1 Fusarium oxysporum f. sp. quitoense

Fusarium oxysporum es un ascomiceto filamentoso hialino de distribución universal que se reproduce de manera asexual, causa la Marchitez vascular en cultivos de importancia económica y sus aislados se han clasificado en formas especiales en función de la especificidad del hospedero (Nelson et al., 1990). De acuerdo a Urbina (2008), Fusarium oxysporum pertenece al género: Fusarium, familia: Hypocreaceae, orden: Hypocreales, subclase: Hypocreomycetidae, clase: Sordariomycetes, subdivisión: Pezizomycotina, división: Ascomycota.

Las especies de *Fusarium oxysporum* se caracterizan por la producción de hifas tabicadas hialinas, conidióforos cortos y por lo general no septados, con monofialides

laterales cortas dispuestas en el micelio aéreo. Forman tres tipos de esporas asexuales: los Microconidios: esporas unicelulares hialinas con forma recta o curva, elipsoidal o cilíndricas y en la mayoría de los casos sin septos, de 5-12 μm de largo por 2.5–3.5 μm de ancho. Los Macroconidios: esporas de forma alargada, ligeramente curvas, por lo general con tres septos transversales, la célula apical en forma cónica y la basal con punta en forma de pie, de 27 a 46 μm de largo por 3–4.5 μm de ancho. Y las clamidosporas: esporas hialinas de apariencia lisa o rugosa, que pueden presentarse en forma aislada, en pares, en racimos o en cadena; de acuerdo a la posición que ocupan en la hifa pueden ser: intercalar, si están dentro de la hifa, sésil, cuando están al lado de ésta y terminal, cuando están en su extremo. Las clamidosporas se caracterizan por su alta resistencia a las condiciones ambientales desfavorables (Garcés *et al.*, 2001).

Las colonias de *fusarium oxysporum* son de crecimiento rápido, algodonosas o vellosas con una coloración superficial rosada a roja distintiva y en el reverso una pigmentación de blanco a violeta, con su centro de color purpura o azul oscuro (Leslie y Summerell, 2006).

Dentro del género *Fusarium* y la especie *oxysporum* muchos de sus miembros presentan patogenicidad específica por el hospedero, lo que se ha traducido en una subdivisión de la especie en formas especiales que, a su vez, debido a la virulencia sobre variedades del mismo hospedante, se divide en razas fisiológicas (Nelson, 1990); prueba de ello es la presencia de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* en los cultivos de lulo (Ochoa *et al.*, 2004).

3.3 Generalidades de la planta Moringa oleífera Lam.

3.3.1 Moringa oleífera Lam.

Moringa oleífera Lam. (Fig. 1), es descrita por Alfaro y Martínez en el año 2008, como una planta perenne que pertenece a la familia Moringaceae, de crecimiento rápido, con una tasa de 6 a 7 metros en un año y una altura máxima entre 10 a 12 metros, de copa ancha pero poco densa, con ramas extendidas, con hojas compuestas de color verde claro, de unos 20 cm de largo, y con foliolos de formas oblongas u ovaladas. Las flores son de color crema, numerosas, fragantes y bisexuales. Miden de 1 a 1.5 cm de largo.

Los pétalos son un poco más grandes que los sépalos. La planta se propaga por medio de semillas o estacas (reproducción asexual) y se adapta a suelos pobres y con pH entre 4.5 a 8.0, es resistente a la sequia y a las enfermedades.



Figura 1. Moringa oleífera Lam. Fuente: el autor.

3.3.2 Clasificación Taxonómica

En la Tabla 1, se indica la clasificación taxonómica de *Moringa oleífera* Lam. según Cáceres y Díaz (2005).

Tabla1. Clasificacion taxonómica de *Moringa oleífera* Lam.

REINO:	Plantae
SUBREINO:	Tracheobionta
FILO:	Magnoliophyta
CLASE:	Magnoliopsida
SUBCLASE:	Dilleniidae
ORDEN:	Capparales
FAMILIA:	Moringaceae
GENERO:	Moringa
ESPECIE:	oleífera

3.3.3 Hábitat

Moringa oleífera Lam. es una planta de origen tropical que se adapta fácilmente a diferentes condiciones del suelo, precipitación y temperatura, se desarrolla en climas secos, semiáridos y húmedos, a temperaturas entre los 24 y 32 °C y alturas que van desde el nivel del mar hasta los 1.200 m de altitud (Pérez *et al.*, 2010).

3.3.4 Composición Ouímica

Los análisis fitoquímicos realizados a *Moringa oleífera* Lam. muestran que la planta tiene un alto contenido en minerales como Calcio, Cobre, Hierro, Potasio, Magnesio y Zinc, y es una buena fuente de proteínas, vitaminas, β-caroteno, aminoácidos y varios compuestos fenólicos (Farooq *et al.*, 2012). Las hojas, raíces, semillas, corteza, frutos y flores tienen acción estimulante sobre el sistema cardiovascular y circulatorio, acción antitumoral antipirético, antiepiléptico y antiinflamatorio (Auwal *et al.*, 2013). Produce metabolitos secundarios como glucosinolatos e isotiocianatos, moléculas responsables de los efectos de la actividad antimicrobiana (Falasca y Bernabé, 2008).

Evidencias aportadas por investigaciones comprueban que los extractos de hojas, semillas, corteza y flores de moringa tienen actividad antimicrobiana; por ejemplo, Cáceres *et al.* (1991), demostraron que los extractos acuosos de las hojas inhibían el crecimiento de *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus*. Así mismo, el grupo de Chuang *et al.* (2007), demostraron la actividad antifúngica de extractos alcohólicos de las semillas y las hojas contra dermatofitos como *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*. Adicionalmente, Walter *et al.* (2011), demostraron las propiedades del extracto de semillas contra bacterias causantes de enfermedades trasmitidas por el agua como la *Salmonella typhii*, *Vibrio cholerae* y *Escherichia coli*.

3.4 Cultivo de tejidos vegetales

Sathayanarayana y Varghese (2007), definen el cultivo de tejidos vegetales como una técnica de cultivo aséptico en medio nutritivo y bajo condiciones controladas, de partes aisladas de la planta, como una célula, un tejido, un órgano, un embrión o un protoplasto. Se caracteriza porque ocurre sobre superficies pequeñas, optimiza las condiciones nutritivas, hormonales, de luz y temperatura; y además produce un material libre de patógenos (Pierik, 1990).

La técnica de cultivo de tejidos vegetales es posible gracias a la capacidad que tienen las células vegetales, que bajo ciertos estímulos pueden des-diferenciarse y diferenciarse de nuevo (totipotencia celular), permitiendo el crecimiento y desarrollo de un nuevo individuo completo sin una previa fusión de células sexuales o gametos (Sharry et al., 2015). El cultivo vegetal se inicia a partir de un explante o propágulo, que puede ser un cotiledón, un hipocótilo, un embrión, o una porción de hoja, tallo, raíz, ápice, nudo, capítulos florales, anteras, etc. Para su establecimiento, se desinfecta y se coloca sobre un medio de cultivo líquido, sólido o semisólido, del que se nutrirán las células y regenerará una nueva planta (Sharry et al., 2015). Dependiendo de la concentración de los nutrientes y la presencia de auxinas y/o citocininas (reguladores de crecimiento) en el medio de cultivo, las células somáticas pueden dividirse y dar dos tipos de respuesta morfogénica: la organogénesis y la embriogénesis, en la primera se forman células en estado indiferenciado y con capacidad proliferativa (meristemos) a partir de las células somáticas cultivadas, que luego derivan en la formación de estructuras como tallos, raíces, etc.; mientras que en la segunda, se forman embriones no cigóticos (sin la unión de gametos) que al germinar darán origen a una nueva planta fértil (Segretín, 2006).

3.4.1 Embriogénesis somática

La embriogénesis somática es el proceso de formación de un embrión a partir de una célula no cigótica (Seijo, 2003). La embriogénesis somática puede ser de dos tipos: embriogénesis somática indirecta: cuando el explante sufre una des-diferenciación celular y un crecimiento celular que termina en la formación de un callo o masa de células amorfa sin función específica y a partir del callo se forma el embrión somático, y embriogénesis somática directa: cuando el embrión somático se da sin la formación previa del callo (Seijo, 2003).

3.4.2 Micropropagación de plantas

La técnica fue desarrollada por Broome y Zimmerman en 1978, y consiste en la propagación asexual controlada de un genotipo específico de planta a partir de un órgano, tejido o célula, de la misma planta (Cancino *et al.*, 2015). Este método ofrece ciertas ventajas sobre los métodos tradicionales de propagación vegetativa, como por ejemplo, un mayor incremento en el número de plantas del genotipo seleccionado, menor tiempo de propagación, al estar controlados los factores ambientales (no hay estacionalidad) permite una producción permanente de material.

El proceso de Micropropagación consta de cuatro etapas secuenciales: 1. Introducción: preparación del explante, excisión del explante. 2. Multiplicación o proliferación. 3. Enraizamiento y 4. Endurecimiento y aclimatación de la vitroplanta (Suárez, 2011).

En Colombia, la Micropropagación se aplica principalmente en cultivos de plátano, banano, cítricos, piña, plantas ornamentales, flores y algunas especies perennes o forestales de interés comercial como el eucalipto, palma de aceite, caucho, entre otras (Rojas *et al.*, 2014)

3.4.3 Micropropagación de lulo Solanum quitoense Lam.

Según Criollo (2013), en Colombia predomina la propagación sexual de lulo, a través del uso de semillas extraídas de frutos seleccionados por el mismo productor, de acuerdo a la forma, tamaño y volumen. También y en menor proporción, se da una propagación de manera asexual, usando estacas o esquejes, rebrotes y yemas. Adicionalmente, Segovia (2002), afirma que la propagación de lulo a través del cultivo de tejidos *in vitro* se hace generalmente en los centros de investigación del país, y ofrece ventajas comparativas sobre los métodos tradicionales, como por ejemplo, control de factores fisicoquímicos, como el pH, la temperatura, la concentración de oxígeno molecular (O₂) y dióxido de carbono (CO₂) y fisiológicos, como la densidad celular y factores de crecimiento.

3.5 Estado del arte de la investigación

Actualmente, debido a los riesgos para la salud del hombre y animal y los efectos sobre el medio ambiente, se tiende a evitar el uso de plaguicidas sintéticos en agricultura y reemplazarlos por plaguicidas botánicos (Nava-Pérez *et al.*, 2012).

Dentro de las principales ventajas que estos plaguicidas botánicos ofrecen en relación a los plaguicidas químicos, están: 1. no presentan efectos adversos sobre la salud humana, 2. tienen poco o ningún efecto sobre el ambiente por ser biodegradables, 3. utilizan ingredientes sencillos, 4. son de alta disponibilidad y 5. presentan bajos costos (Leng *et al.*, 2014).

Uscátegui (2013), determinó la cantidad de polifenoles totales y la actividad antioxidante de los extractos de las especies vegetales: Artemisia absinthium, Capsicum frutescens, Allium sativum, Ambrosia artemisiifolia, Calendula officinalis, Allium cepa, Equisetum bogotense, Mentha spicata, Ricinus communis, Foeniculum vulgare, Matricaria recutita, Mentha pulegium, Achillea millefolium, Urtica dioica, Rosmarinus officinalis, Ruta graveolens, Thymus vulgaris. Posteriormente, evaluó la actividad inhibitoria de los extractos sobre Phytophthora infestans, Rhizoctonia solani y Fusarium

oxysporum, fitopatógenos de *Solanum tuberosum*. Por último, estableció la relación entre la composición química y la inhibición de los hongos, encontrando que el aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*) presentaba la mayor cantidad de polifenoles totales y la mayor actividad antioxidante, también, presentaba el mayor porcentaje de inhibición sobre los tres hongos. Concluyó que la actividad fungicida del tomillo se debe a su elevada capacidad antioxidante.

En otro estudio, Vásquez et al. (2013), evaluaron los aceites esenciales y los extractos acuosos de cinco especies de la familia Chenopodiaceae; Beta vulgaris, Chenopodium ambrosioides, C. álbum, C. graveolens, C. berlandieri subsp. Nuttalliae, sobre el crecimiento micelial y esporulación de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici y Fusarium solani. Se encontró que los aceites esenciales de C. álbum y C. ambrosioides inhibieron 100% el crecimiento y esporulación de ambas especies de fusarium. En cuanto a los extractos acuosos, Beta vulgaris, arrojó los resultados más significativos, al inhibir el crecimiento micelial en un 38% y la esporulación en un 61% en ambas especies.

Adicionalmente, Quintana y Lenin (2015), evaluó la acción de extractos acuosos de las especies vegetales *Urtica dioica*, *Tagetes erecta*, *Ocimum basilicum* y *Ruta graveolens*, sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*. Los extractos se obtuvieron por maceración e infusión y se prepararon en concentraciones de 10%, 25% y 50%. Se encontró que los extractos de *Urtica dioica* y *Ruta graveolens*, en concentraciones de 25% y 50%, presentaron la mayor inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*.

Singh *et al.* (2014), evaluaron la actividad biocida de los extractos etanólicos de hojas de *Alangium salvifolium* (L. f.) Wangerin. sobre las bacterias *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Staphylococcus aureus* y los hongos *Fusarium oxysporum*, *Fusarium nudum y Aspergillus flavus*. Se determinó la presencia o ausencia de metabolitos secundarios en los extractos por métodos estándar. La actividad antimicrobiana se realizó mediante la técnica de difusión en agar y la medición del halo de inhibición. Se utilizaron concentraciones de extractos de 0,62; 1,25; 2,5; 5;

10; 20 y 40 mg/mL Los resultados muestran que los extractos presentaron mayor actividad fungicida frente a *Fusarium oxysporum* y *Aspergillus flavus*, y actividad antimicrobiana frente a *Escherichia coli* y a *Pseudomonas aeruginosa*. Los extractos contenían alcaloides, flavonoides, fenoles y esteroides.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Localización, recolección y tratamiento del material vegetal de Moringa oleífera

La obtención de los extractos de *Moringa oleífera* Lam. se realizó en el laboratorio de biotecnología y nanotecnología del TecnoParque Nodo – Cali.

El aislamiento, purificación y conservación de la cepa de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* se realizó en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Producción Agropecuaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Caldas.

La propagación *in vitro* de lulo *Solanum quitoense* Lam. var. Castilla y las pruebas biológicas se realizaron en el laboratorio de Tejidos Vegetales del Departamento de Producción Agropecuaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Caldas.

Raíces, hojas, flores y semillas de *Moringa oleífera* se recolectaron en la vereda el Pítal (Cauca), a una altura 1.700 m.s.n.m, a una temperatura de 23 °C. El material vegetal se almacenó en bolsas de papel Kraft, se rotularon y se transportaron en cajas de cartón hasta las instalaciones del laboratorio de Biotecnología y Nanotecnología de TecnoParque nodo – Cali.

El material vegetal fue lavado con abundante agua corriente para retirar la tierra y suciedad; seguidamente, se cortó en trozos pequeños de 1.0 a 2.0 cm de largo, luego, se sumergió en una solución de 200 ppm de hipoclorito de sodio (NaOCl) por cinco minutos, seguido por cinco enjuagues con agua destilada estéril. Se dejó secar durante cinco días en horno de convección forzada, marca BINDER, a temperatura de 30 °C ± 0,2 °C. Una vez terminado el tiempo de secado, las muestras vegetales se molieron a un tamaño de partícula de 0,5 mm utilizando un molino universal de funcionamiento continuo, marca IKA®, modelo MF 10 (Fig. 2).

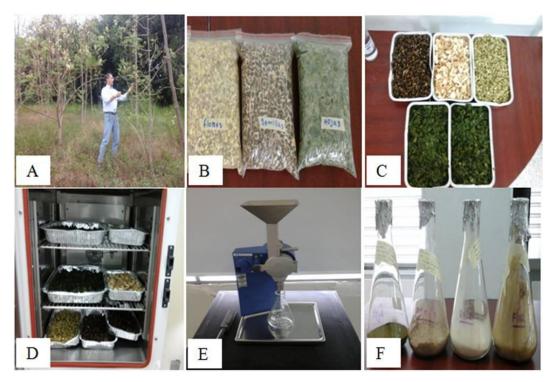


Figura 2. Tratamiento del material vegetal de *Moringa oleífera* Lam. **A.** Recolección. **B.** Empaque y embalaje. **C.** Lavado y desinfección. **D.** Secado. **E.** Maceración del tejido vegetal. **F.** Material vegetal a un tamaño de particula de 0.5 mm. Fuente: el autor.

4.2 Obtención de extractos

4.2.1 Extracto etanólico

El extracto etanólico se obtuvo por el método de maceración pasiva, según la metodología descrita por Nepolean *et al.* (2009). Para ello, se tomaron 100 gramos de material vegetal seco y molido, se colocaron en un Beaker de 600 mL con 400 mL de etanol al 95% y se dejó con agitación constante por espacio de 24 horas. Posteriormente, la solución resultante se filtró al vacío utilizando papel filtro Whatman No 1. El solvente se eliminó por destilación en un rotaevaporador a baja temperatura y presión reducida hasta sequedad, marca Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, configuración horizontal (Fig. 3).

4.2.2 Extracto acuoso

Se obtuvo del mismo modo que el extracto etanólico, excepto que el solvente es agua destilada estéril en lugar de etanol al 95% (Fig. 3).

4.2.3 Extracto oleoso

La obtención de los aceites se realizó por el método Soxhlet convencional, siguiendo la metodología propuesta por Lafont et al. (2013). Para ello, se tomaron 100 gramos de material vegetal seco y molido, se depositaron en el cartucho del equipo y este a su vez dentro de la cámara de extracción, se adicionó 400 ml de una solución de etanol al 95%, se ensambló el equipo y se inició la extracción. El proceso se mantuvo por espacio de cuatro horas. El solvente se eliminó por destilación en rotaevaporador a baja temperatura y presión reducida hasta sequedad. De cada extracto bruto, se preparó una solución estándar (100%), resuspendiendo 0.01 g de extracto en 10 mL de agua destilada estéril, obteniendo soluciones de extracto con una concentración de 1mg.mL⁻¹. A partir de la solución estándar se prepararon diluciones al 5 y al 15%, obteniendo concentraciones de 0.05 mg.mL⁻¹ y 0.15 mg.mL⁻¹ respectivamente. Las soluciones de los extractos se filtraron a través de una membrana Millipore de 0.22 µm, y se almacenaron en frascos ámbar a -10 °C hasta su utilización (Fig. 3).

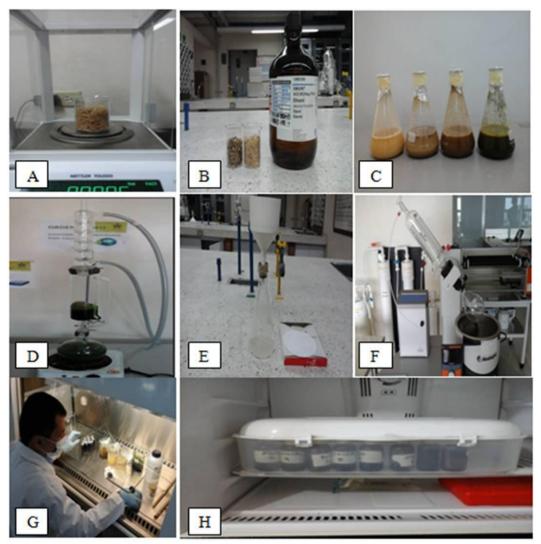


Figura 3. Obtención de extractos de *Moringa oleífera* Lam. **A.** Pesaje. **B.** Adición de solvente. **C.** Extracción por maceración pasiva. **D.** Extracción por Soxhlet. **E.** Filtración por papel Whatman 1. **F.** Destilación del solvente. **G.** Filtración por membrana Millipore 0.22 μm. **H.** Refrigeración a -10 °C. Fuente: el autor.

4.3 Aislamiento e identificación de Fusarium oxysporum f. sp. quitoense

4.3.1 Sitio de recolección del material vegetal de lulo (Solanum quitoense Lam.)

Se recogieron muestras de raíces, hojas y tallos de plantas de lulo que presentaban los síntomas descritos por Tamayo (2001), para la Marchitez vascular producida por *Fusarium oxysporum*; plantas con marchitez generalizada, hojas de coloración amarillenta parcialmente enrolladas y hojas secas de color café adheridas a la planta, tallos con tejido necrosado de color café y raíces con manchas de color oscuro con pudrición seca (Fig. 4).

Las muestras se recolectaron en zonas de cultivo de lulo de la vereda la Mansión, del corregimiento de Monteloro en el municipio de Tulua (Valle del Cauca), ubicadas en la cordillera central a una altura de 2.100 m.s.n.m, con temperatura de 18 °C. Las muestras se envolvieron individualmente en papel Kraft, se colocaron en bolsas plásticas de cierre hermético, se rotularon y empacaron en termos de icopor con bolsas refrigerantes y se enviaron al laboratorio de Fitopatología del Departamento de Producción Agropecuaria de la Facultad de Ciencias Agropecuarias de la Universidad de Caldas.



Figura 4. Síntomas de la Marchitez vascular en lulo. **A** y **B.** Plantas con marchitez, hojas amarillas y hojas secas adheridas a las ramas. **C.** Porción de tallo con tejido necrosado. **D.** Raíces con áreas de color oscuro con pudrición seca. Fuente: el autor.

4.3.2 Desinfección del material vegetal

Con el fin de reducir la carga microbiana presente en las muestras vegetales sin comprometer el aislamiento del hongo *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, se evaluaron tres concentraciones de hipoclorito de sodio, combinadas con dos tiempos de exposición.

Una vez en el laboratorio, las muestras de raíces, tallos y hojas se lavaron con abundante agua. Seguidamente, se cortaron 54 explantes de 1 mm de cada muestra, tomando tejido afectado y tejido sano, luego, se sometieron a un proceso de desinfección según los tratamientos descritos en la Tabla 2. Finalmente, se enjuagaron cinco veces con abundante agua destilada estéril.

La evaluación se realizo bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones. Para el análisis estadístico se aplicó un análisis descriptivo de las variables estudiadas, utilizando gráficos comparativos de porcentaje. Las variables de estudio fueron la concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl), el tiempo de inmersión y porcentaje de colonias fúngicas desarrolladas.

Tabla 2. Tratamientos para la desinfección de las muestras vegetales de lulo.

Tratamiento	Número de explantes	Concentración solución de hipoclorito de Sodio (NaOCl) (%)	Tiempo de inmersión (min)
Hoja	9	0.7	1
Hoja	9	1.4	1
Hoja	9	2.0	1
Tallo	9	0.7	1
Tallo	9	1.4	1
Tallo	9	2.0	1
Raíz	9	0.7	1
Raíz	9	1.4	1
Raíz	9	2.0	1
Hoja	9	0.7	2
Hoja	9	1.4	2
Hoja	9	2.0	2
Tallo	9	0.7	2
Tallo	9	1.4	2
Tallo	9	2.0	2
Raíz	9	0.7	2
Raíz	9	1.4	2
Raíz	9	2.0	2

4.4 Pruebas de patogenicidad

Para el aislamiento del patógeno (primer postulado de Koch), por cada tratamiento de desinfección, se sembraron por triplicado tres explantes en cajas Petri con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA, 39 g/L de agua). Éstas fueron incubadas a 28 °C por 7 días. Transcurrido este tiempo, de las colonias de hongos que crecieron sobre los explantes, se seleccionaron aquellas que presentaban morfología macroscópica

relacionada con *Fusarium oxysporum*. A estas colonias presuntivas se les realizó tinción con azul de lactofenol y se observó la morfología del micelio y de los conidios, utilizando los estándares taxonómicos de Leslie y Summerell (2006). Una vez verificada las características de la especie, se obtuvieron cultivos axénicos de las colonias presuntivas, realizando subcultivos en serie sobre PDA con las mismas condiciones de incubación descritas previamente.

A partir de los cultivos axénicos y utilizando los estándares taxonómicos de Leslie y Summerell (2006), nuevamente se identificaron los rasgos morfológicos macroscópicos y microscópicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* (segundo postulado de Koch), confirmándose la asociación del hongo con las plantas enfermas. Las observaciones se realizaron a través de microscopía de luz utilizando un microscopio binocular marca Zeiss®. Las imágenes fueron obtenidas empleando una cámara digital marca Sony® con adaptador especial para microscopio.

Para las pruebas de patogenicidad (tercer postulado de Koch), se utilizaron plántulas *in vitro* de lulo (*Solanum quitoense* Lam. variedad Castilla) de 45 días de edad, cultivadas según la metodología propuesta por Gutiérrez (2015), en la cual, las semillas de lulo fueron lavadas con alcohol etílico al 95% durante 2 minutos y desinfectadas con solución de NaOCl al 1 % más Tween 80 por 20 minutos. Posteriormente, las semillas fueron sembradas en frascos de vidrio con 20 mL de medio de cultivo para germinación, compuesto por medio basal (MS) Murashige y Skoog, (1962), suplementado con 1 mL de vitaminas B5. Las semillas se incubaron a una temperatura de 23 °C - 25 °C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas de oscuridad.

El inóculo del patógeno consistió en una suspensión de conidios obtenidos a partir de cultivos axénicos de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* de 7 días de crecimiento en agar PDA. Para ello, empleando un asa bacteriológica estéril se tomó porción micelial de los cultivos del hongo y se diluyó en 10 mL de agua destilada estéril, luego, se homogenizó la mezcla y se filtró a través de gasa estéril, eliminando así los restos de agar y de micelio. Se utilizaron cuatro concentraciones, $1x10^2$, $1x10^4$, $1x10^6$ y $1x10^8$ conidios mL⁻¹ ajustadas en cámara de Neubauer, con el fin de seleccionar la concentración mínima de inóculo que infectara el 100% de las plántulas, probando así la patogenicidad del aislamiento, metodología propuesta por Cardona (2015).

Para la inoculación de las plántulas de lulo *in vitro* se siguió la metodología reportada por Cardona (2015). Para ello, 1 mL del inóculo (de cada concentración: 1x10², 1x10⁴, 1x10⁶ y 1x10⁶ v 1x10⁶ y 1x10⁶ conidios mL⁻¹), fue depositado alrededor de la corona de cada plántula, utilizando una Micropipeta 1000 uL, marca BRAND®. El inóculo se distribuyó de manera uniforme en la superficie del medio; los frascos con las plántulas inoculadas fueron cerrados, sellados con papel cristaflex y posteriormente, incubados durante 14 días a 26°C – 28°C con un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 de oscuridad para su seguimiento y evaluación (Fig. 5). Esta fase se realizó bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones por tratamiento, cada planta como unidad experimental. Como testigo absoluto, cuatro plántulas de lulo *in vitro* fueron inoculadas con 1 mL de agua destilada estéril.

Las plántulas se examinaron día de por medio, comparando los tratamientos con los testigos y observando la aparición de los síntomas característicos de la Marchitez vascular descritos en la Tabla 3. Para determinar el efecto del fitopatógeno sobre las plántulas *in vitro*, se calculó el porcentaje de incidencia según la fórmula propuesta por Montes *et al.* (2010):

% Incidencia = (Plantas enfermas/Número total de plantas) x 100

Tabla 3. Síntomas de Marchitez vascular en lulo. Fuente: adaptado de Tamayo (2001).

Síntoma	Órgano	Descripción
Necrosis radicular	Raíz	Se presenta sobre las raíces por donde ingresa el patógeno y se caracteriza por lesiones de aspecto húmedo, de color marrón, circulares o alargadas que producen el oscurecimiento cortical de las raíces.
Estrangulamiento del tallo	Tallo	Reblandecimiento y constricción circular del tallo debido a la necrosis del tejido, que ocasiona la caída de la planta.
Amarillamiento y defoliación	Hojas	Se produce por la necrosis vascular y radical, se caracteriza por la aparición de amarillamiento del follaje.
Marchitez	Tallo y Hojas	Se produce por la necrosis vascular y radical, flacidez generalizada.

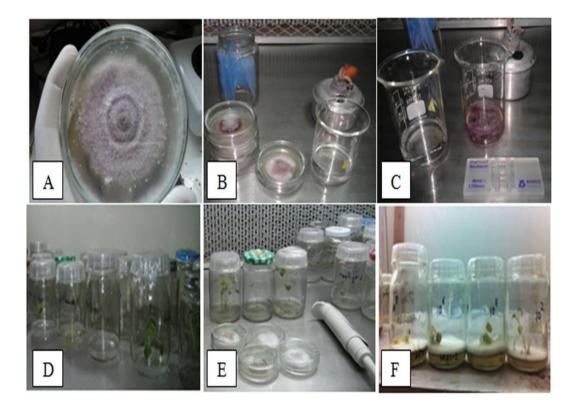


Figura 5. Prueba de patogenicidad *in vitro* con *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* aislado de material de lulo enfermo. **A.** Cultivo axénico. **B.** Suspensión de micelio en agua destilada estéril. **C.** Ajuste de la concentración del inóculo en cámara de Neubauer. **D.** Plántulas de lulo de 45 días de edad. **E.** Inoculación artificial de las plántulas con el patógeno. **F.** Evaluación de los síntomas de la marchitez vascular. Fuente: el autor.

El re-aislmiento del patógeno (cuarto postulado de Koch), se realizó a partir de las plántulas de lulo que presentaron síntomas de Marchitez vascular. Con este fin, se cortaron 4 explantes que posteriormente fueron sembrados en PDA e incubados a 28 °C por 7 días. Terminado el periodo de incubación, se tomaron muestras de las colonias de hongos crecidos sobre los explantes, se compararon los rasgos morfológicos macroscópicos y microscópicos del nuevo aislamiento con los rasgos característicos del hongo inoculado inicialmente, empleando la metodología descrita previamente.

4.5 Bioensayos

4.5.1 Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos de Moringa oleífera

La evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos de *Moringa oleífera* sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, se realizó utilizando la prueba de crecimiento radial sobre placa y la técnica de dilución en agar, según la metodología propuesta por Vizcano *et al.* (2007). Para realizar dicha prueba, primero se preparó una solución estándar de cada extracto, según la metodología de Ajiquichi (2013), resuspendiendo el extracto bruto obtenido en 20 mL de agua destilada estéril. A partir de la solución estándar se prepararon diluciones al 5% y 15 % V/V. Para montar la prueba, se adicionó 1 mL de cada extracto (por cada tratamiento) a 20 mL de medio PDA. La adición del extracto se realizó cuando el medio PDA estaba a una temperatura aproximada de 25°C - 27°C. Se homogenizó la solución y se sirvió en cajas Petri de 90 x 15 mm, se dejó enfriar a temperatura ambiente. Una vez solidificado el medio, se depositó en el centro de cada caja Petri, un disco de micelio de 8 mm de diámetro de un cultivo de 7 días de crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*.

Como control absoluto se empleó medio PDA sin extracto y como controles de referencia, medio PDA con 1 mL de agua destilada estéril y medio PDA con etanol al 95%. Todas las cajas se sellaron con papel cristaflex y se incubaron a 28 °C por 7 días. Las cajas fueron evaluadas al día 3, 5 y 7 a partir de la fecha de inoculación. Se midió el diámetro de la colonia, se promedió el resultado de las tres replicas y se comparó con el promedio del diámetro de los testigos absolutos; el resultado se expresó como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial utilizando la formula:

%
$$ICM = [(dc - dt)/dc] \times 100$$

Donde:

dc: es la media del diámetro del crecimiento micelial de los testigos absolutos dt: es la media del diámetro del crecimiento micelial de los tratamientos El experimento fue establecido bajo un modelo completamente al azar con tres repeticiones teniendo cada caja Petri como unidad experimental y los datos fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia P≤ 0.05.

4.5.2 Determinación de la concentración mínima inhibitoria

Según lo indicado por Daouk *et al.* (1995), la menor concentración del extracto evaluado, que inhiba en un 100% el crecimiento micelial del patógeno, será considerada la concentración mínima inhibitoria.

4.5.3 Determinación de la fitotoxicidad de los extractos de Moringa oleífera Lam.

Los efectos de fitotoxicidad de los extractos de *Moringa oleífera* Lam. se evaluaron sobre semillas y plántulas *in vitro* de lulo *Solanum quitoense* Lam.

4.5.3.1 Evaluación del efecto fitotóxico de los extractos sobre la germinación de semillas de lulo

Para conocer el efecto de los extractos sobre la germinación, se adicionó 1.0 mL por cada extracto a 20 mL de medio basal MS en estado líquido y previamente esterilizado a 121°C por 20 min, se homogenizó y dejo enfriar hasta solidificar. Seguidamente, se sembró una semilla de lulo por cada frasco con medio de cultivo suplementado con el extracto vegetal y se incubó a una temperatura de 23°C - 25°C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad por 30 días (Fig. 6). Los controles se prepararon adicionando al medio basal MS 1 mL de agua destilada esteril y 1 mL de etanol al 95%, esto con el objeto de evaluar los efectos tóxicos de los solventes utilizados. También, se preparó un testigo absoluto, que consistió en el medio basal MS sin extracto. En todos los controles se sembró una semilla de lulo. El efecto del extracto sobre la germinación de las semillas se evaluó 30 días después de la siembra, teniendo como variable de respuesta, la tasa de germinación (emergencia de la radícula). El experimento fue establecido bajo un modelo completamente al azar con tres repeticiones por cada tratamiento y cada planta como unidad experimental.

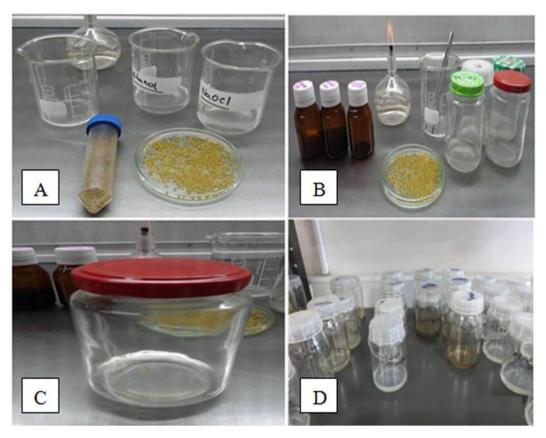


Figura 6. Evaluación del efecto fitotóxico de los extractos sobre la germinación de semillas de lulo. **A.** Lavado y desinfección de semillas. **B.** Siembra de semillas e inoculación de extractos. **C.** Unidad experimental. **D.** Incubación. Fuente: el autor.

4.5.3.2 Evaluación del efecto fitotóxico de los extractos sobre plántulas de lulo

La evaluación se realizó sobre plántulas *in vitro* de lulo *Solanum quitoense* de 45 días de edad, cultivadas individualmente en frascos con 20 mL de medio basal con sales MS a la mitad de la concentración e incubadas a una temperatura de 23°C - 25°C con un fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad (Fig. 7). Cada plántula creciendo en su respectivo medio fue suplementada con 1.0 mL de extracto, los frascos se sellaron con papel cristaflex y fueron incubados durante 15 días bajo las condiciones descritas anteriormente. Los controles se prepararon adicionando a la plántula 1 mL de agua destilada esteril y 1 mL de etanol al 95%, esto con el objeto de evaluar los efectos tóxicos de los solventes utilizados. También, se preparó un testigo absoluto, que consistió en plántulas sin extracto.

El experimento fue establecido bajo un modelo completamente al azar con tres repeticiones por tratamiento. Se evaluó el efecto del extracto sobre la plántula 15 días después de la adición del extracto al medio de cultivo. Las variables evaluadas son las descritas en la Tabla 4, las cual se basa en una escala visual de fitotoxicidad.

Los datos fueron evaluados mediante un análisis de varianza (ANOVA) y la prueba de comparación de medias de Tukey con un nivel de significancia P≤ 0.05.

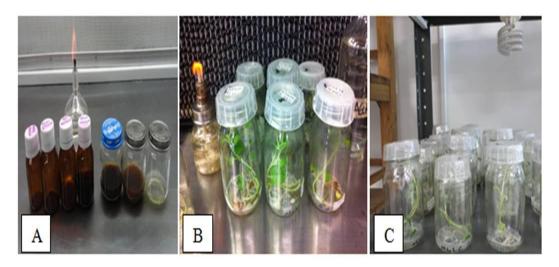


Figura 7. Evaluación del efecto fitotóxico de los extractos de Moringa sobre plántulas de lulo *in vitro*. **A.** Inoculación de extractos. **B.** Incubación. **C.** Evaluación de fitotoxicidad. Fuente: el autor.

Tabla 4. Escala de evaluación del efecto fitotóxico descrita por la Asociación Latinoamericana de Malezas (ALAM), (Arango, 2005).

Grado	Descripción					
0	O Sin daño aparente: igual al testigo					
1	Daño ligero: clorosis y manchas					
2	Daño moderado: enrollamiento foliar, encrespamiento, retraso en el crecimiento y marchitamientos					
3	Daño severo: necrosis y muerte					

4.5.4. Evaluación del efecto de los extractos sobre la Marchitez vascular in vitro.

Para la evaluación de los efectos de los extractos sobre la Marchitez vascular *in vitro*, se utilizaron plántulas de lulo *Solanum quitoense* Lam. de 45 días de edad, cultivadas individualmente en frascos con 20 mL de medio basal con sales MS a la mitad de la concentración e incubadas a una temperatura de 23°C - 25°C con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad. También se selccionaron los extractos que presentaron mayor efecto inhibitorio del crecimiento micelial del patógeno y menor o nula fitotoxicidad.

Inicialmente, se depositó 1.0 mL del extracto alrededor de la corona de cada plántula. Luego, cada planta suplementada con el extracto, fue inoculada con 1.0 mL de suspensión de conidios de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* a una concentración de $1x10^2$ conidias mL-1. Los frascos se cerraron y sellaron con papel cristaflex y fueron incubados a 26°C - 28°C con fotoperiodo de 16 h luz y 8 h de oscuridad durante 14 días. Como controles absolutos se dejaron cuatro plántulas sin extracto pero con inóculo y cuatro plántulas sin inóculo; los testigos de referencia contenían 1.0 mL de agua destilada estéril y 1.0 mL de etanol al 95%.

Las plántulas fueron evaluadas día de por medio a partir de la fecha de inoculación, evaluando la presencia de los síntomas de la Marchitez vascular, descritos en la Tabla 3. Se determinó la incidencia de la enfermedad en las plántulas suplementadas con el extracto e inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, mediante el método descrito previamente (sección 4.5.3.2).

5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.1 Obtención de los extractos

La preparación de los extractos vegetales según la metodología descrita en la sección 4.2 permitieron obtener los siguientes rendimientos (Tabla 5).

Tabla 5. Rendimiento obtenido en las extracciones etanólica, acuosa y oleosa de *Moringa oleífera* Lam.

Muestra	Extracto	Cantidad de muestra (g)	Cantidad de solvente (mL)	Temperatura de extracción (°C)	Tiempo de extracción (h)	Cantidad de extracto (g)	Rendimiento (%)
	Acuoso	100	400	23	24	0.412	0.41
Raiz	Etanólico	100	400	23	24	2.036	2.04
	Oleoso	100	400	78	4	0.01	0.01
	Acuoso	100	400	23	24	0.236	0.24
Hoja	Etanólico	100	400	23	24	0.44	0.44
	Oleoso	100	400	78	4	0.01	0.01
	Acuoso	100	400	23	24	0.408	0.41
Flor	Etanólico	100	400	23	24	0.273	0.27
	Oleoso	100	400	78	4	0.037	0.04
	Acuoso	100	400	23	24	0.604	0.60
Semilla	Etanólico	100	400	23	24	2.112	2.11
	Oleoso	100	400	78	4	23.3	23.30

Los resultados muestran que el mayor porcentaje de rendimiento se obtuvo con el extracto oleoso de semilla, con un 23.3%, valor que difirió significativamente del resto de los extractos, que obtuvieron valores entre 0.01% y 2.11%. Este resultado corrobora lo reportado por Rashid *et al.* (2008), quien reporta hasta un 35% en peso de aceite en semilla de Moringa. El rendimiento fue variable con respecto al órgano de la planta utilizado, se observó mayor rendimiento en los extractos de semilla, seguido por los de raíz, mientras que los extractos de hoja, presentaron los rendimientos más bajos (Tabla 5).

5.2 Aislamiento e identificación de Fusarium oxysporum f. sp. quitoense

5.2.1 Desinfección del material vegetal

La Tabla 6, muestra el efecto de los tratamientos de desinfección con NaOCl al 0.7, 1.4 y 2.0% durante 1 y 2 minutos de inmersión sobre el porcentaje de contaminación bacteriana de explantes de lulo *Solanum quitoense* Lam. var. Castilla donde se presenta contaminación en el tratamiento 1 (hoja al 0.7 % de NaClO por 1 minuto de inmersión). Por otra parte también se observa en la Tabla 6, que el resto de tratamientos tuvieron una efectividad del 100% en el control de la contaminación por bacterias, por lo cual se evidencia una diferencia significativas entre los tratamientos (P< 0.027).

Respecto a la concentración del NaOCl sobre los explantes que presentaron contaminación bacteriana, se presentó diferencias significativas (P<0.027). La contaminación disminuyó al aumentar la concentración de NaOCl. En cuanto al tiempo de inmersión, no se presentaron diferencias significativas (P>0.053). El tiempo de exposición al NaOCl no influyo en los porcentajes de contaminación bacteriana encontrados en los explantes.

Dentro de las posibles causas de contaminación del tratamiento 1 están: la manipulación al momento de hacer la siembra del explante sobre el medio PDA y la presencia de bacterias endófitas en los tejidos del explante. Respecto a las bacterias endófitas, estas se encuentran en todas las partes de la planta incluyendo las semillas, pero principalmente en la zona cortical de las raíces (Martínez y Guadalupe, 2011). De acuerdo a esto, se esperaría haber encontrado contaminación en los explantes de raiz, por el contrario, los resultados muestran que los explantes de raiz tratados a la concentración mínima evaluada (0.7% de NaOCl por 1 minuto de inmersión), no presentaron contaminación. Por otro lado, al observar las tres repeticiones del tratamiento contaminado, se encontró que sólo una repetición presentó colonias de bacterias, que crecieron aisladas sobre la superficie del medio y no sobre los explantes o alrededor de estos. Lo anterior señala que probablemente la contaminación se debió a la manipulación al momento de la siembra y no al tratamiento de desinfección en sí.

Según Estrela *et al.* (2002), la eficacia mostrada por los tratamientos de desinfección sobre la contaminación microbiana se debe a la acción del NaClO, que en reacción con el agua, forma dos especies altamente oxidantes, el ácido hipocloroso (HClO) y el ión hipoclorito (ClO). Estas sustancias reaccionan con los lípidos y las proteínas de las bacterias, mediante procesos como la saponificación y la clorominacion, ocasionando degradación de ácidos grasos y neutralización de proteínas, que dañan la membrana citoplasmática, inactivan enzimas y alteran procesos biosinteticos en el metabolismo celular.

Los resultados muestran que para el control de la contaminación por bacteria, cualquiera de los tratamientos evaluados puede ser utilizado para la desinfección de los explantes de lulo.

Tabla 6. Resultados de los tratamientos de desinfección en diferentes concentraciones y tiempos de inmersión en NaOCl.

Tratamiento	Explante	Repeticiones	NaOCI (%)	Tiempo de inmersión	Contaminación Con bacterias (%)	Efectividad (%)
1	Ноја	3	0.7	1	66.7	33,3
2	Hoja	3	1.4	1	0.0	100
3	Hoja	3	2.0	1	0.0	100
4	Tallo	3	0.7	1	0.0	100
5	Tallo	3	1.4	1	0.0	100
6	Tallo	3	2.0	1	0.0	100
7	Raíz	3	0.7	1	0.0	100
8	Raíz	3	1.4	1	0.0	100
9	Raíz	3	2.0	1	0.0	100
10	Hoja	3	0.7	2	0.0	100
11	Hoja	3	1.4	2	0.0	100
12	Hoja	3	2.0	2	0.0	100
13	Tallo	3	0.7	2	0.0	100
14	Tallo	3	1.4	2	0.0	100
15	Tallo	3	2.0	2	0.0	100
16	Raíz	3	0.7	2	0.0	100
17	Raíz	3	1.4	2	0.0	100
18	Raíz	3	2.0	2	0.0	100

Respecto al efecto de los distintos tratamientos de desinfección sobre el porcentaje de crecimiento de hongos en los explantes de lulo *Solanum quitoense* Lam. var. Castilla, en la Figura 8, se muestra los resultados obtenidos. Se aprecia que el mayor porcentaje de crecimiento de hongos se obtuvo en los explantes que fueron expuestos a una concentración baja de NaOCl y menor tiempo de inmersión, en este caso al 0.7% de NaClO por 1 minuto, por el contrario, los explantes tratados con una concentración alta de NaOCl y mayor tiempo de exposición, en este caso al 2% de NaOCl por 2 min, fueron los que presentaron menor crecimiento fúngico. De acuerdo con el análisis de varianzas, hay diferencias significativas entre los tratamientos (P< 0.00). Esto se atribuye a que la desinfección con cloro sigue una cinética de reacción de primer orden, donde hay una dependencia del tiempo de contacto del desinfectante con el grado de acción de éste sobre los microorganismos (McDonnell y Russell, 1999).

De acuerdo a lo anterior, los resultados obtenidos sugieren que el mejor tratamiento para la desinfección del material vegetal sin afectar el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* y sin presentar contaminación por bacteria, fue la solución de NaOCl al 0.7% de NaClO por 1 minuto de exposición.

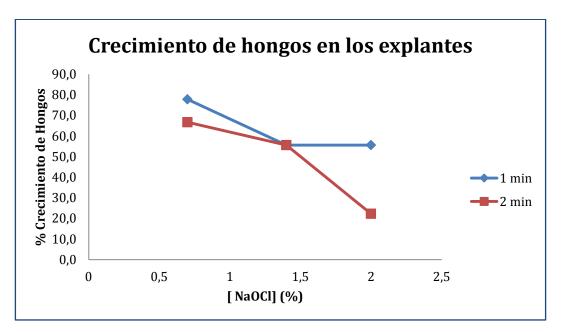


Figura 8. Porcentaje de crecimiento de hongos en los explantes expuestos a los tratamientos de desinfección. Fuente: el autor.

5.2.2 Prueba de patogenicidad

De las muestras vegetales de lulo con síntomas de Marchitez vascular, colectadas en la vereda la Mansión del corregimiento de Monteloro, se obtuvo el aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*. El hongo se seleccionó del aislamiento primario en medio PDA debido a que presentó las siguientes características en medio de cultivo, coincidiendo con las características taxonómicas descritas por Nelson *et al.*, (1983) y Leslie y Summerell (2006): colonias de crecimiento rápido, con diámetros en promedio de 65 mm al séptimo día de incubación a 28°C en PDA, con abundante micelio aéreo, de textura algodonosa, de coloración rosada y pigmentación púrpura al reverso de la colonia (Fig. 9). Desde el punto de vista morfológico, presentó microconidios hialinos en forma ovalada, con uno o dos septos, macroconidios hialinos ligeramente curvados, con tres a cinco septos, extremos acuminados y célula basal en forma de pie. También, estructuras de resistencia denominadas clamidosporas, de forma globosa, de pared lisa, hialinas y sin septos, que se presentaron individuales o en pares (Fig. 9).

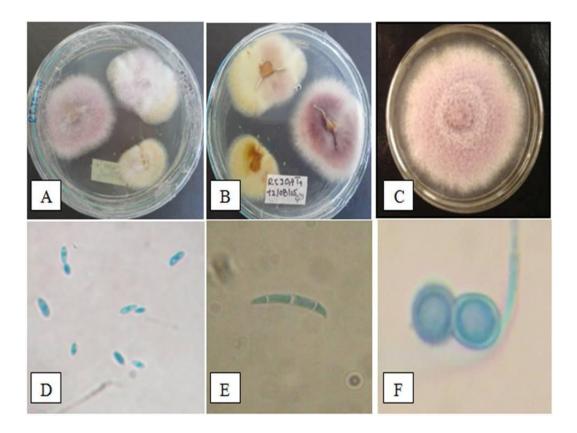


Figura 9. Identificación macroscópica y microscópica del aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*. **A.** Cultivo primario anverso de la colonia. **B.** Cultivo primario reverso de la colonia. **C.** Cultivo axénico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*. **D.** Microconidios. **E.** Macroconidios. **F.** Clamidosporas. Fuente: el autor.

Los resultados obtenidos en la prueba de patogenicidad se resumen en la Tabla 7. Las plántulas inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* reaccionaron positivamente al método de inoculación alrededor de la corona. Los primeros síntomas de la Marchitez vascular aparecieron a los tres días posteriores a la inoculación en los cuatro tratamientos, las raíces presentaban zonas oscuras con pudrición seca; decoloración y estrangulamiento del tallo; marchitez leve en los tratamientos 2 (1x10⁴ conidios. mL⁻¹), 3 (1x10⁶ conidios. mL⁻¹) y 4 (1x10⁸ conidios. mL⁻¹), presentándose en el tratamiento 1 (1x10² conidios. mL⁻¹) a partir del día cinco. Al día 10 se presentó amarillamiento de hojas en los tratamientos 2, 3 y 4, y en el tratamiento 1 al día 12. La muerte de las plántulas se presentó en el día 12 para los tratamientos 2, 3 y 4 y en el día 14, para el tratamiento 1. En los cuatro tratamientos, todas las plántulas presentaron la

sintomatología descrita por Agrios (2005), y Gonzales *et al.* (2012), para la Marchitez vascular, obteniendo al cabo de dos semanas una incidencia de la enfermedad del 100%. Los testigos absolutos presentaron un desarrollo normal sin síntomas observables relacionados con la Marchitez vascular (Fig. 10).

La rápida aparición de síntomas en las plántulas, 72 horas después de la inoculación del patógeno, confirman la susceptibilidad de *Solanum quitoense* a *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, reportado previamente por Ochoa (2002). Respecto al efecto de la concentración del inoculo en la incidencia de la enfermedad, no hubo una diferencia significativa entre los tratamientos, al cabo de dos semanas las cuatro concentraciones ocasionaron el 100% de incidencia. Frente al inicio de la enfermedad respecto a la densidad del inoculo, se observó que en los tratamientos 2, 3 y 4, con concentraciones altas de inoculo, los síntomas de la enfermedad se presentaron más temprano con respecto al tratamiento 1, con menor concentración de inoculo, acentuándose de manera rápida y ocasionando la muerte de las plántulas al día 12, mientras que en el tratamiento 1, los síntomas fueron progresivos hasta alcanzar la muerte al día 14 (Fig. 10). Este resultado concuerda con los resultados obtenidos por Navas-Cortes *et al.* (2002), quienes hallaron que el aumento en la densidad del inoculo provoca una reducción del periodo de incubación de la enfermedad.

Conforme a los resultados obtenidos en la prueba de patogenicidad y encontrando un 100% de incidencia de la enfermedad se confirma que el aislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* obtenido es patogénico y podrá ser empleado en los bioensayos. Igualmente, respecto a la concentración del inoculo, los resultados obtenidos demuestran que el tratamiento, $1x10^2$ conidios mL⁻¹, es el más adecuado para los bioensayos, debido que bajo esta concentración se produce una incidencia del 100% de la enfermedad, infecta de manera uniforme todas las plántulas y los síntomas son progresivos, permitiendo la medición y evaluación de los mismos (Ponce-Herrera *et al.*, 2007).

Tabla 7. Porcentaje de incidencia de la Marchitez vascular en lulo, inoculado con *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* después de 14 días de inoculación.

0.0	.ón o L ⁻¹]	Progreso de los síntomas de la Marchitez vascular en días a partir de la inoculación					con ez ur	n)
Tratamiento	Concentración del inoculo [Conidios mL ⁻¹	Necrosis radicular	Estrangula miento del tallo	Marchitez	Amarillami- ento	Muerte	Plántulas co Marchitez vascular	Porcentaje incidencia (%)
1	$1x10^{2}$	3	3	5	12	14	4	100
2	$1x10^4$	3	3	3	10	12	4	100
3	$1x10^{6}$	3	3	3	10	12	4	100
4	$1x10^{8}$	3	3	3	10	12	4	100
Testigo absoluto	Sin inoculo	0	0	0	0	0	0	0

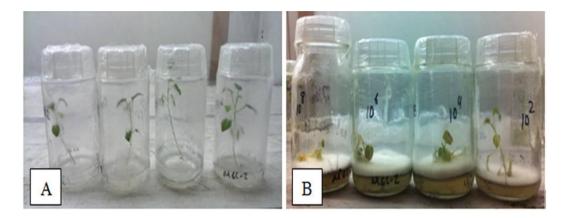


Figura 10. Síntomas de la Marchitez vascular en plántulas de lulo inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*. **A.** Testigos absolutos (sin inóculo) sin síntomas visibles de la marchitez vascular. **B.** Plántulas de lulo muertas en los tratamientos con alta concentración de inoculo $(10^4, 10^6, 10^8)$, en el día 12 a partir de la inoculación. Fuente: el autor.

A partir de tejidos de plántulas de lulo *in vitro*, previamente infectadas con el patógeno que presentaron los síntomas característicos de la Marchitez vascular fue re-aislado *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, siguiendo la metodología descrita en la sesión 4.4

(Fig. 11). El aislamiento y la identificación permitieron a partir del cuarto postulado de Koch, confirmar que el aislamiento es el agente causal de la Marchitez vascular en lulo.

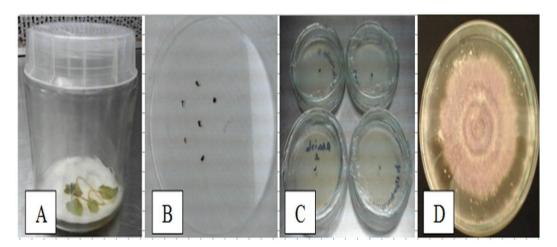


Figura 11. Reaislamiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*. **A.** Plántulas de lulo afectadas con marchitez vascular. **B.** Explantes de tallo y raiz de lulo. **C.** Siembra de explantes en PDA. **D.** Aislado axénico de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*.

5.3 Evaluación de la actividad inhibitoria de los extractos de *Moringa oleífera* Lam. sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*

Los resultados del efecto inhibitorio *in vitro* de los extractos etanólico, acuoso y oleoso de raíz, hoja, flor y semilla de *Moringa oleífera* Lam. en las concentraciones de 5% y 15%, sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* se observan en la Tabla 8. Para la interpretación de los resultados, se consideró con efecto inhibidor los extractos que presentaron un porcentaje de crecimiento menor o igual al 80% y un porcentaje de inhibición mayor o igual al 20% con respecto al testigo (Márquez *et al.*, 2007).

Tabla 8. Resultados actividad inhibitoria de los extractos de *Moringa oleífera* Lam. sobre el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*.

	Concentración del extracto						
Tratamiento	5%		15%				
Tuttamento	% Crecimiento	% Inhibición	% Crecimiento	% Inhibición			
E. Acuoso raíz	83	17	86	14			
E. Etanólico raíz	82	18	83	17			
E. Oleoso raíz	86	14	79	21			
E. Acuoso hoja	88	12	76	24			
E. Etanólico hoja	72	28	77	23			
E. Oleoso hoja	83	17	70	30			
E. Acuoso flor	75	25	81	19			
E. Etanólico flor	80	20	87	13			
E. Oleoso flor	76	24	99	1			
E. Acuoso semilla	60	40	69	31			
E. Etanólico semilla	76	24	85	15			
E. Oleoso semilla	66	34	61	39			
Testigo absoluto	100	0	100	0			

De acuerdo a los resultados obtenidos, de los 24 tratamientos evaluados, el 54.2% presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial del patógeno, con porcentajes de crecimiento igual o menor al 80% y porcentajes de inhibición igual o mayor al 20%. Referente al solvente utilizado, los extractos etanólicos mostraron un bajo efecto de inhibición, con valores entre el 13% y 28%. Los extractos acuosos y oleosos mostraron un mayor efecto inhibitorio, en comparación con los obtenidos en los extractos etanólicos, con porcentajes de inhibición entre 12% y 40% y entre 14% y 39% respectivamente (Fig. 12). El efecto del tipo de extracto (acuoso, etanólico y oleoso) sobre el diámetro del micelio dio un valor de p< 0.5986, indicando que no hay diferencia significativa entre el crecimiento del micelio y el tipo de extracto que se utilice.

Referente al tipo de órgano, los extractos de semilla presentaron en promedio un mayor efecto de inhibición, en comparación con los extractos de hoja, flor y raíz. Sobre la concentración de los extractos, los resultados muestran que al 5% se presentaron los mayores porcentajes de inhibición. El análisis de varianza arroja que el nivel de significación para los efectos del órgano de la planta utilizado para preparar los extractos y la concentración del extracto, sobre el diámetro del micelio, es p< 0.05, es decir, existen diferencias significativas entre los tratamientos.

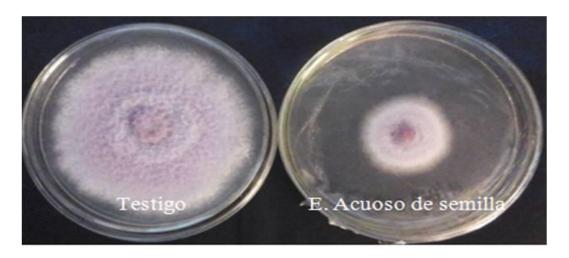


Figura 12. Efecto de Inhibición (porcentaje) sobre el crecimiento micelial de *fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*. por los extractos de *Moringa oleífera* Lam.

5.4 Determinación de la fitotoxicidad de los extractos

La Tabla 9, muestra el efecto de inhibición en la germinación de semillas de lulo expuestas a los extractos de *Moringa oleífera* Lam. Se aprecia que los extractos etanólicos y oleosos preparados con raíz, hoja, flor y semilla de *Moringa oleífera* presentaron un alto efecto inhibitorio sobre la germinación, entre 67% a 100%, comparado con el testigo absoluto, que presentó 100% de germinación. Respecto a los extractos acuosos, se observa que el extracto acuoso preparado con raíz de Moringa, no inhibió la germinación de las semillas de lulo (100% de germinación), pero no así, los

extractos acuosos preparados con flor, hoja y semilla, que presentaron un efecto de inhibición leve, 33%, respecto al testigo absoluto. En el caso de los controles utilizados, el testigo absoluto (sin extracto), presento un 100% de germinación, el testigo de referencia para el solvente (agua destilada estéril), presento un 100% de germinación y el testigo de referencia para el solvente (etanol al 95%), presentó una inhibición completa de la germinación de las semillas; concentraciones altas de etanol ocasionan daño o muerte del embrión, debido a su efecto sobre las membranas biológicas (Salehi *et al.*, 2008).

El análisis estadístico muestra que no hay diferencias significativas (P = 0.918) entre el tipo de órgano vegetal utilizado (raíz, hoja, flor, semilla) y el efecto de inhibición de la germinación, mientras que si hay diferencia significativa entre el tipo de extracto (acuoso, oleoso, etanólico) (P = 0.004) y la germinación de las semillas de lulo, de tal forma que el efecto de inhibición sobre la germinación de las semillas depende del tipo de extracto utilizado.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición de la germinación de semillas de lulo *solanum quitoense* lam. por efecto de los extractos de *Moringa oleífera* Lam.

	Germin	ación (%)		
Tratamiento	%	% Inhibición		
	germinación	germinación		
Extracto etanólico hoja	0	100		
Extracto etanólico raíz	0	100		
Extracto. etanólico semilla	0	100		
Extracto etanólico flor	33	67		
Extracto oleoso semilla	0	100		
Extracto oleoso raíz	0	100		
Extracto oleoso hoja	33	67		
Extracto oleoso flor	33	67		
Extracto acuoso raíz	100	0		
Extracto acuoso flor	67	33		
Extracto acuoso semilla	67	33		
Extracto acuoso hoja	67	33		
Testigo absoluto (sin extracto)	100	0		
Testigo referente (solvente agua)	100	0		
Testigo referente (solvente etanol)	0	100		

En cuanto al efecto de los extractos de Moringa oleífera sobre las plántulas de lulo in vitro de 45 días de edad, los resultados (Fig. 14) muestran que todos los extractos evaluados con independencia del tipo de órgano utilizado (raíz, hoja, flor, semilla) o tipo de extracto utilizado (acuoso, oleoso, etanólico), ocasionaron síntomas de fitotoxicidad sobre las plántulas comparados con el testigo absoluto (sin extracto). Los extractos etanólicos de raíz, hoja y semilla, asi como los extractos oleosos de raíz, hoja y flor, provocaron daño severo (Fig. 13). El extracto etanólico de flor, oleoso de semilla y acuoso de flor, provocaron daño moderado. Los extractos acuosos de raíz, hoja y semilla, presentaron un daño ligero, caracterizado por un amarillamiento leve, sin alteración de la morfogénesis, el crecimiento y la fisiología de la planta (Fig. 13). En el caso de los controles utilizados, el testigo absoluto (plántulas sin extracto), presentó un desarrollo normal sin síntomas de fitotoxicidad, el testigo de referencia para el solvente (agua destilada estéril), presentó un desarrollo normal sin síntomas de fitotoxicidad. Por el contrario, el testigo de referencia para el solvente (etanol al 95%), presentó decoloración de tallos y hojas y marchites generalizada (Fig. 13). Es importante mencionar que las aplicaciones radiculares de alcohol causan daños en las plantas, ocasionando disminución en el crecimiento y Marchitez generalizada (Rowe et al, 1994).

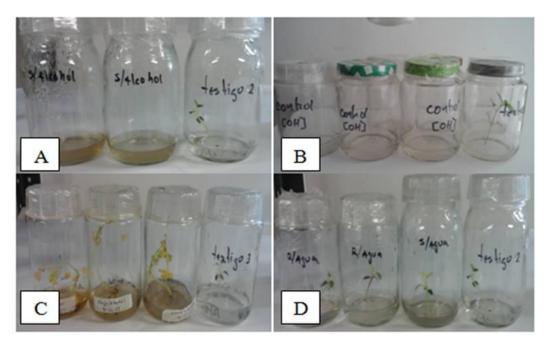


Figura 13. Efecto fitotóxico de los extractos de *Moringa oleífera* Lam. sobre semillas y plántulas de lulo. **A.** Inhibición de la germinación en semillas de lulo tratadas con extracto etanólico de semillas de *Moringa*. **B.** Control de referencia para el solvente (etanol 95%) utilizado en la preparación de los extractos. **C.** Plantulas de lulo tratadas con extracto etanólico de hoja de *Moringa*. **D.** Plantulas de lulo tratadas con extracto acuoso de semilla y raiz de *Moringa*. Fuente: el autor.

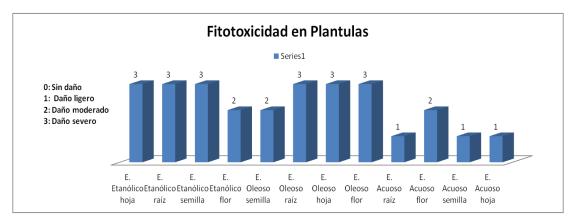


Figura 14. Grado de fitotoxicidad en plántulas de lulo tratadas con extractos de *Moringa oleífera* Lam.

De tal forma que los extractos de baja fitotoxicidad y que inhibieron el crecimiento del hongo podrán ser empleados en la siguiente fase: interacción hongo, extracto y planta bajo condiciones *in vitro*.

Trabajos de investigación recientes han demostrado la actividad alelopática de Moringa oleífera Lam asociada a diversos cultivos; por ejemplo, Sarmin, (2014), encontró que concentraciones altas de extractos preparados con raíz, corteza y hoja de Moringa oleífera, inhibían la germinación de semillas de Triticum aestivum (Trigo); Hossain et al. (2012), reportaron actividad inhibitoria de los extractos de raíz de Moringa oleífera, sobre el crecimiento y rendimiento del frijol mungo (Vigna radiata); Abou-Zeid y Salama (2014), evaluaron el potencial alelopático de extractos de hoja de Moringa oleífera, sobre cultivos mixtos de haba verde (Vicia faba Lam) y Maíz (Zea mays), encontrando, que altas concentraciones del extracto inhibían la germinación y crecimiento de las plantas. Estas investigaciones indican que los extractos de Moringa oleífera contienen sustancias con efectos alelopáticos sobre otras plantas. Con base en estos hallazgos, probablemente los efectos fitotóxicos observados sobre la germinación de las semillas y la morfogénesis de las plántulas de lulo, se debe a la actividad de una variedad de sustancias alelopáticas presentes en los extractos de Moringa oleífera, como alcaloides, flavonoides, saponinas, taninos, terpenos y quinonas (Amabye y Tadesse, 2016; Samir, 2014). Dentro de las moléculas alelopáticas, los fenoles, inhiben la acción de las giberelinas, responsables de la germinación de las semillas al interrumpir el periodo de latencia de las mismas; en este sentido, Tejada y Rodríguez (2014), encontraron que existe una correlación positiva entre la concentración de compuestos de naturaleza fenólica, presentes en los metabolitos secundarios de las plantas y el efecto de inhibición de la germinación y el crecimiento de plantas.

5.5 Evaluación del efecto de los extractos sobre la Marchitez vascular in vitro.

En la Tabla 10, se presentan los resultados obtenidos del efecto de los extractos evaluados (extractos que presentaron mayor actividad inhibitoria sobre el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* y baja fitotoxicidad sobre semillas y plántulas de lulo *Solanum quitoense* Lam) sobre la Marchitez vascular *in vitro*. El análisis de varianza muestra que hay diferencias significativas entre los tratamientos

(P<0.05). Se puede observar que el tiempo de aparición de los primeros síntomas de la enfermedad a partir de la inoculación fue variable entre los tratamientos. La pudrición de raíces y estrangulamiento del tallo, aparecieron al día tres, en el tratamiento extracto acuoso de flor, al día cinco, en los tratamientos extracto oleoso hoja y al día siete, en el tratamiento extracto etanólico hoja. El amarillamiento de hojas se presentó al día siete en los tratamientos oleoso hoja y acuoso flor, y al día 12, en el etanólico hoja. La muerte de las plántulas sobrevino al día 12 en el tratamiento oleoso hoja y al día 14 en el tratamiento acuoso flor y etanólico hoja.

En los tratamientos, extracto acuoso y oleoso semilla, no se presentaron síntomas observables de la enfermedad durante el tiempo de la evaluación (Fig. 15). En el caso de los controles utilizados, el testigo positivo (plántulas con inoculo pero sin extracto), desarrolló los síntomas de la enfermedad a partir del tercer día de la inoculación, acentuándose los síntomas con el transcurso del tiempo de la evaluación, finalizando con la muerte de las plántulas el día 14. El testigo negativo presentó un desarrollo normal sin síntomas observables relacionados con la Marchitez vascular.

Tabla 10. Porcentaje de incidencia de la Marchitez vascular *in vitro* en plántulas de lulo tratadas previamente con extractos de *Moringa oleifera* Lam.

			Progreso Marchite la inocul	chitez	a				
	Tratamiento	Inoculo	Necrosis radicular	Estrangulamiento de tallo	Marchitez	Amarillamiento	Muerte	Plántulas con Marchitez vascular	% de incidencia
	E. Acuoso semilla	$1x10^2$	0	0	0	0	0	0	0
	E. Oleoso semilla	$1x10^2$	0	0	0	0	0	0	0
	E. Oleoso hoja	$1x10^2$	5	5	7	7	12	3	100
	E. Acuoso flor	$1x10^2$	3	3	3	7	14	3	100
	E. Etanólico hoja	$1x10^2$	7	7	10	12	14	3	100
R	Testigo absoluto (con inoculo y sin extracto)	1×10^2	3	3	5	5	14	3	100

especto a la incidencia de la Marchitez vascular, al día 14 de la evaluación, el extracto acuoso de semilla mostro una alta eficacia en el control de la enfermedad, con 0% de incidencia (Fig. 15 D). El resto de los tratamientos presentaron una incidencia del 100%

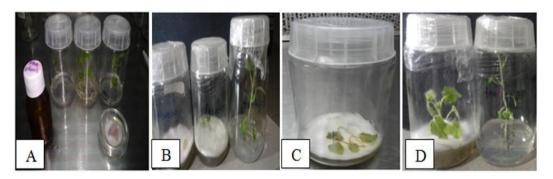


Figura 15. Efecto de la Marchitez vascular *in vitro* sobre plántulas de lulo tratadas con extractos de *Moringa*. **A.** Aplicación de los extractos de *Moringa* e inoculación con *Fusarium oxysporum* f.sp. *quitoense*. **B.** Plantulas de lulo tratadas con extracto acuoso de flor de *Moringa*. **C.** Control de referencia (plántulas sin extracto de *Moringa* e inoculadas con el patógeno). **C.** Plantulas de lulo tratadas con extracto acuoso de semilla de *Moringa* y control absoluto (plántulas sin inóculo del patógeno ni extracto de Moringa); se evidencia el efecto protector del extracto vegetal.

Es posible que el efecto bioprotector presentado por los extractos acuoso y oleoso de semilla de *Moringa oleífera* Lam (Fig. 15), se deba a la inducción de resistencia sistémica en las plántulas frente al patógeno, más que a un efecto antimicrobiano directo, igual al observado en la prueba de actividad inhibitoria *in vitro* del crecimiento micelial del patógeno (sección 5.3), esto, debido a que no se observó ningún tipo de inhibición del crecimiento micelial del hongo y por el contrario, en todos los tratamientos evaluados, el hongo se desarrolló continuamente hasta cubrir por completo el medio de crecimiento de las plántulas (Fig. 15). La ausencia del efecto inhibidor de los extractos sobre el crecimiento micelial del hongo observado en la sección 5.3, probablemente se debe a que las sustancias alelopáticas presentes en los extractos fueron rápidamente extraídas del medio de cultivo y traslocadas a través de la planta de lulo, favoreciendo la actividad de la respuesta de defensa de las células vegetales (Garcia, 2006).

Es importante recordar que Moringa oleífera Lam. es una planta rica en metabolitos secundarios que son sintetizados en todos los órganos de la planta, como hojas, raíces, semillas y flores, y liberadas al medio externo a través de procesos como la volatización, lixiviación, exudación o por la descomposición de residuos vegetales. Estas moléculas promueven el crecimiento y la productividad de las plantas; adicionalmente activan mecanismos de defensa, mejorando la resistencia contra plagas y enfermedades (Hussain et al., 2013). Una vez el metabolito secundario (elicitor) es reconocido por las moléculas endógenas de la planta blanco, se desencadenan procesos fisiológicos y bioquímicos que le permiten a las plantas dar una respuesta contra las enfermedades y las plagas. Esta respuesta se conoce como resistencia inducida y puede ser de dos tipos, resistencia Sistémica Adquirida (RSA) y Resistencia Sistémica Inducida (RSI) (Gomez y Reis, 2011). Dentro de las moléculas activadoras de resistencia inducida en plantas, se encuentran: glicoproteínas, proteínas, péptidos, lipoproteínas, glicolípidos, lípidos, lipopolisacáridos, oligosacáridos, polisacáridos y acidos grasos (Gomez y Reis, 2011). Las semillas de Moringa oleífera Lam, son ricas en ácidos grasos (Marrero et al., 2014), fenoles, flavonoides y taninos (Mohammed y Manan, 2015). De acuerdo con esto, las semillas de Moringa oleífera contienen moléculas consideradas elicitores (ácido oleico, ácido linoléico, ácido araquidónico, ácido eicosapentaenóico), lo cual probablemente, explique la causa de los efectos inhibitorios encontrados en los extractos oleosos y acuosos de semilla.

6. CONCLUSIONES

- La utilización de hipoclorito de sodio (NaOCl) en las concentraciones de 0,7%, 1,4% y 2%, en los tiempos de exposición de 1 y 2 minutos, evitaron la contaminación bacteriana de los explantes de lulo; sin embargo, el mejor tratamiento para la desinfección de los explantes de lulo sin afectar el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* fue la concentración de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 0,7% con 1 minuto de inmersión.
- Al aumentar el tiempo de exposición de los explantes en las tres concentraciones de hipoclorito de sodio (NaOCl) evaluadas, disminuye la cantidad de hongos aislados.
- El rápido desarrollo y la alta incidencia de la Marchitez vascular en las plántulas de lulo inoculadas con el aislamiento obtenido de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, confirman la especificidad del patógeno por la planta, mostrando claramente una interacción compatible.
- Los resultados de la prueba de patogénenicidad corroboraron las características culturales y patogénicas del hongo aislado de plantas de lulo enfermas.
- Los síntomas de la Marchitez vascular en plántulas de lulo bajo condiciones *in vitro*, se manifiestan a los tres días después de haber sido inoculadas con *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* alrededor de la corona del tallo.
- El extracto acuoso y oleoso de las semillas de *Moringa oleífera* presentaron la mayor actividad inhibitoria del crecimiento micelial *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*.
- Los extractos de *Moringa oleífera* evaluados presentaron efecto inhibitorio sobre la germinación *in vitro* de semillas de lulo, excepto, el extracto acuoso de raíz, que permitió el 100% de la germinación de las semillas.
- Los extractos de *Moringa oleífera* evaluados presentaron efecto fitotóxico severo, moderado, leve y ligero sobre las plántulas de lulo *in vitro*.
- Los extractos acuoso y oleoso de semilla de *Moringa oleífera* fueron los mejores extractos para el control de *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, generando un efecto bioprotector en la planta frente a la interacción con el patógeno.

- En el patosistema *Solanum quitoense* vs *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense*, se evaluó el efecto protector de los extractos de *Moringa oleífera* Lam, y se reporta el efecto bioprotector de los extractos acuoso y oleoso de semilla; se desconoce el compuesto o compuestos bioactivos presentes en los extractos y su función como inductores de los mecanismos de defensa de la planta.

7. RECOMENDACIONES

- Con el objeto de confirmar que el aislamiento corresponde a la forma especial quitoense y la posibilidad de encontrar razas y/o biotipos de éste, sería conveniente hacer análisis moleculares.

Es necesario determinar la composición química de los extractos evaluados mediante un análisis cromatográfico y de espectrometría de masas para identificar los componentes biológicamente activos.

- Evaluar la eficacia en campo de los extractos de Moringa oleífera Lam, con el fin de desarrollar un Bioinsumo que pueda controlar de manera significativa la Marchitez vascular del lulo.
- Se propone como trabajo a futuro evaluar la respuesta sistémica de defensa que pueda ser inducida por los extractos de *Moringa oleífera* en plántulas de lulo y especies cercanas.

7. REFERENCIAS

Abou-Zeid, H. M., & Salama, M. (2014). Biological interactions between Moringa oleifera Lam. and two common food intercrops: growth and some physiological attributes. *International Journal*, 2(6), 823-836.

Abuye, C., Urga, K., Knapp, H., Selmar, D., Omwega, A. M., Imungi, J. K., & Winterhalter, P. (2004). A compositional study of Moringa stenopetala leaves. *East African medical journal*, 80(5), 247-252.

Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology* (vol. 5). Elsevier academic press.

Agronet(2014). Base de datos de cifras agropecuarias en Colombia. Recuperado de www.agronet.gov.co/

Alfaro, N. C., & Martínez, W. (2008). Uso potencial de la moringa (Moringa oleifera Lam.) para la producción de alimentos nutricionalmente mejorados. *INCAP*, *Guatemala*.

Amabye TG, Tadesse FM (2016) Phytochemical and Antibacterial Activity of *Moringa Oleifera* Available in the Market of Mekelle. J Anal Pharm Res 2(1): 00011. DOI: 10.15406/japlr.2016.02.00011

Amaglo, N. K., Bennett, R. N., Curto, R. B. L., Rosa, E. A., Turco, V. L., Giuffrida, A., ... & Timpo, G. M. (2010). Profiling selected phytochemicals and nutrients in different tissues of the multipurpose tree Moringa oleifera L., grown in Ghana. *Food Chemistry*, 122(4), 1047-1054.

Angulo, R. (2006). Lulo: el cultivo. *Universidad Jorge Tadeo Lozano*, Bogota, Colombia.

Anwar, F., Latif, S., Ashraf, M., & Gilani, A. H. (2007). Moringa oleifera: a food plant with multiple medicinal uses. *Phytotherapy research*, 21(1), 17-25.

Arroyo, S. G., Valenzuela, C. M., López, Y. C., Arroyo, A. M., Segura, M. E. C., Pietrini, R. V., & Waliszewski, S. M. (2013). Riesgo genotóxico por la exposición ocupacional a plaguicidas en América Latina. *Revista Internacional de Contaminación Ambiental*, 29, 159-180.

Auwal, M. S., Tijjani, A. N., Sadiq, M. A., Saka, S., Mairiga, I. A., Shuaibu, A., ... & Gulani, I. A. (2013). Antibacterial and haematological activity of Moringa oleifera aqueous seed extract in Wistar albino rats. *Sokoto Journal of Veterinary Sciences*, *11*(1), 28-37.

Bennett, R. N., Mellon, F. A., Foidl, N., Pratt, J. H., Dupont, M. S., Perkins, L., & Kroon, P. A. (2003). Profiling glucosinolates and phenolics in vegetative and reproductive tissues of the multi-purpose trees Moringa oleifera L.(horseradish tree) and Moringa stenopetala L. *Journal of agricultural and food chemistry*, *51*(12), 3546-3553.

Cáceres Montes, C. M., Ayala, D., & Carolina, J. (2005). Propuesta de tratamiento de aguas de desecho de una industria química de adhesivos utilizando extracto acuoso de la semilla de Moringa oleifera Teberinto (Doctoral dissertation). Universidad de El Salvador, Salvador.

Caceres, A., Cabrera, O., Morales, O., Mollinedo, P., & Mendia, P. (1991). Pharmacological properties of Moringa oleifera. 1: Preliminary screening for antimicrobial activity. *Journal of Ethnopharmacology*, *33*(3), 213-216.

Cancino-Escalante, G. O., García, E. Q., Villamizar, C. E., & Carvajal, C. D. (2015). Propagación in vitro de materiales seleccionados de Rubus glaucus Benth (mora de Castilla) en la provincia de Pamplona, región nororiental de Colombia. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 17(2), 7-15.

Cardenas, A. (2005). Lineamientos de política sobre uso y manejo mesurado de plaguicidas con énfasis en el sector agropecuario y forestal del departamento de Antioquia. *Convenio Interinstitucional CORNARE-LA CEIBA-DAMA Consejo Seccional de Plaguicidas de Antioquia Medellín*, Medellin, Colombia.

Carreño, N., Vargas, A., Bernal, A. J., & Restrepo, S. (2007). Problemas fitopatológicos en especies de la familia Solanaceae causados por los géneros Phytophthora, Alternaria y Ralstonia en Colombia. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, 25(2), 320-329.

Cerrato, R. F., & Alarcón, A. (2015). La microbiología del suelo en la agricultura sostenible. *CIENCIA ergo-sum*, 8(2), 175-183.

Chaparro-Narváez, P., & Castañeda-Orjuela, C. (2015). Mortalidad debida a intoxicación por plaguicidas en Colombia entre 1998 y 2011. *Biomédica*, 35(Supl 2), 90-102.

Chuang, P. H., Lee, C. W., Chou, J. Y., Murugan, M., Shieh, B. J., & Chen, H. M. (2007). Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of Moringa oleifera Lam. *Bioresource technology*, 98(1), 232-236.

Criollo Escobar, H. A. Estudios orientados a la regeneración de plantas de lulo (Solanum quitoense Lam.) a través de la embriogénesis somática (Doctoral dissertation). Universidad Nacional de Colombia, Bogota, Colombia.

Czymmek, K. J., Fogg, M., Powell, D. H., Sweigard, J., Park, S. Y., & Kang, S. (2007). In vivo time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the Arabidopsis root vascular system by Fusarium oxysporum. *Fungal Genetics and Biology*, 44(10), 1011-1023.

Daouk, R. K., Dagher, S. M., & Sattout, E. J. (1995). Antifungal activity of the essential oil of Origanum syriacum L. *Journal of Food Protection*®, *58*(10), 1147-1149.

Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, *13*(4), 414-430.

Departamento Administrativo Nacional de Estadística DANE. (2000-2014). Estadísticas Exportaciones Colombianas de Frutas Tropicales. Recuperado de http://www.legiscomex.com/BancoMedios/Documentos%20PDF/exportaciones-estudio-frutas-exoticas.pdf.

Dita, M., Echegoyén Ramos, P. E., & Pérez Vicente, L. F. (2013). Plan de contingencia ante un brote de la raza 4 tropical de Fusarium oxysporum f. sp. cubense en un país de la región del OIRSA. Organismo Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria, San Salvador, El Salvador.

Estrela, C., Estrela, C. R., Barbin, E. L., Spanó, J. C. E., Marchesan, M. A., & Pécora, J. D. (2002). Mechanism of action of sodium hypochlorite. *Brazilian dental journal*, *13*(2), 113-117.

Estupiñan, H., & Ossa, J. (2007). Efecto del agente causal de la marchitez vascular de la uchuva (Physalis peruviana L) el hongo Fusarium oxysporum, sobre algunas solanáceas y otras especies cultivadas afectadas por formas especiales del microorganismo. *Trabajo de Grado Microbiología Agrícola. Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias*, Bogotá, Colombia.

Ettlinger, M. G., & Lundeen, A. J. (1956). The mustard oil of Limnanthes douglasii seed, m-methoxybenzyl isothiocyanate. *Journal of the American Chemical Society*, 78(9), 1952-1954.

Fahey, J. W., Zalcmann, A. T., & Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry*, 56(1), 5-51.

Falasca, S., & Bernabé, M. A. (2008). Potenciales usos y delimitación del área de cultivo de Moringa oleifera en Argentina. *Revista virtual REDESMA*, 2(1), 1-17.

Farooq, F., Rai, M., Tiwari, A., Khan, A. A., & Farooq, S. (2012). Medicinal properties of Moringa oleifera: An overview of promising healer. *Journal of Medicinal Plants Research*, 6(27), 4368-4374.

García Lozano, J., Floriano, Q., & Johana Andrea Vera, L. F. S. (2007). Boletin tecnico *Enfermedades y plagas del cultivo del lulo (Solanum quitoense) en el departamento del Huila*. Corporación Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Huila, Colombia.

García Lozano, J., Floriano, Q., & Johana Andrea Vera, L. F. S. (2007). Boletin tecnico *Enfermedades y plagas del cultivo del lulo (Solanum quitoense) en el departamento del Huila*. Corporación Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Huila, Colombia.

García Lozano, J., Floriano, Q., & Johana Andrea Vera, L. F. S. (2007). Boletin tecnico *Enfermedades y plagas del cultivo del lulo (Solanum quitoense) en el departamento del Huila*. Corporación Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Huila, Colombia.

Gómez, D. E., & Reis, E. M. (2011). Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. *Revista Química Viva*, 10(1), 6-17.

Gomez-Arroyo, S., Martínez-Valenzuela, C., Calvo-González, S., Villalobos-Pietrini, R., Waliszewski, S., Calderon-Segura, M. E., ... & Lagarda-Escarrega, A. (2013). Assessing the genotoxic risk for mexican children who are in residential proximity to agricultural areas with intense aerial pesticide applications. *Rev Int Contam Ambient*, 29(3), 217-25.

Gómez-Merino, Fernando C.; García-Albarado, J. Cruz; Cadeña-Íñiguez, Jorge; Trejo-Téllez, Libia I.; (2014). Lulo (Solanum quitoense [Lamarck.]) como cultivo novedoso en el paisaje agroecosistémico mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, Noviembre-Sin mes, 1741-1753.

González gallegos, E. (2015). Agentes bióticos y abióticos como inductores de resistencia a enfermedades en el cultivo de papa. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Coahuila, Mexico.

González, I., Yailén, A., & Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici-tomate. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1), 1-7.

Grube, A., Donaldson, D., Kiely, T., & Wu, L. (2011). Pesticides industry sales and usage. *U.S. Environmental Protection Agency*, Washington, United States of America.

Gutierrez, D. (2015). Establecimiento de la metodología para la Micropropagación de lulo (Solanum quitoense Var. Castilla) (Tesis). Universidad de Caldas, Manizales.

Hossain, M. M., Miah, G., Ahamed, T., & Sarmin, N. S. (2012). Study on allelopathic effect of Moringa oleifera on the growth and productivity of mungbean. *Intl. J. Agric & crop sci*, *4*, 1122-1128.

Iannacone, J., & Lamas, G. (2002). Efecto de dos extractos botánicos y un insecticida convencional sobre el depredador Chrysoperla externa. *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología*, 65, 92-101.

Instituto Colombiano Agropecuario –ICA– (2011). *Manejo fitosanitario del cultivo del lulo*. Recuperado en mayo 30 de 2014 de http://www.ica.gov.co/getattachment/

de9f2f66-898a-45b8-848d-0c49a23ca70c/manejo-fitosanitario- del-cultivo-de-lulo-(solanum.aspx

Lafont, J. J., Calle, E. A., & Durango, L. C. (2013). Composición Química del Aceite de Almendras producidas por el Árbol Olleto (Lecythis minor DC). *Información tecnológica*, 24(1), 59-68.

Leng, P., Zhang, Z., Pan, G., & Zhao, M. (2014). Applications and development trends in biopesticides. *African Journal of Biotechnology*, *10*(86), 19864-19873.

León Sicard, T. (2004). Consideraciones ambientales del sector agropecuario y del medio rural colombiano. *Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural*, Bogota, Colombia.

Leslie, J. F., & Summerell, B. A. (2006). *The Fusarium laboratory manual* (Vol. 2, No. 10). Iowa, United States of America: Blackwell Publishing.

Lobo Arias, M., Medina Cano, C. I., Delgado Paz, O. A., & Bermeo Giraldo, A. (2007). Variabilidad morfológica de la colección colombiana de lulo (solanum quitoense lam.) y especies relacionadas de la sección Lasiocarpa. *Revista Facultad Nacional de Agronomía, Medellín, 60*(2), 3939-3964.

Ma, L. J., Geiser, D. M., Proctor, R. H., Rooney, A. P., O'Donnell, K., Trail, F., ... & Kazan, K. (2013). Fusarium pathogenomics. *Annual review of microbiology*, 67, 399-416.

Makonnen, E., Hunde, A., & Damecha, G. (1997). Hypoglycaemic effect of Moringa stenopetala aqueous extract in rabbits. *Phytotherapy Research*, *11*(2), 147-148.

Márquez Vizcaíno, R. L., De La Rosa Torres, C., & Mercado Pérez, A. (2007). Actividad antifungica del extracto total en etanol de la hojas frescas de Pedilanthus tithymaloides L Poit (ULTIMORRIAL). *Scientia Et Technica*, *13*(33).

Marrero Delange, D., Murillo, R. V., González Canavaciolo, V. L., & Gutiérrez Amaro, J. (2014). Composición de ácidos grasos del aceite de las semillas de Moringa oleífera que crece en La Habana, Cuba. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 19(2), 197-204.

Martínez, b. 1., & Guadalupe, e. (2011). Abatimiento de salmonella sp. en tejidos internos de planta de papa (solanum tuberosum l.) mediante la inoculación de bacillus sp (doctoral dissertation). Instituto Politecnico Nacional, Jiquilpan Michoacan, Mexico.

Martínez-Valenzuela, C., & Gómez-Arroyo, S. (2007). Riesgo genotóxico por exposición a plaguicidas en trabajadores agrícolas. *Revista internacional de contaminación ambiental*, 23(4), 185-200.

McDonnell, G., & Russell, A. D. (1999). Antiseptics and disinfectants: activity, action, and resistance. *Clinical microbiology reviews*, *12*(1), 147-179.

Metodológica, F., & para la Localización, R. (2010). Departamento Administrativo Nacional de Estadística, Bogota, Colombia.

Mohammed, S., & Manan, F. A. (2015). Analysis of Totalphenolics, Tannins and Flavonoids from Moringa Oleifera Seed Extract. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 7(1), 132-135.

Moo-Koh, F. A., Cristóbal Alejo, J., Reyes-Ramírez, A., Tun-Suárez, J. M., Sandoval-Luna, R., & Ramírez-Pool, J. A. (2014). Actividad *in vitro* del extracto acuoso del Bonellia flammea contra hongos fitopatógenos. *Agrociencia*, 48(8), 833-845.

Muñoz Belalcazar, J. A. (2011). Análisis de la competitividad del sistema de producción de lulo (Solanum quitoense Lam.) en tres municipios de Nariño (Doctoral dissertation). Universidad Nacional de Colombia, Bogota, Colombia.

Naik, S. N., & Prasad, R. (2006). Pesticide residue in organic and conventional food-risk analysis. *Journal of Chemical Health and Safety*, *13*(6), 12-19.

Nava-Pérez, E., García-Gutiérrez, C., Camacho-Báez, J. R., & Vázquez-Montoya, E. L. (2012). Bioplaguicidas: una opción para el control biológico de plagas. *Ra Ximhai*, 8(3), 17-29.

Navas-Cortés, J. A., Alcalá-Jiménez, A. R., Hau, B., & Jiménez-Díaz, R. M. (2002). Influence of inoculum density of races 0 and 5 of Fusarium oxysporum f. sp. ciceris on development of Fusarium wilt in chickpea cultivars. *European journal of plant pathology*, 106(2), 135-146.

Nelson, P. E., & Ploetz, R. C. (1990). Taxonomy of fungi in the genus Fusarium with emphasis on Fusarium oxysporum. In *Fusarium wilt of banana*. (pp. 27-35). APS Press.

Nepolean, P., Anitha, J., & Emilin, R. R. (2009). Isolation, analysis and identification of phytochemicals of antimicrobial activity of Moringa oleifera Lam. *Current biotica*, *3*(1), 33-37.

Ochoa, J. B., Yangari, B. F., Ellis, M. A., & Williams, R. N. (2004). Two new formae specialis of Fusarium oxysporum, causing vascular wilt on babaco (Carica heilbornii var. pentagona) and vascular wilt on naranjilla (Solanum quitoense) in Ecuador. *Fitopatologia*, 39,(2),10-17.

Okorski, A., Pszczółkowska, A., Oszako, T., & Nowakowska, J. A. (2015). Current possibilities and prospects of using fungicides in forestry. *Forest Research Papers*, 76(2), 191-206.

Pal, S. K., Mukherjee, P. K., & Saha, B. P. (1995). Studies on the antiulcer activity of Moringa oleifera leaf extract on gastric ulcer models in rats. *Phytotherapy Research*, *9*(6), 463-465.

Pérez López, E. (2012). Plaguicidas botánicos: Una alternativa a tener en cuenta. *Fitosanidad*, *16*(1), 51-59.

Pérez, A., Sánchez, T., Armengol, N., & Reyes, F. (2010). Características y potencialidades de Moringa oleifera, Lamark: Una alternativa para la alimentación animal. *Pastos y Forrajes*, *33*(4), 1-1.

Pierik, R. L. M. (1990). Cultivo in vitro de las plantas superiores. *Ediciones Mundi Prensa, Madrid, Spain*, 13-26.

Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria. (2006). Productores de lulo y mora competitivos mediante selección participativa de clones élite, manejo integrado del cultivo y fortalecimiento de cadenas de valor. *Centro Internacional de Agricultura Tropical*, Palmira, Colombia.

Ponce-Herrera, V., García-Espinoza, R., Rodríguez-Guzmán, M., & Zavaleta-Mejía, E. (2008). Análisis temporal de la pudrición blanca (Sclerotium cepivorum Berk.) de la cebolla (Allium cepa L.) bajo tres niveles de inóculo del patógeno. *Agrociencia*, 42(1), 71-83.

Quintana, Y., & Lenín, W. (2015). Efecto toxicológico de extractos vegetales sobre Fusarium oxysporum bajo condiciones controladas. Universidad Tecnica Estatal de Quevedo, Quevedo, Ecuador.

Radovich, T. (2011). Farm and forestry production and marketing profile for Moringa (Moringa oleifera). *Specialty crops for Pacific island agroforestry*. Recuperado de http://miracletrees.org/moringadoc/production_and_marketing_moringa_farm_and_fore stry.pdf

Ramirez-Mares, M. V., & Hernandez-Carlos. (2015). Plant-derived natural products from the american continent for the control of phytopathogenic fungi: a review. *Journal of global innovation in agricultural and social sciences*, 3(4), 96-118.

Rashid, U., Anwar, F., Moser, B. R., & Knothe, G. (2008). Moringa oleifera oil: a possible source of biodiesel. *Bioresource technology*, 99(17), 8175-8179.

Rask, L., Andréasson, E., Ekbom, B., Eriksson, S., Pontoppidan, B., & Meijer, J. (2000). Myrosinase: gene family evolution and herbivore defense in Brassicaceae. In *Plant Molecular Evolution* (pp. 93-113). Springer Netherlands.

Revelo, J., Viteri, P., Vásquez, W., León, J., & Gallegos, P. (2010). Manual técnico del cultivo ecológico de la naranjilla. *Instituto Nacional de Investigaciones Agropecuarias*, Santa Catalina, Ecuador.

Rojas González, S., García Lozano, J., & Alarcón Rojas, M. (2004). Boletin técnico Propagación asexual de las plantas: conceptos básicos y experiencias con especies amazónicas. Corporacion Colombiana de Investigación Agropecuaría, Bogota, Colombia.

Rojas, C. M., Muñoz, L. A., Terán, V. F., Prado, F. A., & Magally, A. Q. (2010). Evaluación de patógenos en clones de lulo (Solanum quitoense Lam.). *Acta Agronómica*, 59(2), 144-154.

Rouabhi, R. (2010). Introduction and toxicology of fungicide. In Fungicides (ed. O. Carisse), pp. 363–382. Rijeka, Croatia: InTech.

Rowe, R. N., Farr, D. J., & Richards, B. A. J. (1994). Effects of foliar and root applications of methanol or ethanol on the growth of tomato plants (*Lycopersicon esculentum* Mill). *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science*, 22 (3), 335-337, DOI: 10.1080/01140671.1994.9513842.

Salehi, M. R., Ashiri, F., & Salehi, H. (2008). Effect of different ethanol concentrations on seed germination of three turfgrass genera. *Advances in Natural and Applied Sciences*, 2(1), 6-10.

Sanchez, N. R., Ledin, S., & Ledin, I. (2006). Biomass production and chemical composition of Moringa oleifera under different management regimes in Nicaragua. *Agroforestry Systems*, 66(3), 231-242.

Sarmin, N. S. (2014). Effect of Moringa oleifera on Germination and Growth of *Triticum aestivum. Journal of Bioscience and Agriculture Research*, 2(2), 59-69.

Sathyanarayana, B. N. (2007). *Plant tissue culture: practices and new experimental protocols*. Recuperado de https://books.google.es/books?hl=es&lr=&id=4MdNDYBEw ZAC&oi=fnd&pg=PA1&dq=Plant+tissue+culture:+practices+and+new+experimental+p rotocols&ots=m9u1xVJAnZ&sig=WKYTuEZC9Kg.

Segovia Bucheli, V. (2002). Optimización de la regeneración de lulo (Solanum quitoense), orientada a la transformación genética de plantas (Tesis Maestría). Universidad Internacional de Andalucía, Huelva, España.

Segretín, M. E. (2006). Los cultivos celulares y sus aplicaciones II (cultivos de células vegetales). *Consejo argentino para la información y el desarrollo de la biotecnología*. Recuperado de http://s3.amazonaws.com/academia.edu.documents/45724838/Cultivos _celulares_II_Euge.pdf?AWSAccessKeyId=AKIAJ56 TQJRTWSMTNPEA&Expires=1

&Signature=9myD043Q7XUPUtqc84iAW8fBCTM%3D&response-content.

Sharry, S. E., Adema, M., & Abedini, W. (2015). Plantas de probeta. Argentina: Editorial de la Universidad Nacional de la Plata.

Sierra, S. R., & Vargas, F. J. A. (2015). Inteligencia de mercados para la cadena del lulo (Solanum quitoense). *Journal of Agriculture and Animal Sciences*, *3*(2), 38-47.

Singh, D. R., Singh, P. S., & Vidyasagar, G. M. (2014). Antimicrobial activity of ethanolic leaves extract of Alangium salvifolium (L. f.) Wangerin. *International Journal of Research in Plant Science*, 4(4), 77-80.

Stohs, S. J., & Hartman, M. J. (2015). Review of the Safety and Efficacy of Moringa oleifera. *Phytotherapy Research*, 29(6), 796-804.

Suárez Haro, F. E. (2011). Micropropagación in vitro de piña (ananas comosus l. merril) híbrido md-2, a partir de cortes de yemas laterales y apicales (Tesis). Escuela Politecnica del Ejército, Sangolqui, Ecuador.

Tamayo Molano, P. J. (2001). Boletin técnico principales enfermedades del tomate de arbol, la mora y el lulo en colombia. Corporación Colombiana de Investigacion Agropecuaria, Bogota, Colombia.

Tejeda-Sartorius, O., & Rodríguez-González, M. T. (2008). Inhibidores de germinación y crecimiento de maleza y hortalizas, en residuos de amaranto (Amaranthus hypochondriacus L.). *Agrociencia*, 42(4), 415-423.

Tobón, F., & López, L. (2011). Genotoxicidad del agua contaminada por plaguicidas en un área de Antioquia. *Revista de Medicina Veterinaria y Zootecnia Córdoba*, 16(2), 2605-2615.

Urbina, B. (2008). Evaluación agronómica de dos variedades y dos híbridos de naranjilla (solanum quitoense lam) y su respuesta a dos densidades de plantación en Julio Moreno, Provincia Bolívar (Tesis). Universidad Estatal de Bolivar, Ecuador.

Uscátegui Maldonado, Y. L., Correa, P., & Erlide, R. (2013). Bioactividad de hidrosoles, aceites esenciales y mezclas de extractos de especies vegetales para el control de Rhizoctonia Solani, Phytophthora Infestans y Fusarium Oxysporum en el cultivo de papa (Solanum Tuberosum) (Doctoral dissertation). Universidad de la Sabana, Bogota, Colombia.

Vásquez Covarrubias, D. A., Montes Belmont, R., Jiménez Pérez, A., & Flores Moctezuma, H. E. (2013). Aceites Esenciales y Extractos Acuosos para el Manejo in vitro de Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici y F. solani. *Revista mexicana de fitopatología*, 31(2), 170-179.

Vizcano, R. L. M., De la Rosa Torres, C., & Pérez, A. M. (2007). Actividad antifungica del extracto total en etanol de la hojas frescas de *pedilanthus tithymaloides* L Poit (ultimorrial). *Scientia et Technica*, *I*(33), 155-159.

Walter, A., Samuel, W., Peter, A., & Joseph, O. (2011). Antibacterial activity of Moringa oleifera and Moringa stenopetala methanol and n-hexane seed extracts on bacteria implicated in water borne diseases. *Afr J Microbiol Res*, *5*(2), 153-157.

Wittstock, U., & Halkier, B. A. (2000). Cytochrome P450 CYP79A2 from Arabidopsis thaliana L. catalyzes the conversion of L-phenylalanine to phenylacetaldoxime in the biosynthesis of benzylglucosinolate. *Journal of Biological Chemistry*, 275(19), 14659-14666.

Yossen, V. E., & Conles, M. Y. (2014). Eficacia de fungicidas in vitro para el control de Fusarium oxysporum y F. proliferatum, agentes causales de marchitamiento en el cultivo de orégano en la Argentina. *Revista industrial y agrícola de Tucumán*, 91(1), 19-25.

Zavaleta-Mejía, E. (1999). Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra*, 17(3), 201-207.