

## Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*

Omar Essaú Larios-Palacios<sup>1</sup>  
Érida Yasmín López-Vázquez<sup>2</sup>  
Arturo Curiel Rodríguez<sup>1</sup>  
Felipe de Jesús Ruíz-Espinoza<sup>3</sup>  
Roney Solano-Vidal<sup>2</sup>  
Miguel Ángel Serrato-Cruz<sup>1§</sup>

<sup>1, 2, 3</sup>Departamentos de Fitotecnia, Parasitología Agrícola y Centro Regional del Anáhuac-Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México, México. CP. 56230. (oma-ago95@gmail.com; jasmin.lov@outlook.com; acuriel@correo.chapingo.mx; agrohomeopatia@hotmail.com; roneysv@hotmail.com).

§Autor para correspondencia: serratocruz@gmail.com.

### Resumen

Aunque se dispone de métodos experimentales para el control de enfermedades fúngicas en el cultivo de fresa, entre ellos el químico, orgánico y biológico, no se descarta otros métodos de bajo costo como sustancias homeopáticas, que no se han evaluado contra *Botrytis cinerea*. El objetivo del presente estudio fue comparar tratamientos convencionales y sustancias homeopáticas, en condiciones *in vitro*, en el crecimiento micelial de *B. cinerea* como referencia previa a evaluación *in vivo*. Tratamientos: medio PDA, fungicida sintético Switch<sup>®</sup> (Fludioxonil, Ciprodinil) 1 g L<sup>-1</sup>, aceite esencial de *Tagetes lemmonii* (1%), extracto comercial de *Larrea tridentata* (2 mL L<sup>-1</sup>), sustancias homeopáticas, arsénico 6 CH y nosode de *Botrytis* 7 CH y prueba dual con *Trichoderma harzianum*. Variables registradas: diámetro del micelio, velocidad de crecimiento y porcentaje de inhibición micelial; en la prueba dual se midió días al primer contacto hifal y tipo de antagonismo. Los datos se sometieron a análisis de varianza y prueba de comparación múltiple de medias (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). Switch<sup>®</sup> y aceite de *Tagetes* inhibieron el crecimiento micelial en 100%, con extracto de *Larrea* la inhibición fue de 65.8%, *T. harzianum* inhibió 36.2% y el contacto hifal se dio al sexto día (antagonismo tipo II), controlando al patógeno, las sustancias homeopáticas nosode 7 CH y arsénico 6 CH inhibieron al hongo en 31.2 y 11.8%, respectivamente. El efecto del nosode 7 CH fue diferente ( $p \leq 0.05$ ) del testigo, pero el arsénico homeopático no lo fue.

**Palabras clave:** efecto antifúngico, enfermedades fungosas, fresa, métodos orgánico y biológico, sustancias homeopáticas.

Recibido: enero de 2020

Aceptado: marzo de 2020

## Introducción

En México se cultiva fresa (*Fragaria vesca* L.) en 12 estados, pero solamente Baja California, Guanajuato y Michoacán generan 91.55% del total de producción nacional (Santoyo, 2009). El moho gris (*Botrytis cinerea* Pers. ex Fr.) es una de las principales enfermedades de la fresa; este fitopatógeno tiene la capacidad de actuar como saprófito y ha sido considerado de alta importancia, ya que afecta un amplio número de cultivos alrededor del mundo. Las pérdidas en el cultivo de fresa pueden ser severas, hasta 25% en la cosecha principal y alrededor de 37% en el segundo pico productivo, por lo que sin un control efectivo pre y poscosecha se puede ocasionar grandes mermas económicas, afectando la productividad en cantidad y calidad de la cosecha (Ceredi *et al.*, 2009).

Para el control de *B. cinerea*, el empleo de fungicidas modernos que actúan sobre sitios metabólicos específicos del hongo ha traído como consecuencia la formación de razas resistentes de éste a ciertos productos químicos, en este sentido, ha surgido la necesidad de buscar otros recursos para el manejo integrado de la enfermedad (Cano, 2013).

Algunos métodos explorados en plantas para control fúngico consisten en usar antagonistas microbianos que regulan poblaciones de fitopatógenos (Chávez, 2004), también se ha implementado el uso de extractos vegetales para control de enfermedades fungosas, ya que son una rica fuente de productos químicos bioactivos (Balandrin *et al.*, 1985). Estos métodos actualmente se pueden emplear como parte del manejo integrado de enfermedades, y recientemente, el empleo de sustancias homeopáticas es otro recurso promisorio para el biocontrol de hongos fitopatógenos y que comparado con los métodos anteriores, es atractivo por su bajo costo (Meneses, 2007).

El modelo de estudio *in vitro* de sustancias u organismos para control de enfermedades fungosas es un recurso metodológico útil para seleccionar lo promisorio y perfilar su evaluación *in vivo*. En este sentido, pruebas *in vitro* de sensibilidad de hongos a fungicidas ayudan a determinar si su actividad biológica es o no la que se espera, sea porque el hongo desarrolla resistencia o por aspectos relacionados con la calidad y cantidad del producto sintético utilizado (Mercier *et al.*, 2010); por ello, la inclusión de tratamientos testigo y la verificación del efecto fungicida o fungistático son aspectos metodológicos necesarios.

En cuanto a trabajos sobre el empleo de extractos vegetales contra hongos en condiciones *in vitro*, son numerosas las investigaciones, pero sobre *Botrytis* destacan los relacionados con extractos de *Larrea tridentata* (Lira, 2003) y de *Lippia origanoide* (Taborda, 2015). En el caso de extractos de plantas de gobernadora (*L. tridentata*) su efecto es positivo para el control no solo de *Botrytis* sino también de *Fusarium*, *Pythium* y *Rhizoctonia*, esta fuente vegetal de metabolitos se encuentra distribuida en regiones áridas de Durango y Coahuila (Lira, 2003).

En el caso de aceites esenciales contra *Botrytis*, pocos son los estudios sobre *Tagetes* que destacan efecto de total inhibición (Romagnoli *et al.*, 2005), aunque en otros trabajos se consigna efecto positivo contra otras especies de hongo (Barajas *et al.*, 2011; López *et al.*, 2018). En general, pocas son las especies de *Tagetes* exploradas por su efecto contra hongos y en el caso de *Tagetes lemmonii*, especie distribuida regionalmente en Sonora y Durango (Serrato, 2014), es escasa la investigación.

El extracto metanólico de *T. lemmonii* es antifúngico en *Botrytis* (Bojórquez, 2017) y el aceite esencial ocasiona inhibición de *Fusarium oxysporum* f. sp. *ricini* (Jarquín, 2016), este último no se ha explorado contra *B. cinerea*. Con respecto a *Trichoderma harzianum* se le refiere como antagonista de *Botrytis* (Merchán, 2014) y en trabajos realizados en condiciones *in vitro*, se evidencia la inhibición total del crecimiento del hongo (Calvo, 2012).

En relación con el efecto de sustancias homeopáticas contra enfermedades fúngicas en plantas se tienen varios trabajos realizados en condiciones *in vivo* (Oliveira *et al.*, 2013; Hanif y Dewar, 2015; Lorenzetti *et al.*, 2016; Rissato *et al.*, 2016; Oliveira *et al.*, 2017) y solamente seis *in vitro* (Carneiro y Bueno, 2010; Gama *et al.*, 2015; Lorenzetti *et al.*, 2016; Rissato *et al.*, 2016; Toledo *et al.*, 2016; Serrato *et al.*, 2018) entre estos últimos, dos de ellos se refieren a nosodes y cuatro a diversas sustancias, mostrando efecto antifúngico directo y ninguno de ellos evaluado contra *B. cinerea*.

De los resultados de la aplicación de sustancias homeopáticas *in vitro* contra hongos, destaca el principio homeopático *similia similibus curentur* relacionado con sustancias como el arsénico, fósforo, azufre, *Arnica montana*, etc. (Tichavsky, 2007), que inhiben hongos como: *Aspergillus niger*, *Alternaria solani* y *Sclerotinia sclerotium* (Gama *et al.*, 2015; Toledo *et al.*, 2016; Rissato *et al.*, 2016) también destaca otro principio homeopático, el más similar, que corresponde a la elaboración de nosode, sustancia homeopática derivada del organismo que ocasiona la enfermedad o el daño, como en los casos de *Alternaria solani*, *Fusarium solani* y *Sclerotinia sclerotium* evaluados *in vitro* (Carneiro y Bueno, 2010; Rissato *et al.*, 2016).

En condiciones *in vivo*, la aplicación de sustancias homeopáticas contra hongos presupone señales que la planta recibe preparándola para enfrentar el establecimiento del patógeno; sin embargo, la incorporación de la sustancia homeopática (sustancia dinamizada o el nosode) al medio de cultivo *in vitro* puede influir directamente en el patógeno; es decir, influirlo por contacto, respuesta biológica que poco se ha argumentado en el fenómeno agrohhomeopático (Carneiro y Bueno, 2010; Lorenzetti *et al.*, 2016; Rissato *et al.*, 2016).

Aunque se reportan estudios comparativos de tratamientos químicos, orgánicos y biológicos en condiciones *in vitro* contra hongos fitopatógenos (Jarquín, 2016), son relativamente escasos los que incluyen sustancias homeopáticas (Oliveira *et al.*, 2013; Gama *et al.*, 2015; Lorenzetti *et al.*, 2016; Serrato *et al.*, 2018). Considerado la poca exploración que se tiene sobre el aceite de *T. lemmonii* como antifúngico, la escasa información sobre sustancias homeopáticas con efecto directo en hongos y su limitada inclusión en estudios comparativos de eficiencia antifúngica en el modelo *in vitro*, así como la importancia de reducir costos en el control de *B. cinerea* en fresa, en el presente trabajo se compararon tratamientos convencionales y sustancias homeopáticas *in vitro* contra *B. cinerea* con la finalidad de generar información útil para su verificación *in vivo*.

## Materiales y métodos

La presente investigación consistió en realizar una evaluación en condiciones *in vitro* de: un fungicida químico, dos sustancias vegetales, un agente biológico antagonico y dos soluciones homeopáticas (Cuadro 1). El experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de la Maestría en Protección Vegetal en la Universidad Autónoma Chapingo (UACH) en 2018.

**Cuadro 1. Tratamientos para evaluación en el bioensayo con *B. cinerea*.**

Tratamiento	Dosis	Variables respuesta
PDA (testigo absoluto)	39 g L <sup>-1</sup>	Velocidad de crecimiento (mm·día <sup>-1</sup> ), porcentaje de inhibición (%) y porcentaje de crecimiento (%)
<i>Tagetes lemmonii</i>	1%	
Arsénico homeopático	1 gota L <sup>-1</sup>	
<i>Botrytis</i> homeopático	1 gota L <sup>-1</sup>	
Químico (Switch <sup>®</sup> )	1 g L <sup>-1</sup>	
Extracto de gobernadora	2 mL L <sup>-1</sup>	
<i>Trichoderma harzianum</i>	3.5 mm	

### Aislamiento de hongos fitopatógenos

El hongo fitopatógeno *B. cinerea* se aisló de plantas de fresa en invernadero en el Campo Experimental de la UACH. Plantas con frutos dañados, mostrando una cubierta de color café con textura de alfombra de esporas, síntoma peculiar de presencia de *Botrytis* en esa frutilla, se seleccionaron como fuente de inóculo. Fragmentos de tejido infectado se establecieron en condiciones asépticas en cajas Petri con medio de cultivo de agar Papa-Dextrosa (PDA) e incubadas en una cámara de crecimiento con 17 °C y 80% de humedad relativa durante ocho días y 1 h de luz diariamente.

### Sustancias y organismos para evaluación biológica

El producto químico comercial Switch<sup>®</sup> (Fludioxonil, Ciprodinil) se consiguió en una tienda de agroquímicos en el municipio de Texcoco, Estado de México. También se adquirió el producto orgánico comercial Progranic<sup>®</sup> Mega (extracto de *Larrea tridentata*). El organismo antagónico (*Trichoderma harzianum*), en micelio, lo proporcionó el Dr. Roney Vidal Solano, Departamento de Parasitología Agrícola, UACH.

A partir de plantas de *T. lemmonii* A. Grey. (voucher 2012-199; Herbario de la Universidad de Sonora) Var. Limón (SAGARPA-SNICS, expediente 1423, registro 1629) de una plantación establecida en el Campo Experimental de la UACH en 2015 (19° 29.547' latitud norte, 98° 52.470' longitud oeste y 2 267 msnm, tipo climático Cw1) se cosecharon tallos en floración en septiembre de 2018. Esta biomasa fresca en cantidad de 100 kg se sometió a un proceso de hidrodestilación mediante destilador de acero inoxidable con capacidad de destilación de 200 kg, el aceite obtenido se almacenó a 18 °C en oscuridad.

Las sustancias homeopáticas las elaboró el Dr. Felipe de Jesús Ruíz Espinoza del Centro Regional Universitario del Anáhuac de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), para la preparación del nosode del hongo, este último se aisló de un fruto de fresa y se preparó por trituración con azúcar. Para la elaboración se tomó 0.05 g de la muestra del hongo, la cual se puso en un mortero de 4 pulgadas de porcelana. En tres bolsitas de plástico de 6 x 10 cm, se agregó 5 g de azúcar a cada una, se etiquetaron con el nombre de *Botritis cinerea* T1C (bolsa 1), anotando la fecha. A la bolsa 2, *B. cinerea* T2C y a la bolsa 3, *B. cinerea* T3C.

La bolsa 1 se dividió en tres tercios, agregando el primer tercio e iniciando la trituración de la siguiente manera: se molió o trituró durante 6 min, después, con una cuchara cafetera de acero inoxidable, se raspó el majadero y el mortero durante 4 min. Esto se repitió moliendo 6 min y raspando 4 min ese tercio. Al finalizar, se agregó el segundo tercio de la primera bolsita. Se repitió moler y raspar durante 6 y 4 min, respectivamente. Al finalizar se agregó el último tercio, el cual se molió durante 6 min y raspó durante 4 min, repitiendo esta secuencia hasta completar 1 h.

De ahí se guardó lo triturado en la bolsita T1C. De la trituración T1C, se tomó 0.05 g para iniciar la bolsa 2, la cual se elaboró conforme a los tiempos de la primera y al terminar la 2ª bolsa se guardó e inició la tercera bolsa, al terminar, se guardó y de ahí se tomó 0.05 g de la trituración 3C, la cual se agregó en un frasco que contenía 50 gotas de agua destilada y 50 gotas de alcohol, se agitó durante 2 min y se dejó reposar 2 min.

Al finalizar, esta preparación constituyó la dilución o potencia 4C, de ahí se elaboró la 5C, 6C y la 7 C, de acuerdo con la escala centesimal Hanamanianna, como lo menciona Sandoval (1961). Esta secuencia de operaciones se hizo para arsénico, según regla 7 de la homeopatía (Zepeda, 2002), el arsénico se obtuvo en la Farmacia Homeopática Nacional ubicada en el zócalo de la Ciudad de México y las características de esta sustancia se describen en la obra de García (1984).

### **Preparación y evaluación en cajas Petri**

Para el bioensayo se empleó el método de agar envenenado que consiste en integrar al medio de cultivo las sustancias tratamiento. El medio de cultivo PDA se preparó en siete matraces Erlenmeyer de 250 mL de capacidad. Para su esterilización, se sometieron durante 20 min en autoclave a 120 °C y 15 lb de presión. Cuando la temperatura y presión de la autoclave disminuyó alrededor de 40 °C, se sacaron los matraces. El medio PDA más las sustancias correspondientes a los tratamientos se agitaron antes de que se vertieran en las cajas Petri con el objetivo de homogenizar la mezcla.

El preparado se vació en cajas Petri de 90 mm estériles, en condiciones asépticas y se dejaron enfriar y solidificar a temperatura ambiente durante 24 h. Al siguiente día se depositó un disco de PDA con el inóculo de *B. cinerea* obtenido con un sacabocado estéril de 3.5 mm de diámetro que se colocó invertido en el centro de la caja. Las cajas Petri se incubaron a  $18 \pm 2$  °C dentro de una estufa. Desde la siembra del hongo en la caja Petri y durante 8 días, se midió el diámetro del micelio con un vernier digital.

### **Preparación de tratamientos**

La preparación dual con *T. harzianum* se realizó sobre medio de cultivo estéril y colocando un disco de 3.5 mm de diámetro en un extremo de la caja Petri previamente dividida a la mitad para después ubicar al otro extremo el micelio de *B. cinerea*. El aceite esencial de *T. lemmonii* puro se preparó al 1%, para lo cual se agregó 0.1 mL de surfactante Tween 20 agitando circularmente para obtener una emulsión y enseguida se disolvió homogéneamente en 100 mL de PDA, posteriormente se vertió en un matraz de 250 mL. El mismo procedimiento se utilizó para preparar el extracto de gobernadora, donde se preparó la solución de 100 mL de medio de cultivo con 2 mL del producto orgánico.

Para el producto sintético Switch<sup>®</sup>, se agregó 1 g del producto en un litro de agua y se esperó hasta que se disolviera agitándolo, traspasando 100 mL de mezcla al matraz para ser esterilizado. En el caso de las sustancias homeopáticas, en un litro de agua destilada se agregó una gota de cada solución homeopática, *Botrytis* 7 CH y arsénico 6 CH, por separado, para después succusionar enérgicamente la botella durante 2 min. Posteriormente se depositó la cantidad requerida (100 mL) en los matraces Erlenmeyer de 250 mL.

### Diseño experimental

El experimento se analizó por un diseño experimental completamente al azar con seis tratamientos cada uno con cinco repeticiones y un testigo absoluto, la unidad experimental consistió en una caja Petri de 90 mm de diámetro con medio de cultivo PDA incorporando los tratamientos a evaluar.

### Variables registradas

El crecimiento radial del hongo se midió con una frecuencia de 24 h, finalizando hasta que la caja Petri sin tratamiento (testigo) se cubrió completamente con micelio (8 días), tomando como base este tiempo también se realizaron las evaluaciones del crecimiento dual *Trichoderma-Botrytis*. Las mediciones se realizaron con vernier digital. La velocidad de crecimiento del micelio (VC) se calculó con la fórmula de Sinclair y Cantero (1989).

$$VC = \frac{Df - Di}{Tf - Ti}$$

Donde: VC= velocidad de crecimiento (mm día<sup>-1</sup>); Df= diámetro final de crecimiento (mm); Di= diámetro inicial de crecimiento (mm); Ti= tiempo inicial de crecimiento (días); Tf= tiempo final de crecimiento (días).

El porcentaje de inhibición (% I) se determinó aplicando la fórmula de Fokkema (1973), citado por Kagezi *et al.* (2015).

$$\% I = \frac{D1 - D2}{D1} (100)$$

Donde: %I= porcentaje de inhibición del crecimiento micelial; D1= diámetro del crecimiento micelial del testigo (mm); D2= diámetro del crecimiento micelial del influenciado (mm).

Para calcular el porcentaje de crecimiento se empleó la fórmula.

$$\% C = \frac{CI (100)}{CT}$$

Donde: %C= porcentaje de crecimiento micelial; CI= crecimiento influenciado (mm); CT= crecimiento del testigo (mm).

Para determinar la clase de antagonismo en condiciones de crecimiento dual, se tomó en cuenta la escala propuesta por Bell *et al.* (1982): 1. El antagonista sobrecrece al fitopatógeno y cubre 100% de la caja Petri; 2. El antagonista cubre 75% de la caja Petri, detiene al fitopatógeno y puede sobrecrecerlo y esporular sobre él; 3. Ningún organismo es dominante, cada uno cubre 50% de la superficie (antagonista y patógeno); 4. El fitopatógeno cubre 75% de la caja Petri y detiene el crecimiento del antagonista y lo puede sobrecrecer y esporular sobre este; y 5. El fitopatógeno sobrecrece al antagonista y cubre 100% de la caja Petri.

### Análisis estadístico

Para la evaluación estadística del experimento, los datos se sometieron a un análisis de varianza combinado y prueba de comparación de medias de Tukey ( $p \leq 0.05$ ) correspondientes a un diseño experimental completamente al azar con cinco repeticiones. Este análisis se efectuó mediante el software Statistical Analysis System (SAS 9.0) con el procedimiento Proc Anova.

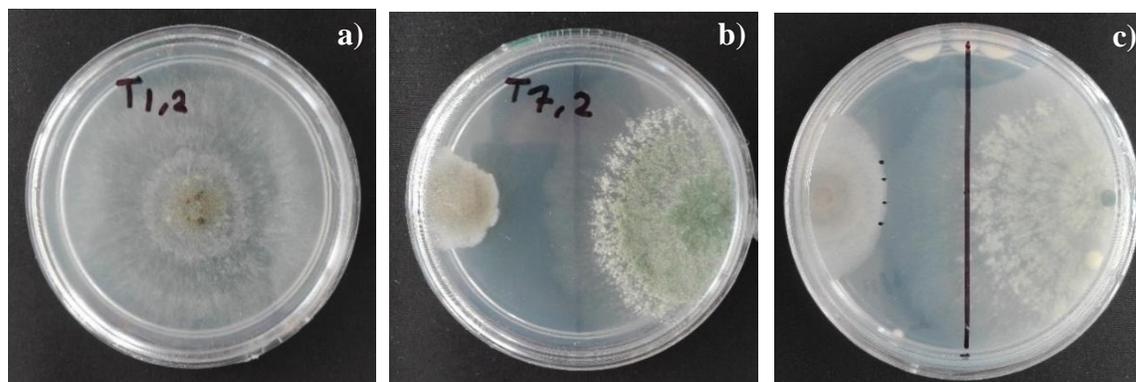
## Resultados

El agente antagonístico *T. harzianum* controló el crecimiento del micelio de *B. cinerea* inhibiéndolo en 36%, aunque su velocidad de crecimiento fue menor ( $7.44 \text{ mm día}^{-1}$ ) que la del patógeno en el tratamiento testigo ( $9.80 \text{ mm día}^{-1}$ ) (Cuadro 2), en el tratamiento *Botrytis-Trichoderma*, *Trichoderma* logró detener el desarrollo de *Botrytis* al momento del contacto (Figura 1). Los coeficientes de variación fueron 6 a 17%.

**Cuadro 2. Comparación de respuestas de crecimiento de *T. harzianum* vs *B. cinerea*.**

Tratamiento	Dosis	VCD	t(VCD)	INH	CREC
<i>Botrytis</i>	0	9.8	3.28 a <sup>z</sup>	0 b	100 a
<i>Trichoderma</i> + <i>Botrytis</i>	-	7.44	2.9 b	36.25 a	63.75 b
CV	-	14.5	6.4	17	5.9
DMS	-	1.83	0.29	7.14	7.14

VCD= velocidad de crecimiento diametral ( $\text{mm día}^{-1}$ ); t(VCD)= transformación de datos de VCD; INH= porcentaje de inhibición del crecimiento; CREC= porcentaje de crecimiento diametral; DMS= diferencia mínima significativa (Tukey,  $p \leq 0.05$ ); CV= coeficiente de variación; <sup>z</sup>= Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales. Los valores son medias de cinco repeticiones a los 8 días después de la siembra.



**Figura 1. Antagonismo *T. harzianum* vs *Botrytis cinerea*. a) testigo absoluto con *B. cinerea*; b) y c) *T. harzianum* (derecha) y *B. cinerea* (izquierda).**

El contacto hifal entre los dos patógenos se dio al sexto día. *Trichoderma* tuvo un crecimiento exponencial a partir del segundo día, sobrepasando la mitad de la caja Petri primero que *Botrytis*, deteniendo su crecimiento y al mismo tiempo causando la muerte de hifas en la zona de interacción con *B. cinerea* (Figuras 1 b y c). La prueba dual con estos hongos destacó un antagonismo tipo dos, el cual se caracteriza porque *T. harzianum* invadió 75% de la caja Petri, además de sobrecrecer y esporular sobre el fitopatógeno, *T. harzianum* invadió el crecimiento paulatinamente de *Botrytis* hasta cubrirlo por completo.

Los tratamientos con sustancias mezcladas en el medio de cultivo influyeron la respuesta de *B. cinerea* y se registraron coeficientes de variación de 2 a 31% (Cuadro 3). El micelio de *Botrytis* tuvo crecimiento 100% en PDA, la mayor la velocidad de crecimiento (VCD) (9.8 mm día<sup>-1</sup>) y sin inhibición micelial; en cambio, con el fungicida químico el crecimiento y la VCD fueron nulos, y la inhibición micelial 100%. Con aceite de *T. lemmonii*, desde las 24 h de la inoculación del hongo hasta el término del experimento, no se modificó el diámetro del inóculo micelial, por lo tanto, nula VCD y 100% de inhibición del patógeno, una respuesta similar a la obtenida con el producto fungicida.

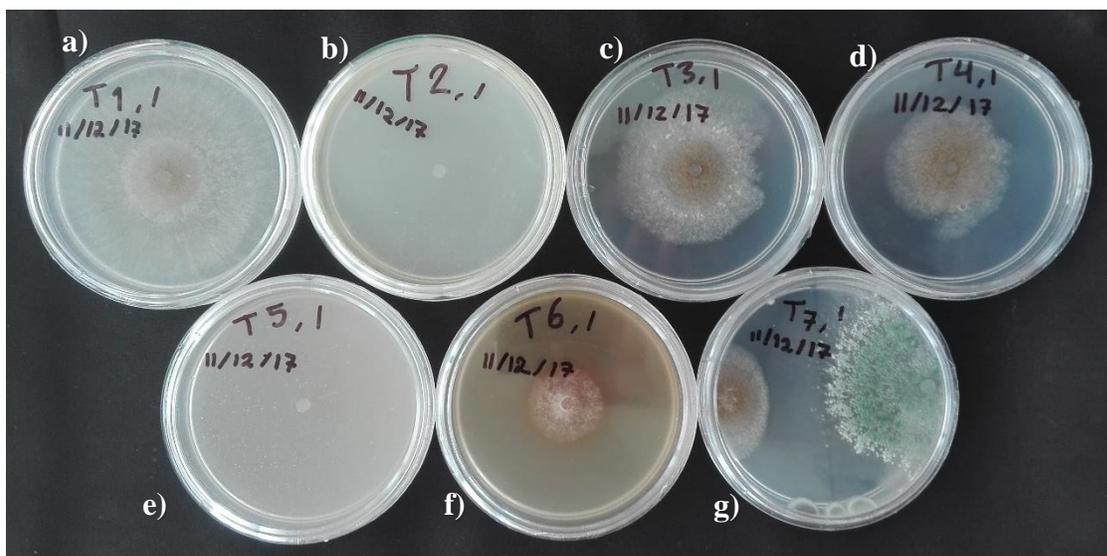
**Cuadro 3. Comparación múltiple de medias para las variables respuesta del bioensayo.**

Tratamiento	Dosis	VCD	t(VCD)	INH	CREC
Testigo	0	9.8	3.28 a <sup>z</sup>	0 e	100 a
<i>Tagetes lemmonii</i>	1 %	0	1 d	100 a	0 cd
Arsénico homeopático	1 gota L <sup>-1</sup>	8.56	3.08 ab	11.85 ed	88.15 a
<i>Botrytis</i> homeopático	1 gota L <sup>-1</sup>	6.76	2.77 b	31.24 cd	68.76 ab
Switch <sup>®</sup>	1 g L <sup>-1</sup>	0	1 d	100 a	0 d
E. Gobernadora	2 mL L <sup>-1</sup>	2.82	1.95 c	65.8 b	34.2 cb
DMS	-	2.82	7.81	13.94	30.96
CV	-	2.01	0.33	14.03	43.22

VCD= velocidad de crecimiento diametral (mm día<sup>-1</sup>); t(VCD)= transformación de datos de VCD; INH= porcentaje de inhibición del crecimiento; CREC= porcentaje de crecimiento diametral; DMS= diferencia mínima significativa (Tukey,  $p \leq 0.05$ ). CV= coeficiente de variación. <sup>z</sup>= Medias con la misma letra dentro de la columna son estadísticamente iguales.

Con extracto de gobernadora (*L. tridentata*) el hongo creció 34%, VCD de 2.82 mm día<sup>-1</sup> e inhibición micelial de 65.8%. Con arsénico homeopático, la VCD fue 8.56 mm día<sup>-1</sup> e inhibición 11.8%, respuesta estadísticamente igual que el testigo absoluto. Con nosode de *Botrytis* la VCD fue 6.76 mm día<sup>-1</sup> y 31.24% de inhibición, diferente estadísticamente del tratamiento control. Tanto en las sustancias homeopáticas como en el testigo PDA, *Botrytis* tuvo el mayor porcentaje de crecimiento (68 a 100%).

En general, el fungicida Switch<sup>®</sup> y el aceite esencial de *T. lemmonii* resultaron inhibitorios del crecimiento del micelio y en el caso del agente biológico *T. harzianum* hubo antagonismo contra *B. cinerea*, estos tratamientos fueron de alto efecto antifúngico comparados con los de inhibición media del extracto de gobernadora (65%) y los de baja inhibición (11 y 31%) de las sustancias homeopáticas (Cuadro 3; Figura 2).

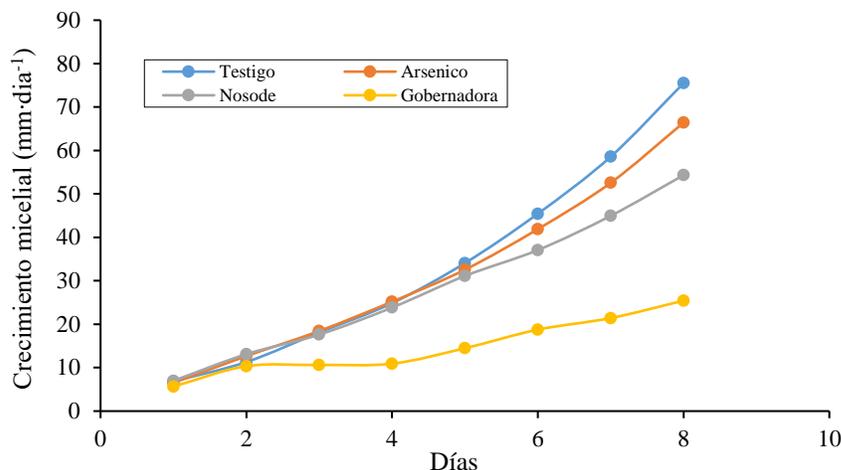


**Figura 2.** Final del bioensayo a 8 días cuando el testigo absoluto cubrió por completo la caja Petri, a) testigo absoluto; b) *T. lemmonii*; c) arsénico homeopático; d) *Botrytis* homeopático; e) Switch®; f) gobernadora; y g) antagonista *Trichoderma harzianum*.

Considerando la velocidad de crecimiento diametral (usando la transformación) en el octavo día, destacó la alta velocidad de crecimiento del micelio en PDA ( $9.8 \text{ mm día}^{-1}$ ) y en arsénico homeopático ( $8.56 \text{ mm día}^{-1}$ ); la respuesta fue intermedia con nosode de *Botrytis* ( $6.76 \text{ mm día}^{-1}$ ), de baja velocidad con el extracto de gobernadora ( $2.82 \text{ mm día}^{-1}$ ) y nula con *T. lemmonii* o con Switch® (Cuadro 3).

La dinámica de la velocidad de crecimiento del micelio en contacto con las sustancias evaluadas orgánicas y homeopáticas evaluadas durante los ocho días (Figura 3) presentó tendencias particulares. Hasta el segundo día todos los tratamientos tuvieron similar respuesta ( $10 \text{ mm día}^{-1}$ ), pero en el tercer día la velocidad de crecimiento del hongo en los tratamientos homeopático y testigo PDA fue aumentando desde 19 hasta  $31 \text{ mm día}^{-1}$  en el 5º día. Con el extracto de *L. tridentata* el crecimiento del hongo se mantuvo estable desde el día 2 hasta el 4 ( $10 \text{ mm día}^{-1}$ ), pero al 5º día subió ligeramente ( $14 \text{ mm día}^{-1}$ ) y siguió aumentado con tendencia lenta durante los tres días subsecuentes ( $19, 21$  y  $26 \text{ mm día}^{-1}$ ).

En el testigo y en los homeopáticos arsénico y nosode, en el día cinco se observó que el micelio adquiría diferente velocidad de crecimiento ( $35, 33$  y  $31 \text{ mm día}^{-1}$ , respectivamente), tendencia más definida en los días 6 ( $46, 42$  y  $38 \text{ mm día}^{-1}$ , respectivamente), 7 ( $59, 53$  y  $45 \text{ mm día}^{-1}$ , respectivamente) y 8 ( $76, 66, 54 \text{ mm día}^{-1}$ , respectivamente), separándose más el nosode de *Botrytis* en esos cuatro últimos días, al reducir la velocidad de crecimiento del micelio con respecto al testigo (disminución de la VCD de 4, 8, 14 y 22 puntos, respectivamente) y al arsénico homeopático (disminución de la VCD de 2, 4, 8 y 12 puntos, respectivamente).



**Figura 3.** Crecimiento diametral del micelio ( $\text{mm}\cdot\text{día}^{-1}$ ) de *Botrytis cinerea* durante el período de evaluación *in vitro* de los tratamientos: testigo (PDA), extracto de gobernadora, arsénico homeopático y nosode de *B. cinerea*. Las sustancias *T. lemmonii* y Switch® no aparecen porque el hongo no presentó crecimiento.

## Discusión

El efecto antagonístico de *T. harzianum* contra el moho gris de la fresa en el modelo de estudio *in vitro* confirma otros antecedentes al respecto (Calvo, 2012). Probablemente la temperatura de 18 °C no favoreció una mayor velocidad de crecimiento de *Trichoderma* en los primeros días en relación con el alcanzado por *Botrytis* al respecto, se indica que la temperatura óptima para *Trichoderma* es de 25 °C (Merchán, 2014). El resultado del antagonismo *Trichoderma-Botrytis* confirma el uso directo del agente biológico en las etapas de fructificación y en poscosecha de fresa (Merchán, 2014).

No obstante, que este resultado es favorable para disminuir o sustituir productos fungicidas, la producción o compra de *Trichoderma* representa un costo de inversión, quizá menor que la adquisición del propio fungicida. Por su parte, el agroquímico tuvo efecto inmediato, reportado tanto *in vitro* como *in vivo* en fresa (Mercier *et al.*, 2010); sin embargo, la implicación negativa al humano y al ambiente son tema de reflexión. En cuanto a las sustancias orgánicas, el efecto inhibitorio del extracto de gobernadora coincide con lo observado en otros estudios donde a esta sustancia vegetal se le atribuye la propiedad de fungistasis en *Botrytis* (Lira, 2003).

En cuanto al sobresaliente efecto antifúngico del aceite de *T. lemmonii*, similar al producido por el producto Switch (Cuadro 3), ya se había referido contra *Fusarium oxysporum* (Jarquín, 2016), pero no con la misma intensidad con la que ocurrió contra *Botrytis*, resultado que por vez primera se reporta; la presencia de dihidrotagetona, (E) tagetona y (E) ocimenona en el aceite esencial (Tucker y Marciarello, 1996) posiblemente sean las sustancias responsables de la actividad biológica descrita. Por la similitud de la respuesta del micelio sometido a Switch® y al aceite de *T. lemmonii*, se sugiere que el aceite esencial de esta especie de *Tagetes* tiene propiedad biocida. Una investigación en curso pretende explorar otras concentraciones y establecer la concentración de inhibición, además de su evaluación toxicológica *in vivo*.

El resultado obtenido sobre el efecto de inhibición micelial de *B. cinerea* ocasionado por el nosode del mismo patógeno (Cuadro 3; Figura 1) reviste especial importancia porque sería la séptima experiencia que evidencia efecto directo de sustancias homeopáticas en el crecimiento de hongos fitopatógenos (Gama *et al.*, 2015; Rissato *et al.*, 2016; Toledo *et al.*, 2016; Hanif y Dewar, 2017; Oliveira *et al.*, 2017; Serrato *et al.*, 2018).

Bioensayos *in vitro* de aplicación por fumigación con nosode directamente sobre micelio o esporas podrían confirmar con solidez algunos resultados publicados y también los del presente trabajo. Por otro lado, el nosode de *Botrytis* 7 CH fue mejor que el arsénico homeopático 6 CH (Figura 1), cuando este último en esa misma potencia, en condiciones *in vitro* inhibe la germinación de esporas de *Alternaria* (Trebbi *et al.*, 2016), esta comparación sugiere especificidad del homeopático según la dinamización o especificidad por origen biológico de la sustancia homeopática.

Los resultados exitosos relacionados con aplicación de sustancias homeopáticas contra problemas fúngicos en plantas indican que el hongo no se establece en la planta (Hanif y Dewar, 2015) o bien, crece de manera restringida sin daño a la planta (Rissato *et al.*, 2016; Hanif y Dewar, 2017; Oliveira *et al.*, 2017) además, no resulta claro si el nosode u otras sustancias homeopáticas tienen el mismo efecto inhibitorio, ni tampoco se establece si su acción es directa contra el organismo patógeno. Por lo anterior, el modelo *in vitro* ha favorecido responder parcialmente las preguntas anteriores.

En este caso, se evidenció que el hongo es influido en su crecimiento por el producto homeopático. Tomando en cuenta trabajos publicados sobre la acción de sustancias homeopáticas aplicadas al follaje de plantas para control de enfermedades fúngicas, se deduce que el estímulo homeopático, sea por sustancias derivadas del organismo patógeno o de cualquier otro origen, disparan mecanismos de respuesta de la planta para su protección. Recientemente se ha evidenciado que con el proceso de dinamización y sucusión de sustancias se generan nanopartículas con mayor actividad biológica que con macromoléculas (Rajendran, 2017).

Desde la perspectiva ecológica, los tratamientos orgánico, biológico y homeopático ofrecen ventajas, comparados con el fungicida sintético. La posibilidad de reducir la concentración de aceite esencial de *T. lemmonii* se considera importante para fortalecer el umbral de uso de esta sustancia, sobre todo en una estrategia preventiva, adicionalmente se valoraría su viabilidad económica. El aceite de rudilla es de acción remediadora, mientras que el extracto de gobernadora, *Trichoderma* y las sustancias homeopáticas son lentos y su mejor actuación podría ser de manera preventiva.

Especialmente el bajo costo del nosode de *Botrytis* representa una ventaja promisoría que estimula la investigación para seguir explorando dinamizaciones diferentes de las ensayadas o bien, probar otras sustancias homeopáticas, toda vez que haya acompañamiento de trabajos *in vivo*, que en general son pocos en el tema de la agrohomeopatía.

## Conclusiones

En condiciones *in vitro* en las que se evaluaron respuestas del micelio de *B. cinerea* se evidenció efecto antagonista de *T. harzianum*, efecto biocida del agroquímico y del aceite esencial de *T. lemmonii*, y efecto fungistático del extracto de *L. tridentata* y del nosode 7 CH.

## Literatura citada

- Balandrin, M. F.; Klocke, J. A.; Wurtele, E. S. and Bollinger, W. H. 1985. Natural plant chemicals: sources of industrial and medicinal materials. *Science Magazine*. 228(4704):1154-1159.
- Barajas, P. J. S., Montes, B. R.; Castrejón, A. F.; Flores, M. H. E. y Serrato, C. M. A. 2011. Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Rev. Mex. Micol.* 34:85-91.
- Bell, D. K.; Well, H. D. and Markham, C. R. 1982. *In vitro* antagonism of *Trichoderma* species against six fungal plant pathogens. *Phytopathology*. 72(4):379-382.
- Bojórquez, V. J. J. 2017. Actividad fúngica *in vitro* de extractos orgánicos contra patógenos de tomate (*Solanum lycopersicum*). Tesis de Maestría. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). México. 102 p.
- Calvo, A. J. A. 2012. Aislamiento y evaluación *in vitro* de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Rev. Agron. Mesoam.* 23(2):225-231.
- Cano, M. 2013. Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (*Fragaria* spp.). *Rev. Colomb. Cienc. Hortíc.* 7(2):263-276.
- Carneiro, S. and Bueno, E. 2010. Effect of biotherapeutic of *Alternaria solani* on the early blight of tomato plant and the *in vitro* development of the fungus. *Inter. J. High Dilution Res.* 9(33):147-155.
- Ceredi, G.; Antoniacchi, C.; Montuschi, E.; De Paoli, G. and Gengotti, S. 2009. Ten years of field trial on grey mold control on strawberries. *Acta Hortic.* 842(60):327-330.
- Chávez, N. 2004. Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. *Rev. Agron. Costarric.* 28(2):73-85.
- Gama, E.; Silva, F.; Santos, I.; Malheiro, R.; Soares, A.; Pereira, J. and Armond, C. 2015. Homeopathic drugs to control red rot disease in sisal plants. *Brazilian J. Agron. Sustainable Development.* 35(2):649-656.
- García, T. E. 1984. Compendio de la materia médica homeopática. Ed. Propulsora de Homeopatía. 4<sup>ta</sup> (Ed.). México, DF. 17-21 pp.
- Hanif, A. and S. Dawar. 2015. Use of homeopathic drugs in combination with fertilizers for the control of root rot fungi. *Pakistan J. Bot.* 47(6):2455-2462.
- Hanif A. and Dewar S. 2017. Antifungal activity of homeopathic drugs treated seeds against root decay pathogens and improvement of growth on crop plants. *Pakistan J. Bot.* 49(SI):355-362.
- Jarquín, C. S. 2016. Evaluación *in vitro* de fungicidas químicos, orgánicos y biológicos contra *Fusarium oxysporum* sp. *ricini* en higuera. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma Chapingo (UACH). México, DF. 110 p.
- Kagezi, G.; Kucel, P.; Olal, S.; Pinard, F.; Seruyange, J.; Musoli, P. and Kangire, A. 2015. *In vitro* Inhibitory effect of selected fungicides on mycelial growth of ambrosia fungus associated with the black coffee twig borer, *Xylosandrus compactus* Eichhoff (*Coleoptera: Curculionidae*) in Uganda. *African J. Agric. Res.* 10(23):2322-2328.
- Lira, S. R. H. 2003. Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville]. *Rev. Mex. Fitopatol.* 21(2):214-222.
- López, L. E.; Peña, O. M. G.; Colinas, L. T. B.; Díaz, C. F. y Serrato, C. M. A. 2018. Fungistasis del aceite esencial extraído de una población de *Tagetes lucida* de Hidalgo, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 9(2):329-341.

- Lorenzetti, E.; Stangarlin, J. R.; Treib, E. L.; Heling, A. L.; Coltro-Roncato, S.; Carvalho, J. C.; Hoepers, L.; Rissato, B. B.; Coppo, J. C.; Belmonte, C.; Kuhn, O. J. and Silva, I. F. 2016. Antimicrobial action against of *Macrophomina phaseolina* and control of the grey stem in soybean by homeopathic remedies Nosode and Sulphur. *African J. Agric. Res.* 11(36):3412-3417.
- Meneses, M. N. 2007. Agrohomeopatía una opción para la agricultura. *Boletín Informativo de Homeopatía Agrícola.* 1(6):1-25.
- Merchán, G. J. B. 2014. Efecto de dos cepas de *Trichoderma* en el control de *Botrytis cinerea* y la calidad del fruto en fresa (*Fragaria* sp.). *Rev. Colomb. Cienc. Hortíc.* 8(1):44-56.
- Mercier, J.; Kong, M. and Cook, F. 2010. Fungicide resistance among *Botrytis cinerea* isolates from California strawberry fields. <https://www.plantmanagementnetwork.org/pub/php/research/2010/strawberry/>.
- Oliveira, J. S. B.; Gomes, S. M. T. P.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Mesquini, R. M.; Bonato, C. M. y Romano, E. D. B. 2013. Patogenesis do óleo essencial e homeopátias de *Eucalyptus citriodora* em plantas de feijão (*Phaseolus vulgaris*). *Brazilian J. Medicinal Plants.* 15(4):734-741.
- Oliveira, J. S. B.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Bonato, C. M. and Gomes, S. M. T. 2017. Homeopathy with essential oils in the germination of spores and induction of phytoalexins. *Rev. Cienc. Agron.* 48(1):208-215.
- Rajendran, E. S. 2017. Nano pharmacological aspect of homeopathic drugs -a comparative study of different scales of ultra-high dilutions based on HRTEM analysis and np characterization of homeopathic drug natrum muriaticum 6C-CM and LM1 - LM30. *Saudi J. Medical Pharmaceutical Sci.* <http://scholarsmepub.com/sjmeps/>.
- Rissato, B.; Stangarlin, J.; Coltro, S.; Dildey, O.; Goncales, E. and Lorenzetti, E. 2016. *In vitro* activity of homeopathic drugs against *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Sci. Agrar. Paranaensis.* 15(3):320-323.
- Romagnoli, C.; Bruni, R.; Andreotti, E.; Rai, M. K.; Vicentini, C. B. and Mares, D. 2005. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma.* 225(1-2):57-65.
- Sandoval, L. G. 1961. *Farmacopea homeopática mexicana.* Ed. Propulsora de Homeopatía. México. 36-37 pp.
- Santoyo, J. J. A. 2009. Paquete tecnológico para la producción de fresa. Fundación Produce Sinaloa, AC. SAGARPA. México. 21-35 pp.
- Serrato, C. M. A. 2014. El recurso genético Cempoalxóchitl (*Tagetes* spp.) de México (diagnóstico). Universidad Autónoma Chapingo (UACH)- SINAREFI-SNICS-SAGARPA. 182 p.
- Serrato, C. M. A.; López V. E. Y.; Ruiz E., F.; Solano, V. R. y Hernández, H. I. 2018. Evaluación *in vitro* de aceites esenciales y preparados homeopáticos en el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos. *In: homeopatía hoy.* Ruíz, E. F. de J. y Durán, C. V. (Coords.). Universidad Autónoma Chapingo (UACH). Texcoco, Estado de México. 83-89 pp.
- Sinclair, C. G. and Cantero, D. 1989. Fermentation modelling. *In: fermentation a practical approach.* McNeil, B. L. and Harvey, M. (Eds.). IRL Press, New York. 65-112 pp.
- Taborda, A. L. A. 2015. Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Botrytis cinerea* en fresa. *Rev. Acta Agron.* 11 (39):3824-3838.
- Tichavsky, R. 2007. Manual de agrohomeopatía. Instituto Comenius en colaboración con la Secretaría de Desarrollo Social. México. 30-71 pp.

- Toledo, M. V.; Stangarlin, J. R.; Bonato, C. M.; Mioranza, T. M.; Müller, M. A.; Rissato, B. B.; Lorenzetti, E.; Coltro-Roncato, S.; Kosmann, C. R. and Assi, L. 2016. Fungitoxicity activity of homeopathic medicines on *Alternaria solani*. African J. Agric. Res. 11(39):3824-3838.
- Trebbi, G.; Nipoti, P.; Bregola, V.; Brizzi, M.; Dinelli, G. and Betti, L. 2016. Ultra-high diluted arsenic reduces spore germination of *Alternaria brassicicola* and dark leaf spot in cauliflower. Hort. Bras. 34(3):318-325.
- Tucker, A. O. and Maciarello, M. 1996. Volatile leaf oil of *Tagetes lemmonii* Gray. J. Essential Oil Res. 8(4):417-418.
- Zepeda, L. G. 2002. Diccionario médico homeopático ilustrado. Ed. Porrúa. México. 33 p.