



Universidad Autónoma de Querétaro  
Facultad de Ingeniería  
Maestría en Ingeniería en Biosistemas

**Producción de glucosinolatos en mostaza blanca (*Sinapis alba* L.) con factores modificadores de metabolismo en invernadero.**

Opción de titulación  
**Tesis**

Que como parte de los requisitos para obtener el Grado de:  
Maestría en Ingeniería en Biosistemas

**Presenta:**

Daniel Alejandro Arriaga Madrid

Dirigido por:

Dr. Ramón Gerardo Guevara González


Dr. Ramón Gerardo Guevara González  
Presidente

Dra. Angélica Feregrino Pérez  
Secretario

Dr. Enrique Rico García  
Vocal

Dr. Luis Miguel Contreras Medina  
Suplente

Dr. Irineo Torres Pacheco  
Suplente

  
\_\_\_\_\_  
Dr. Manuel Toledano Ayala  
Director de la Facultad

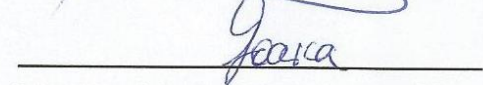
  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Firma

  
\_\_\_\_\_  
Dra. Ma. Guadalupe Flavia Loarca Piña  
Directora de Investigación y Posgrado

Centro Universitario  
Querétaro, Qro.  
Abril, 2018

## Resumen

Debido al uso indiscriminado de pesticidas y la creciente demanda de productos seguros sin la presencia de agroquímicos, han obligado a la búsqueda de nuevas estructuras con menor impacto ambiental y potencial para el control de plagas y enfermedades agrícolas, y que con el mismo resultado de la aplicación de plaguicidas sintéticos. Estas estructuras se pueden encontrar en las plantas ya que contienen metabolitos especializados, que están relacionados con los mecanismos de respuesta a la defensa de las plantas, inducidos por los estreses bióticos y abióticos. La exposición a actividad estimulante inducen a la generación de fitoalexinas, esto sugiere que el tratamiento de plantas con elicitors podría ser una manera factible para desencadenar la biosíntesis de los metabolitos bioactivos que han sido ampliamente investigados como compuestos responsables de la adaptación de las células vegetales al medio ambiente, las propiedades organolépticas específicas de los alimentos y la resistencia a los fenómenos naturales, en el caso de la mostaza los metabolitos especializados que se estudian son los glucosinolatos. El objetivo de esta investigación fue incrementar los niveles de glucosinolatos en mostaza blanca a través de aplicaciones foliares de Factores modificadores del metabolismo como lo son el ácido salicílico, peróxido de hidrogeno, Quitosan y el oligosacárido XH® todos ellos en dos diferentes concentraciones.

En los resultados obtenidos, se observó un aumento en los niveles de glucosinolatos en diferentes órganos de la planta con diferencias estadísticamente significativas, a excepción de la concentración total de los metabolitos en la raíz en la cual en todos los casos se muestra un decremento. Sin embargo, la dosis que mejores resultados presento fue el tratamiento donde se aplicaron 100 mg/ml de Quitosan, donde mostro incrementos en hoja del 126%, en flor del 202%, en semilla del 221%, pero en la raíz no mostro diferencias significativas.

Por otro lado, las plantas de mostaza tratadas con los elicitors mencionados, se utilizaron en pruebas de biofumigación en una mezcla con estiércol bovino fresco, los resultados indican que las muestras de mostaza elicitadas con Quitosan y mezcladas con estiércol, redujeron de manera significativa los niveles del fitopatógeno *Fusarium oxysporum* en suelos infestados en un 97 % (de 1600 UFC/g de suelo bajo a 50 UFC/g suelo después del tratamiento).

Estos resultados sugieren que la elicitación de plantas de mostaza blanca puede incrementar significativamente los niveles de glucosinolatos, así como su capacidad para ser utilizada como material útil en biofumigación de suelos contra *F. oxysporum*

(Palabras claves: Agricultura sostenible, metabolitos especializados, elicitors, bioactivos, glucosinolatos, *Fusarium oxysorum*, Quitosan)

## Abstract

Due to the indiscriminate use of pesticides and the growing demand for safe products without the presence of agrochemicals, the search for new structures with less environmental impact and potential for the control of agricultural pests and diseases, with the same result of the application of synthetic pesticides, has been forced. These structures can be found in plants because they contain specialized metabolites, which are related to the defense mechanisms of plants, induced by biotic and abiotic stresses. Exposure to stimulating activity induces the generation of phytoalexins, this suggests that the treatment of plants with elicitors could be a feasible way to trigger the biosynthesis of bioactive metabolites that have been widely investigated as compounds responsible for the adaptation of plant cells to the environment, the specific organoleptic properties of food and resistance to natural phenomena. In the case of mustard, the specialized metabolites that are studied are glucosinolates. The objective of this research was to increase the levels of glucosinolates in white mustard through foliar applications of metabolic modifying factors such as Salicylic Acid, hydrogen peroxide, Chitosan and the XH® oligosaccharide, all of them in two different concentrations.

In the obtained results, an increase in the levels of glucosinolates was observed in different organs of the plant with statistically significant differences, except for the total concentration of the metabolites in the root in which, in all cases, a decrease is observed. However, the dose that showed the best results was the treatment where 100 mg / ml of Chitosan was applied, displaying rises of 126% in the leaf, 202% in the flower, 221% in the seed. Yet, the root did not show significant differences

On the other hand, the mustard plants treated with the aforementioned elicitors, were used in biofumigation tests in a mixture with fresh bovine manure. The results indicated that the samples of mustard elicited with Chitosan and mixed with manure significantly reduced the levels of the phytopathogen *Fusarium oxysporum* in 97% of sample infested soils (from 1600 CFU / g of low soil to 50 CFU / g soil after treatment).

These results suggest that the elicitation of white mustard plants can significantly increase the levels of glucosinolates, as well as their capacity to be used as a useful material in soil biofumigation contrasting with *F. oxysporum*.

(Key words: Sustainable agriculture, specialized metabolites, elicitors, bioactives, glucosinolates, *Fusarium oxysporum*, Chitosan)

## DEDICATORIA

A lo largo de mi vida me enfrentado con grandes retos y dificultades, sin embargo siempre he salido adelante, gracias al apoyo incondicional de la gente que me he encontrado en el camino y a mi familia, es por esto que dedico este trabajo a mis padres quienes me han apoyado para poder llegar a esta instancia de mis estudios, ya que ellos siempre han estado presentes para apoyarme moral y psicológicamente, en especial a mi madre por todo su amor, confianza y cariño que en mi deposita y espero nunca defraudarla, te amo madre.

También se lo dedico a mis hijos Daniel Alain y Mateo quienes han sido mi mayor motivación para nunca rendirme en los estudios y poder llegar a ser un ejemplo para ellos.

A mi amada esposa que ha sido el impulso durante toda mi carrera y el pilar principal para la culminación de la misma, que con su apoyo constante y amor incondicional ha sido amiga y compañera inseparable, fuente de calma y consejo en todo momento. Te amo.

A lo largo de mi camino en la maestría me demostraron que su apoyo hacia mí era sincero y sin buscar nada a cambio, lo cual estoy muy agradecido porque siempre hay malos momentos, ahí es donde se necesitan compañeros de buena fe, y yo le doy gracias a Dios por haberme dado a esos compañeros, porque sin su apoyo y su comprensión nada de esto hubiera sido posible, ahora terminamos todos una etapa más de la vida, pero iniciamos la siguiente con una sonrisa y muchas expectativas de que nos traiga mucha felicidad. Por eso les dedico este trabajo Tania, Nalle, Christopher, Raúl, Toñito, Paco, Isma.

Le dedico este trabajo a los trabajadores en especial a la señora Silvia Lugo Mata que sin su trabajo esto no se hubiera realizado de la misma manera, siendo siempre accesible y dispuesta a ayudar. Gracias.

Sinceramente:

Daniel Alejandro Arriaga Madrid

## **AGRADECIMIENTOS**

- ❖ Agradezco a DIOS, por haberme permitido pertenecer a una gran familia, por brindarme salud y por ayudarme a culminar una meta más en mi vida.
- ❖ Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por el financiamiento otorgado para realizar mis estudios de Especialidad.
- ❖ A la Universidad Autónoma de Querétaro, por darme la oportunidad de pertenecer a dicha institución, pero especialmente al personal académico de la Maestría en ingeniería de Biosistemas por su valiosa aportación para mejorar mi formación académica y desempeño profesional.
- ❖ Al Dr. Ramón Gerardo Guevara González por su valiosa dirección en este trabajo, por brindarme sus conocimientos, tiempo, apoyo.
- ❖ A la Dra. Angélica Feregrino Pérez por su valioso tiempo, comentarios y aportes a este trabajo, por guiarme en el laboratorio y dándome mucha motivación y compartir su amor por la vocación.
- ❖ Al Dr. Enrique Rico García por la dedicación y espacio otorgado para la revisión de este documento así como sus valiosas sugerencias y observaciones, por ser guía, líder y enseñarme cada día en este proceso.
- ❖ Al Dr. Luis Miguel Contreras quien apoyo en la revisión de este trabajo, me brindo su amistad, enseñanzas y trabajo en equipo.
- ❖ Al Dr. Irineo que gracias a sus consejos y a sus enseñanzas pude avanzar de manera eficaz y motivada en la realización de este trabajo.
- ❖ A todo el personal del campus Amazcala, administrativos y trabajadores, ya que sin su apoyo esto no hubiera sido posible les agradezco por su tiempo y disposición.

## Tabla de Contenidos

<b>I. Introducción</b> .....	1
<b>II. Motivación</b> .....	3
<b>III. Antecedentes</b> .....	5
<b>IV. Fundamentación teórica</b> .....	13
4.1 Las crucíferas .....	13
4.2 La mostaza blanca ( <i>Sinapis alba</i> L.).....	14
4.3 Metabolitos especializados .....	15
4.4 Características de los metabolitos especializados.....	16
4.5 Función de los metabolitos especializados en la defensa de las plantas.....	18
4.6 Los glucosinolatos .....	21
4.7 Biosíntesis de los glucosinolatos .....	23
4.8 Glucosinolatos en la defensa de las plantas .....	25
4.9 Transporte de glucosinolatos en plantas .....	27
4.10 Elicitores o factores modificadores del metabolismo (FMM).....	28
4.11 Tipos de Elicitores y su modo de acción. ....	28
4.12 La biofumigación.....	32
<b>V. Hipótesis y objetivos</b> .....	35
5.1 Hipótesis .....	35
5.2 Objetivo General.....	35
5.3 Objetivos específicos .....	35
<b>VI. Materiales y métodos</b> .....	36
6.1 Localización del estudio .....	36
6.2 Características del invernadero.....	36
6.3 Preparación del invernadero .....	37

6.4	Sistema de riego.....	37
6.5	Material vegetal .....	38
6.6	Germinación.....	38
6.7	Trasplante.....	40
6.8	Diseño de experimentos.....	40
6.9	Determinación de glucosinolatos mediante espectrofotometría .....	41
6.10	Determinación de Metilación Global de DNA .....	43
6.11	Prueba de biofumigación .....	44
6.12	Bioseguridad y ética.....	49
<b>VII.</b>	<b>Resultados y discusiones .....</b>	<b>50</b>
7.1	Resultados de niveles de glucosinolatos.....	50
7.2	Niveles de metilación global de DNA (CpG).....	55
7.3	Pruebas de biofumigación.....	57
<b>VIII.</b>	<b>Conclusiones .....</b>	<b>60</b>
<b>IX.</b>	<b>Referencias bibliográficas.....</b>	<b>62</b>
<b>X.</b>	<b>Anexos.....</b>	<b>77</b>

## Índice de Cuadros

Cuadro 1. Contenido de glucosinolatos en hortalizas del genero Brassica (Verkerk et al., 1997)..	22
Cuadro 2. Lista de diferentes tipos de factores modificadores del metabolismo adaptación de Du jardín, 2015.....	29
Cuadro 3. Tratamientos y dosis de los FMM utilizados.....	41
Cuadro 4. Tratamientos para la prueba de biofumigación.....	45
Cuadro 5. Porcentajes de incremento de glucosinolatos totales en flores de mostaza blanca con respecto al control.....	53
Cuadro 6. Resultados de diagnóstico para prueba de biofumigación utilizando plantas de mostaza **** P<0.0001, ***p<0.001, **p<0.01,*p<0.05 de acuerdo al a prueba de Dunnett. ....	58
Cuadro 7. Valores de referencia de cantidad de inculo y el riesgo de daño ocasionado (INIFAP, 2016).....	59



## Índice de figuras

Figura 1. Mecanismo de defensa en plantas. ....	8
Figura 2. Variedades de Crucíferas. ....	14
Figura 3a. Planta completa de mostaza amarilla ( <i>Sinapis alba</i> ), 3b. Flor de mostaza y siluas o vainas donde se producen las semillas. ....	15
Figura 4. Metabolismo primario y secundario de las plantas en donde se muestran las diferentes rutas metabólicas adaptado de (Taiz y Zeiger. 2006). ....	17
Figura 5. Diferentes ataques a la planta y su respuesta de defensa (Avalos y Pérez-Urria, 2009)..	19
Figura 6. Estructura general de los glucosinolatos (Mikkelsen et al., 2002). ....	22
Figura 7. Ciclo de alargamiento de aminoácidos en la biosíntesis de glucosinolatos (Sonderby et al., 2010). ....	24
Figura 8. Complejo glucosinolatos- mirosinasa y sus diferentes derivados (Bones & Rossiter, 2006). ....	26
Figura 9. Destino de los glucosinolatos e isotiocianatos en el suelo (Gimsing y Kirkegaard, 2009). ....	33
Figura 10. Invernadero tipo español de la facultad de ingeniería campus Amazcala .....	36
Figura 11. Tubería blanca para calefacción. ....	37
Figura 12. Sistema de riego para planta de mostaza. ....	37
Figura 13. Mostaza blanca variedad Sichuan. ....	38
Figura 14a. Charola de 200 cavidades sembradas con mostaza. 14b. planta de mostaza lista para trasplante con 3 hojas verdaderas. ....	39
Figura 15. Trasplante de mostaza en tezontle. ....	40
Figura 16. Pesado de muestra en balanza analítica. ....	42
Figura 17. Cajas forradas de plástico negro para prueba de biofumigación. ....	45
Figura 18 Mostaza trasplantada en cajas de madera. ....	46
Figura 19. Cajas cubiertas con plástico, en donde se muestra el termómetro para monitoreo. ....	47
Figura 20. Crecimiento de hongo <i>Fusarium Oxisporum</i> y vista del hongo en microscopio con objetivo de 40x. ....	48
Figura 21. Tinción de <i>fusarium oxisporum</i> con azul de lacto fenol. ....	48
Figura 22. Concentración de glucosinolatos totales en hoja de mostaza blanca .....	51

Figura 23. Concentración de glucosinolatos totales en flores de mostaza blanca.....	51
Figura 24. Concentración de glucosinolatos totales en semillas de mostaza blanca.....	53
Figura 25. Concentración de glucosinolatos totales en raíz de mostaza blanca.....	54
Figura 26. Porcentaje de metilación en plantas de mostaza blanca inducidas con diferentes FMM. .....	56
Figura 27. Diferencias de tamaño, vegetación y producción de flor y semilla entre Tratamiento 8 imagen izquierda y tratamiento 9 imagen derecha. ....	56

## I. Introducción

La mostaza *Brassica alba* L. o *Sinapis alba* L. comúnmente llamada mostaza amarilla o blanca es originaria del sur de Europa. Actualmente es cultivada en Australia, China, Chile, Japón, Inglaterra, Canadá y Estados Unidos (Divakaran and Babu, 2016). Es una planta herbácea anual, que ha sido usada en distintos ámbitos, por ejemplo en gastronomía como fuente de aceites comestibles y materia prima para aderezos en áreas como la medicina, como antídoto para picaduras de insectos y en la agricultura como supresor de malas hierbas, estas características se le atribuyen debido al contenido de glucosinolatos (Peng *et al.*, 2014)

Los glucosinolatos (GLs), son metabolitos especializados (ME) presentes en las plantas del orden Caparales, particularmente, en la mostaza se encuentra el glucosinolato sinalbina y el isotiocianato de alilo, las cuales son esencias alelo químicas volátiles de olor y sabor picante, estas características se deben a que la enzima mirosinasa participa en la hidrólisis de los glucosinolatos, llevando a cabo la liberación de compuestos, como Tiocianatos e Isotiocianatos, compuestos que confieren a la mostaza protección ante diversos tipos de ataques por patógenos e insectos (Björkman *et al.*, 2011)

Estos compuestos se forman para permitir a la planta que pueda interactuar con el medio ambiente, en especial con patógenos (virus, bacterias, hongos, oomicetos) y plagas (insectos herbívoros, nematodos); y se forman ya que la planta tiene diferentes mecanismos de respuesta inducida los cuales han sido categorizados como respuesta sistémica adquirida (SAR), respuesta sistémica inducida (RSI) y respuesta hipersensible (RH) (Pérez-Martínez *et al.*, 2016).

Una de las primeras manifestaciones para la generación de metabolitos especializados, es la reacción RH, que deriva en muerte celular localizada en el lugar de la infección generando lesiones necróticas. A nivel celular se observa la producción de especies reactivas de oxígeno, fuga de electrolitos, per oxidación de lípidos, refuerzo de pared celular y presencia de fitoalexinas. (Salgado Siclán, 2012).

Los SAR son respuestas inducibles contra agentes fitopatógenos y se deben a los mecanismos de defensa pasivos que están constituidos por aquellas características físico-químicas preexistentes en la planta. Otro sistema de respuesta que participa en la generación de metabolitos especializados es el mecanismo de defensa activo, que hace referencia al proceso de resistencia sistémica, la cual se genera luego de que la planta detecta que está siendo afectada por el medio (Dotor y Cabezas, 2014)

Ante una afectación proveniente de un patógeno, se activa el mecanismo de defensa, el cual tiene como componentes elicitores o factores modificadores del metabolismo (FMM), que son sustancias indicadoras de ataque a la planta, pueden ser compuestos derivados del patógeno tales como la membrana, fragmentos de pared celular, metabolitos secundarios quitinas, polisacáridos u oligosacáridos y algunos compuestos sintéticos análogos a algún receptor del elicitador o de FMM tales como ácido salicílico, peróxido de hidrógeno, proveniente de la planta, encargado de dar el aviso de ataque del patógeno, un señalizador, que funciona como desencadenante del proceso de resistencia y probable amplificador de la señal de ataque y que inducen a cambios fisiológicos en las plantas (Dempsey *et al.*, 2011; Dotor and Cabezas, 2014).

La presente investigación busca aumentar la cantidad de bioactivos, como los glucosinolatos presentes en las plantas de mostaza blanca (*Sinapis Alba* L.) y que tienen propiedades nematocidas, anti bacteriales y anti fúngicas, desparasitante de peces y aves., mediante la aplicación de factores modificadores de metabolismo vegetal como quitosán, ácido salicílico, oligosacárido, y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> para incrementar sus mecanismos de defensa y así poder utilizar estos compuestos presentes en la planta como una alternativa al manejo de plagas en suelo.

## II. Motivación

Debido al uso indiscriminado de plaguicidas, antibióticos y a la creciente demanda de productos inocuos y sin presencia de agroquímicos se han considerado a las plantas como un campo apropiado para la búsqueda de nuevas estructuras con menor impacto ambiental y con potencial para el control de plagas agropecuarias. Por lo que se busca la protección de los cultivos y animales con métodos novedosos y ecológicos compatibles con la agricultura sostenible que representen una alternativa viable a la aplicación de productos químicos, ya que es demanda del consumidor contar con alimentos libres de residuos de plaguicidas, hormonas y antibióticos, una de estas alternativas es el uso de sustancias semioquímicas derivadas del metabolismo secundario de las plantas, que tienen la capacidad de intervenir en la comunicación química entre organismos (González Gallegos, 2015; Mareggiani, 2001).

Las diferencias fundamentales de estos compuestos con los plaguicidas químicos convencionales consisten en su singular modo de acción, que no es por la vía de toxicidad directa, sino por la pequeña concentración en el material vegetal y su especificidad para la especie a combatir. Se dividen en general en dos grandes grupos: agentes o plaguicidas microbianos, que incluyen las bacterias, hongos, virus y protozoos, y agentes o plaguicidas bioquímicos, que comprenden los atrayentes, hormonas, reguladores del crecimiento de plantas e insectos, enzimas y sustancias de señalización química, muy importantes en la relación planta-insecto (Valenciaga *et al.*, 2007)

En el caso de la mostaza los metabolitos secundarios de interés son los glucosinolatos (GLs), los cuales se caracterizan por ser una serie de compuestos no volátiles que carecen de fragancia; se sintetizan y almacenan en las plantas como precursores relativamente estables de los isotiocianatos, los cuales son responsables del aroma y olor típico del género *Brassica* (Campas-Baypoli *et al.*, 2009).

Los GLs se hidrolizan mediante la enzima mirosinasa en compuestos que defienden a las plantas frente a una amplia gama de herbívoros, incluidos insectos e invertebrados acuáticos, estos al ser ingeridos también son hidrolizados por la microflora intestinal por lo

que los GLs y sus productos de descomposición están atrayendo la atención en la investigación de nutrición de peces debido a su potencial parasiticida contra las especies de piojo de mar que infectan salmónidos cultivados. Los peces que reciben piensos funcionales basados en GLs pueden beneficiarse adicionalmente de sus propiedades desintoxicantes e inmuno moduladoras (Skugor *et al.*, 2016).

Sin embargo, en la siguiente investigación se ha enfocado a la agricultura tomando en cuenta los antecedentes en el área acuícola de que los glucosinolatos pueden detener enfermedades en peces y tienen la propiedad de controlar el crecimiento de microorganismos patógenos tales como Marchitez (*Fusarium spp.*), Tizon temprano (*Alternaria spp.*), y ataque de hongos, que han sido reportados como agentes causantes de enfermedades producidas por los alimentos y/o descomposición de los mismos (Viuda-Martos *et al.*, 2008)

La actividad antimicrobiana de los glucosinolatos se debe a que atacan la pared celular, membrana celular, enzimas metabólicas, la síntesis de proteína y el sistema génico. Cada uno de estos puntos, son esenciales para el desarrollo celular, por lo tanto si uno es atacado o inactivado la velocidad de crecimiento del microorganismo se ve minimizada (Sauceda, 2011)

Las pérdidas por enfermedades se estiman alrededor del 5-25% en países desarrollados y 20-50% en países en desarrollo. Estas pérdidas se pueden minimizar si se produce en invernadero, el cual son construcciones agrícolas de estructura metálica, usada para el cultivo y/o protección de plantas, con cubierta de película plástica traslucida que no permite el paso de la lluvia al interior y que tiene por objetivo reproducir o simular las condiciones climáticas más adecuadas para el crecimiento y desarrollo de las plantas cultivadas establecidas en su interior, con cierta independencia del medio exterior y cuyas dimensiones posibilitan el trabajo de las personas en el interior (Norma Mexicana para el Diseño y Construcción de Invernaderos, 2008). Sin embargo la hermeticidad que brindan estas estructuras no garantiza la sanidad del cultivo por lo que se buscan nuevas alternativas como estos ME para brindar protección a los cultivos disminuyendo así las mermas causadas por patógenos.

### III. Antecedentes

Debido a la acción de plagas y enfermedades, se invierten cuantiosas sumas, valoradas en más de 20, 000 millones de Dólares al año (USD/año) en técnicas y productos cada vez más costosos, que su utilización sistemática origina trastornos notables en el ambiente (Gonzalez y Bernal, 2000) los cuales se calculan alrededor de 100 mil millones USD/ año (FAO, 2003).

En varias regiones de México, los productores de tomate en condiciones invernadero han sufrido cuantiosas pérdidas provocadas por la bacteria *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Durante el ciclo agrícola 2006-2007, en el estado de Sinaloa fueron dañadas por este patógeno más de 180 hectáreas, con pérdidas superiores a los 40 millones de USD (Borboa-Flores *et al.*, 2010)

A nivel mundial la producción de plaguicidas orgánicos sintéticos aumentó desde los inicios del siglo XX, debido al desarrollo de la industria petrolera. No obstante, la producción y uso de estos compuestos, así como de lubricantes, solventes, gasolinas u otros, han aumentado la carga de estas sustancias en la atmósfera, hidrósfera, suelos y sedimentos, lo que ha provocado episodios críticos de contaminación en el ambiente (García-Gutiérrez, y Rodríguez-Meza, 2012).

La Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación (FAO, por sus siglas en inglés) define a los plaguicidas como cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o controlar cualquier plaga, incluyendo vectores de enfermedades humanas o de los animales, las especies no deseadas de plantas o animales que causen perjuicios o que interfieren de cualquier otra forma en la producción, elaboración, almacenamiento, transporte o comercialización de alimentos, productos agrícolas, madera y sus derivados o alimentos para animales o que pueden administrarse a los animales para combatir insectos, arácnidos u otras plagas en o sobre sus cuerpos (COFEPRIS, 2013; FAO, 2012).

En el mundo se conocen alrededor de 10 millones de sustancias químicas, de las cuales 70 mil son de uso corriente, incluyendo medicamentos y plaguicidas. Cada año ingresan al mercado entre 500 y 1000 nuevas sustancias, generándose entre 300 y 400 millones de toneladas de desechos peligrosos (Ongley, 1997).

Según estimaciones de la Organización Mundial de la Salud cada año entre 500,000 y 1 millón de personas se intoxican con plaguicidas y entre 5 mil y 20 mil mueren, ocurriendo en los países del tercer mundo el 50% de los casos de envenenamiento y el 80% de los casos se intoxican por los alimentos. Al menos la mitad de los intoxicados y el 75% de los que fallecen son trabajadores agrícolas, el resto de las personas que no se dedican al campo son consumidores que sufren de envenenamientos por consumo de alimentos contaminados (OMS 1990, Eddleston *et al.*, 2002)

Para enfrentar esta catástrofe ecológica cada vez, un mayor número de países va hacia la conversión de la agricultura convencional de altos insumos a la agricultura sostenible, como un sistema de producción ambientalmente viable, económica y con la utilización óptima de los recursos naturales (González Gallegos, 2015.)

Además la producción de alimentos va en aumento, y el consumidor se preocupa cada vez más por el consumo de alimentos inocuos y de alta calidad es por ello que la ciencia evoluciona constantemente en la búsqueda de mejoras genéticas de las especies; el desarrollo de una moderna agro tecnología, el empleo de niveles altos de fertilizantes y plaguicidas, y la aplicación intensiva de novedosas tecnologías de riego y mecanización, entre otras (FAO, 2012).

Los efectos adversos que los plaguicidas tienen sobre el medio ambiente y la salud humana principalmente por su uso intensivo e indiscriminado, han llevado a la necesidad de implementar medidas eficaces y con un menor impacto ambiental, social y sobre las características organolépticas de los alimentos (Eddleston *et al.*, 2002)



La mostaza amarilla es una especie que puede resultar rentable para los productores siendo una excelente alternativa a la hora de diversificar la rotación, con la ventaja de ser resistente a la sequía, a altas temperaturas y a las heladas, presenta un ciclo corto comparado con otros cereales de grano lo que permite la liberación temprana de la parcela, con posibilidad de realizar cultivos de segunda. La mostaza luego de la cosecha deja un residuo el cual no se encuentra suficientemente estudiado ni caracterizado. El uso adecuado de los rastrojos reduce la erosión, contribuye al control de malezas, mejora la infiltración del agua, aumenta la materia orgánica y los microorganismos del suelo, colaborando a su fertilidad en planteos de producciones sustentables (Tello *et al.*, 2014)

Kirkegaard *et al.* (2008) usaron residuos de mostaza y rábanos para pruebas de biofumigación y encontraron respuesta positiva en la reducción de la población de los patógenos *Ralstonia solanacearum* y *Meloidogyne arenaria*. El efecto biocida se le atribuyó a la formación de isotiocianatos provenientes de la hidrólisis de los ME en el proceso de descomposición de los residuos.

Los ME son bien conocidos por estar relacionados con los mecanismos de respuesta de defensa de la planta, inducidos en respuesta al estrés biótico y abiótico. Las plantas al verse expuestas a la actividad estimulante generan fitoalexinas, glucosinolatos entre otras sustancias de defensa vegetal, lo que sugiere que el tratamiento de plantas con factores modificadores del metabolismo podría ser una forma factible de desencadenar la biosíntesis de metabolitos especializados bioactivos.

Los glucosinolatos son metabolitos secundarios de plantas que se encuentran principalmente en el género *Brassicas*, en general, los glucosinolatos y sus productos de degradación son considerados componentes potenciales en el sistema de defensa de plantas contra insectos y herbívoros. Como consecuencia de las actividades biológicas de amplio espectro, el estudio de los glucosinolatos se ha relacionado con muchos campos diferentes, incluyendo entomología, química, fito mejoramiento, nutrición, genética y medicina. Durante la evolución, las plantas han desarrollado diferentes formas de adaptación a las

condiciones ambientales, tanto bióticas como abióticas, adaptaciones que les han permitido establecerse de manera exitosa en cualquier ecosistema (Gómez Y Reis, 2011).

Como respuesta a los daños por factores bióticos y abióticos, las plantas han desarrollado sistemas de defensa, que se han clasificado en dos categorías, un primer sistema de defensa constitutiva o preexistente y otro de respuesta inducible (Figura 1), ambos sistemas de defensa son específicos según la especie, ya que son consecuencia de la memoria genética y la capacidad de la planta de sintetizar ME ((García-Mateos Y Pérez-Leal, 2003; Tofiño et al., 2007).



Figura 1. Mecanismo de defensa en plantas.

El sistema de defensa preexistente o pasivo, se encuentra asociado a las condiciones que ya tiene la planta y no depende de algún ataque por patógenos en la planta. Las defensas activas de la planta compuestas por sustancias que son productos del metabolismo secundario, son sintetizados de forma relativamente constante por la planta y ofrecen defensa al ataque de patógenos siendo el caso de algunos terpenos, fenoles, flavonoides, isoflavonoides, glucosinolatos, glicosidos cianogénicos, aminoácidos no proteicos, y algunas proteínas (Segura, 2006; Thatcher, 2005; Martínez *et al.*, 2011).

La defensa inducida, es aquella que ocurre como respuesta al ataque de un patógeno a una planta. Esta respuesta inicia de manera local al poco tiempo de detectarse el ataque del patógeno y dependiendo del tipo de respuesta generada por el señalizador, esta puede amplificarse a toda la planta. Existen tres mecanismos de respuesta inducida, los cuales han sido categorizados como respuesta SAR, RSI y RH (Martínez, 2011; Pérez *et al.*, 2016).

La RSI se lleva a cabo por medio de FMM, los cuales son sustancias que accionan la síntesis de diversos compuestos (Gómez *et al.*, 2011). Una vez detectado el FMM, se desencadena una respuesta inducida, que conlleva el cambio en la prioridad del metabolismo del total de la planta y que va a generar modificaciones tanto físicas, como en los componentes químicos, induciéndose la producción de metabolitos especializados (ME), generando compuestos bioquímicos (Heldt, 2005).

La generación de compuestos bioquímicos es mediada por genes, la cual, luego del proceso de recepción del FMM, inicia la síntesis de rutas señalizadoras, que van a llevar al objetivo final de producción de sustancias antimicrobianas como glucosinolatos y genes de resistencia relacionados con la patogenicidad (Rinella *et al.*, 2010).

Los FMM pueden ser físicos, que incluyen períodos de sequía, salinidad, ruptura de tejidos, radiaciones de alta frecuencia como la luz ultravioleta o temperaturas fuera del rango ideal de crecimiento y desarrollo de la especie en cuestión; los cuales provocan daños del tipo estructural.

En este caso Qasim *et al.* (2003), reportaron que la salinidad a concentraciones por encima del umbral de tolerancia en plantas de canola aumenta las concentraciones de glucosinolatos, esto también fue reportado por Lopez-Berenguer *et al.* (2008) que demostraron que la salinidad a 40 mM aumentaba la cantidad de glucosinolatos en flores de brócoli. En este estudio, se esperaba un aumento en la degradación de los glucosinolatos como consecuencia del daño de la membrana por el estrés de la sal indicado por una alta fuga relativa de electrolitos.

Por lo tanto, la falta de relación entre la actividad de la mirosinasa y los niveles de glucosinolatos apoyó la hipótesis de que la salinidad da lugar a una alteración de la actividad metabólica produciendo un aumento en el contenido de glucosinolatos.

Además se ha reportado que el estrés por sequía ha aumentado el nivel de glucosinolatos en especies del género *Brassica* tales como *Nasturtium officinale*, *Brassica oleracea* L. var. Capitata, *Brassica oleracea* L. var. Itálica, *Brassica napus* L., *Brassica rapa* ssp. rapifera L., and *Brassica carinata* L (Gadner *et al.* 2003; Radovich *et al.* 2005).

Los FMM también pueden ser químicos y se pueden utilizar una gran diversidad de compuestos como el quitosano, pectinas, benzotiadiazol (BTH), 1- metilciclopropano, iones metálicos, ácido salicílico, metil jasmonato, cloruro de calcio, sulfato de cobre, peróxido de hidrógeno, oligosacáridos, entre otros, los cuales imitan o cumplen su función como moléculas de señalización simulando las condiciones en las que un patógeno, depredador o fuente de estrés activa al metabolismo de la planta (Patel y Krishnamurthy, 2013; Ruiz-García y Gómez-Plaza, 2013).

Pueden utilizarse tratamientos especializados como la nutrición de los cultivos o la aplicación de FMM, para aumentar la generación de ME en la planta (Smetanska, 2008). Como es el caso del Sulfato de Zinc ( $ZnSO_4$ ) y Sulfato de potasio ( $K_2SO_4$ ) que de acuerdo a Runqfang *et al.*; (2013) lo aplicaron en germinado de brócoli y reportaron un incremento del 58.2% y 20 % de incremento de glucosinolatos respectivamente en comparación con el control tratado solamente con agua.

Kastell *et al.* (2013) reportan que por medio de la aplicación de fitohormonas y ácido jasmónico en Cultivo in vitro de raíces de *Sinapis alba* y *Brassica rapa* subsp. *Rapa pygmaea teltoviensis* se puede incrementar la presencia de glucosinolatos en hoja y raíces. De acuerdo al estudio los cultivos modificados con *Agrobacterium rhizogenes* aumentan la cantidad de glucosinolatos presentes en las hojas de *Sinapis Alba*, además las plantas transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* y tratadas con citoquininas y ácido jasmónico presentaron incrementos de glucosinolatos.

Inducidos por los factores antes descritos las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Estrategias tales como la síntesis de enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano. Cambios en la composición y la estructura de la pared celular vegetal, para formar una barrera más rígida y menos digerible para insectos.

Los ME son sustancias que no participan en el metabolismo primario de la planta pero que la proveen de un arsenal de mecanismos de defensa, por ejemplo en las crucíferas los ME presentes son los glucosinolatos, estos compuestos se encuentran en hortalizas como la col de Bruselas, brócoli, coliflor, repollo y mostaza de acuerdo con Shahidi *et al.* (1997), el transporte de estos compuestos en las plantas crucíferas, se lleva a cabo por medio del floema, junto con foto asimilados en la corriente de translocación osmóticamente impulsados hacia los diferentes órganos de las plantas, el transporte por el floema de glucosinolatos puede ayudar a la planta a defenderse contra los organismos que se alimentan de floema y también adquirir la capacidad para coordinar la síntesis y el uso de los recursos de protección entre los distintos órganos (Sixue *et al.*, 2001).

En estos cultivares la cantidad de glucosinolatos varía de una especie a otra e influye de manera directa el tipo de tejido de la planta. Los glucosinolatos son hidrolizados por la enzima mirosinasa, fruto de esta fase se obtienen compuestos biológicamente activos entre los que se destacan isotiocianatos sulfuranos, nitrilos y tiocianatos, estos procesos dependen de las condiciones de reacción y la presencia de proteínas asociadas (Inis *et al.*, 2011). Siendo estos productos los responsables de las propiedades organolépticas, nutritivas y biocidas de las plantas que los producen, así como de la utilización de este grupo de especies por el hombre y los animales.

Los isotiocianatos producidos por la acción de la hidrólisis de los glucosinolatos por la mirosinasa, puede ser utilizado como biofumigante en suelo esto debido a la preocupación por el empleo de prácticas agrícolas más respetuosas con el medio ambiente y las limitaciones legales al uso de sustancias contaminantes favoreciendo el desarrollo de una agricultura sostenible (Kirkegaard *et al.* 1998, Lazzeri *et al.* 2004).

La biofumigación, aparece como una de las alternativas más eficaces para el tratamiento de plagas y patógenos de suelo, y se fundamenta en el efecto biocida inducido por los compuestos volátiles procedentes de la descomposición de las enmiendas en el control de plagas y enfermedades. Aunque los productos liberados pueden ser de muy diversos tipos, destacan particularmente por su eficacia aquellos que son generados durante la degradación de los diferentes glucosinolatos presentes tejidos de crucíferas por la acción hidrolítica de la enzima mirosinasa sobre los diferentes glucosinolatos presentes en los tejidos de las plantas (Lazzeri *et al.*, 2004).

Es lo que se conoce como sistema “mirosinasa-glucosinolatos” de defensa de las plantas. De todos los productos resultantes de la hidrólisis de los glucosinolatos, son los isotiocianatos los que poseen mayor poder biocida, que parece estar asociado con su interacción inespecífica e irreversible con los grupos sulfidrilo, puentes disulfuro y grupos amino de las proteínas para formar productos estables (Kirkegaard *et al.* 2008).

De acuerdo a lo anterior es factible que al aplicar el uso de FMM en plantas del genero de las brassicas se lleve a cabo un incremento de los glucosinolatos, por lo que aumentaría la eficacia sobre la biofumigación, una alta concentración de estos metabolitos especializados en estas plantas disminuiría la cantidad de plantas utilizadas en este método lo que podría reducir los costos de los productor al utilizar estas técnicas.

## IV. Fundamentación teórica

### 4.1 Las crucíferas

La familia Cruciferae (*Brassicaceae*) presenta 390 géneros y 3.000 especies, de los cuales 108 géneros tienen especies silvestres en Europa. Esta familia botánica comprende especies originarias de zonas de clima templado, que están adaptadas a desarrollarse y crecer en zonas con temperaturas moderadas, lo que ha llevado a su cultivo en gran parte de los países de Europa. Son plantas herbáceas con hojas alternas, simples, enteras, divididas en roseta basal algunos ejemplos se muestran en la Figura 2.

De acuerdo a Del Rio *et al.* (2000), la familia Cruciferae comprende numerosas especies que han sido utilizadas tradicionalmente por el hombre como hortícolas, forrajeras, o como fuente de condimentos y aceites. Es una familia de gran importancia económica, con especies que presentan un aprovechamiento agrícola destacado: nabos, nabizas y grelos (*Brassica rapa*), mostaza negra (*Brassica nigra*), berza, repollo col asa de cántaro (*Brassica oleracea*), mostaza india (*Brassica juncea*), colza (*Brassica napus*), mostaza etíope (*Brassica carinata*), o el rábano (*Raphanus sativus*).

Además de los usos anteriormente citados, para los miembros de las crucíferas, diferentes estudios han puesto de manifiesto resultados prometedores en cuanto a su utilización para producción de biodiesel (Cardone *et al.*, 2003), biofumigación (Kirkegaard, 1998), y recuperación de suelos contaminados por metales pesados (Nanda-Kumar *et al.*, 1995, Del Río *et al.*, 2000). Todo esto debido a los bioactivos que contiene, tales como lo son los glucosinolatos y sus productos de degradación, que han demostrado ser unos potentes inhibidores del crecimiento de ciertas células tumorales.

Así, se ha comprobado que ciertos compuestos como el sulforrafano, derivado de la glucorafanina, un glucosinolato presente en las hojas de rúcula y en otras crucíferas como el brécol, tienen un marcado efecto protector contra determinadas sustancias carcinogénicas (Juge *et al.*, 2007; Singh *et al.*, 2009; Keum *et al.*, 2009; Chambers *et al.*, 2009; Traka *et al.*, 2010).

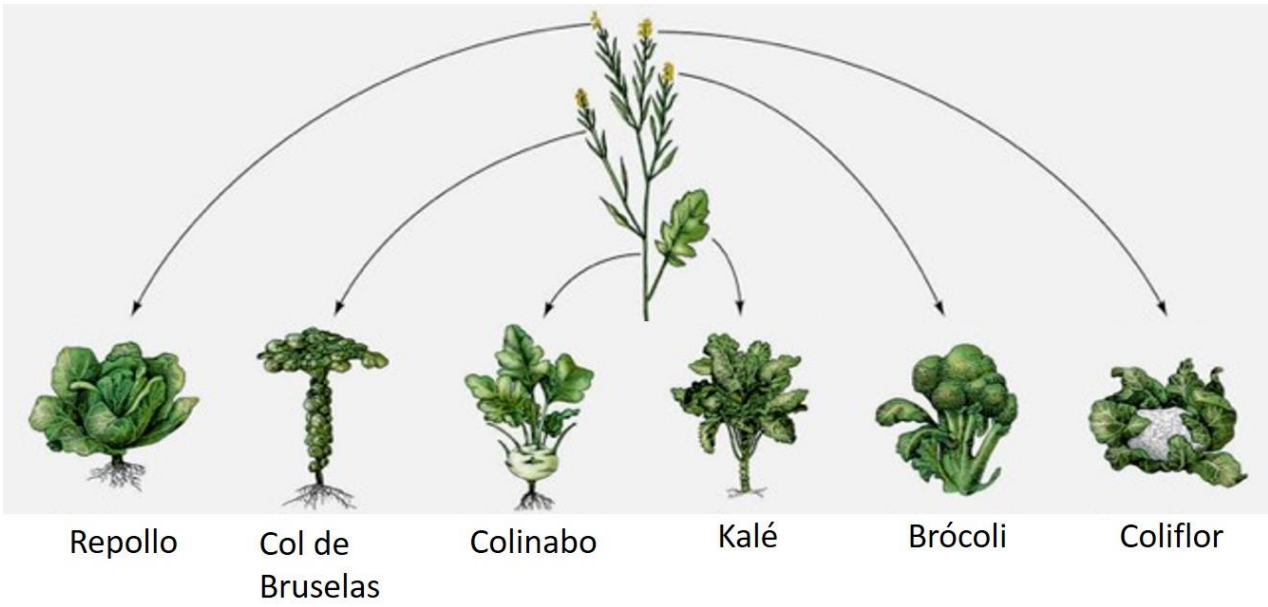


Figura 2. Variedades de *Crucíferas*.

#### 4.2 La mostaza blanca (*Sinapis alba* L.)

Es una planta anual de la familia de las Crucíferas. A veces se la conoce como *Brassica alba*, *Brassica hirta* o mostaza amarilla (Figura 3a). Se le cultiva comercialmente por sus semillas de mostaza en prácticamente todo el mundo, siendo sin embargo originaria probablemente de la región mediterránea.

Las flores amarillas se muestran en la figura 3b de la planta producen un tipo de vainas (silicuas) vellosas que contienen las semillas, en las que se encuentran aproximadamente media docena de semillas por vaina. La cosecha de la semilla de la mostaza se hace justo antes de que dichas vainas maduren del todo y se abran. Las semillas de esta especie de mostaza son redondas y de consistencia dura, de en torno al milímetro o 2 mm de diámetro, y con un color que puede ir del beige o el amarillo al marrón claro (Holgrem *et al.*, 2005).





Figura 3a. Planta completa de mostaza amarilla (*Sinapis alba*), 3b. Flor de mostaza y silicuas o vainas donde se producen las semillas.

### 4.3 Metabolitos especializados

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra condiciones de estrés biótico y abiótico. Para defenderse del daño ocasionado por la herida y el ataque por insectos o microorganismos patógenos, las plantas sintetizan enzimas que degradan la pared celular de microorganismos o que tienen la capacidad de inactivar tóxicos de origen microbiano.

La composición y la estructura de la pared celular vegetal también cambian, formando una barrera más rígida y menos digerible para insectos. Estas respuestas de defensa a su vez, se combinan con el desarrollo de estructuras contra sus depredadores, tales como las espinas, las espigas, los tricomas y los pelos glandulares.

Así mismo y como parte de la protección química, otra estrategia utilizada por las plantas es la producción de metabolitos especializados (ME) con actividad antimicrobiana, en contra de herbívoros, o con actividad antioxidante (Croteau *et al.*, 2000).

Los ME son compuestos de bajo peso molecular que no solamente tienen una gran importancia ecológica porque participan en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente, como es el establecimiento de la simbiosis con otros organismos y en la atracción de insectos polinizadores y dispersores de las semillas y frutos, sino que también, una síntesis activa de ME se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas tales como: a) el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), b) el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, c) la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes entre las diferentes especies de plantas y d) la exposición a la luz solar u otros tipos de estrés abiótico (Sepúlveda *et al.*, 2003)

#### **4.4 Características de los metabolitos especializados**

En tiempos actuales se conocen aproximadamente 20,000 estructuras de ME que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los ME que contienen nitrógeno incluyen a los alcaloides, aminoácidos no proteicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los ME no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides.

La variedad estructural dentro de un mismo grupo de ME está dada por modificaciones químicas a una estructura básica, originadas por reacciones químicas, tales como la hidroxilación, metilación, epoxidación, malonilación, esterificación y la glucosilación (Wink, 1999).

Los precursores de la biosíntesis de ME se derivan de rutas del metabolismo primario, tales como la glucólisis, el ciclo de Krebs o la vía del shikimato. Una síntesis constitutiva y específica de ME puede existir para cada tipo de órgano, tejido o tipo celular.

Existen también ME que se sintetizan en todos los órganos y tejidos de la planta, pero que se almacenan en órganos o tejidos diferentes a los de su síntesis, a través de su redistribución por el xilema y/o el floema, o por el espacio apoplástico la ruta metabólica se muestra en la Figura 4 (Edwards y Gatehouse, 1999).

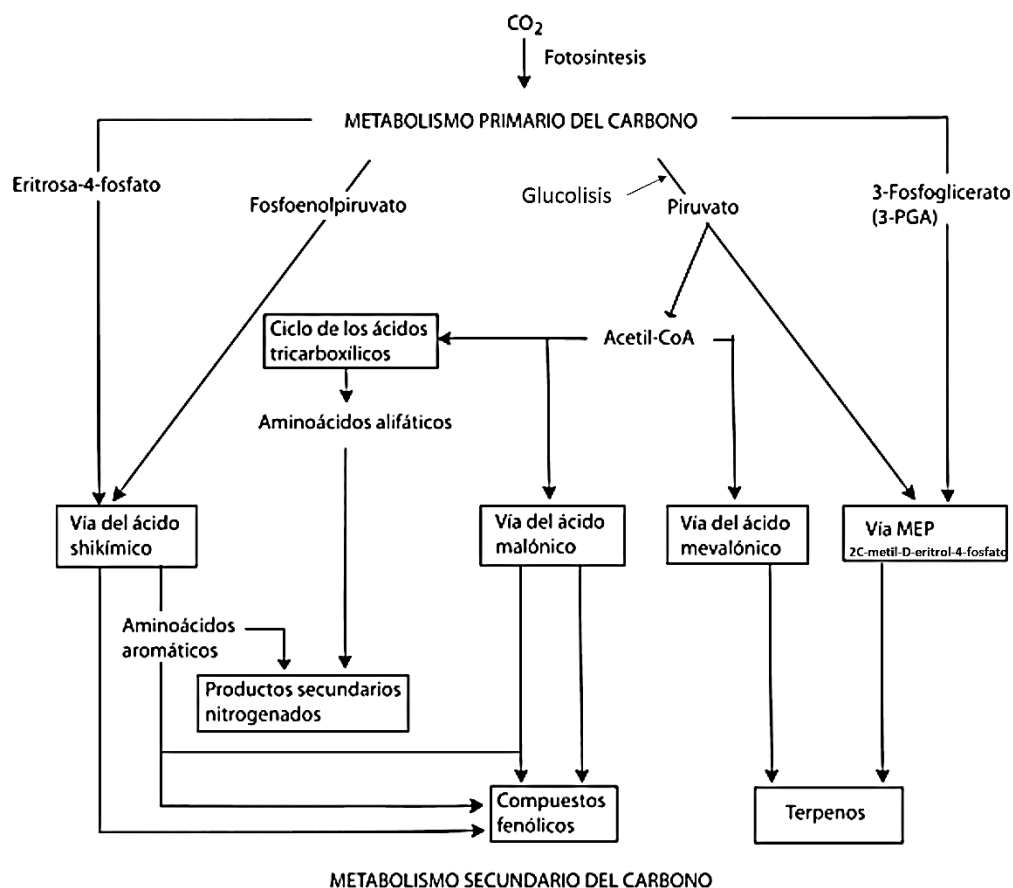


Figura 4. Metabolismo primario y secundario de las plantas en donde se muestran las diferentes rutas metabólicas (Adaptado de Taiz y Zeiger. 2006).

La síntesis de ME depende de la etapa de desarrollo de la planta y sus niveles constitutivos sólo se incrementan como parte de la respuesta al estrés abiótico o biótico. Este aumento en los niveles de ME, es importante para la supervivencia de las plantas, ya que su síntesis se deriva del metabolismo primario y porque algunos compuestos son tóxicos para la misma planta.

En este sentido, también es relevante hacer notar que la biosíntesis y el almacenamiento de ME o de sus precursores, ocurren en diferentes lugares de la célula vegetal. En general, la síntesis de algunos alcaloides y terpenos se realiza en los plástidos; los esteroides, sesquiterpenos y dolícoles se sintetizan en el retículo endoplásmico; mientras que la biosíntesis de algunas aminas y alcaloides tiene lugar en la mitocondria.

Los compuestos solubles en agua se almacenan en vacuolas, en tanto que los solubles en lípidos son secuestrados a estructuras especializadas tales como ductos de resinas, laticíferos, pelos glandulares, tricomas o en la cutícula (Wink, 1999).

#### **4.5 Función de los metabolitos especializados en la defensa de las plantas.**

La herida que se produce tanto por la depredación por insectos como por el daño mecánico inducido por factores físicos, son condiciones que se traducen en una respuesta de defensa de la planta Figura 5, la cual involucra la activación transcripcional de diversos genes de proteínas necesarias para la cicatrización de la herida y la prevención de la invasión de microorganismos patógenos. Estos genes codifican para proteínas involucradas en: a) en la fortificación de la pared celular, como son la formación de calosa, lignina y las proteínas ricas en hidroxiprolina, b) la producción de inhibidores de proteasas y de enzimas líticas tales como las quitinasas y glucanasas, y c) la síntesis de ME con actividad antimicrobiana y antioxidante (Peña-Cortes y Willmitzer, 1995).

La respuesta de defensa contra el ataque de microorganismos patógenos, está coordinada tanto espacial como temporalmente para una contención rápida del microorganismo patógeno, por lo que puede ser local o en sitios lejanos al daño, conocida como la RSA.

La respuesta local está asociada a una RH caracterizada por una muerte rápida de las primeras células infectadas y la restricción de la expansión del microorganismo patógeno, aislándolo del resto de la planta (Hammond-Kosack y Jones, 1996).

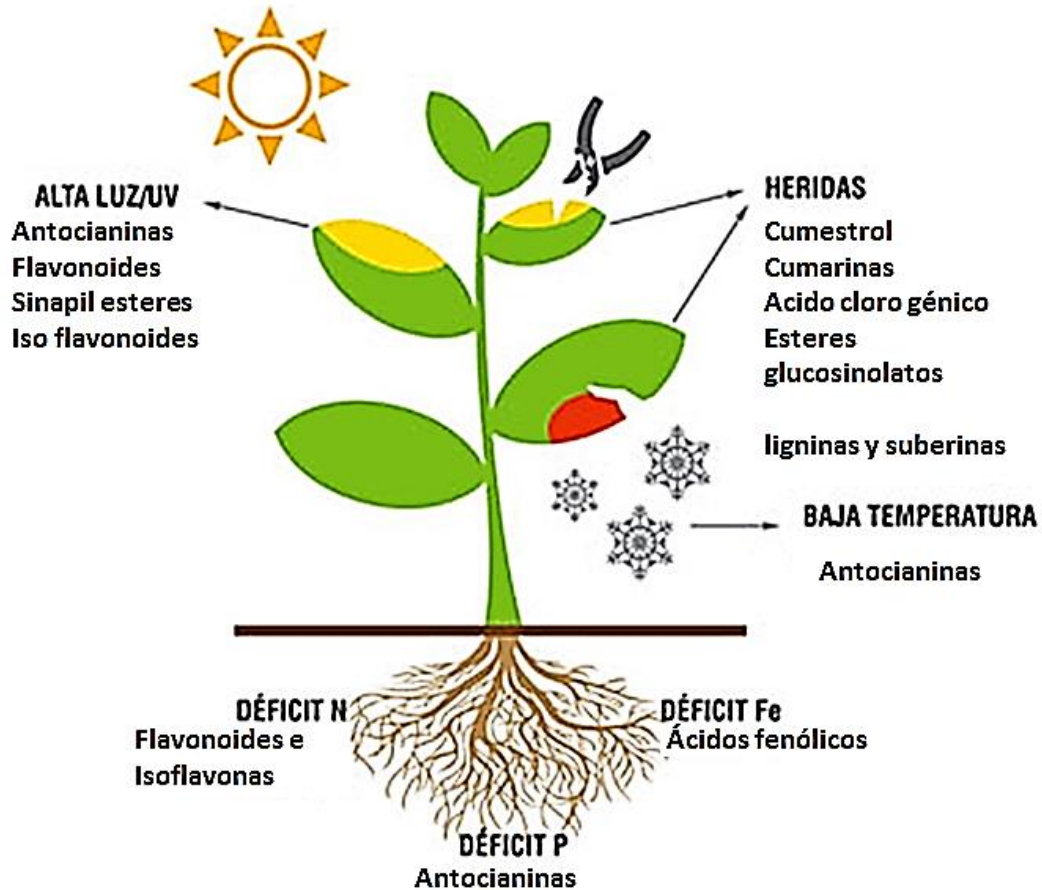


Figura 5. Diferentes ataques a la planta y su respuesta de defensa (Avalos y Pérez-Urria, 2009).

Entre los eventos tempranos que se desencadenan en la RH están: a) La producción de las especies reactivas de oxígeno (ERO), tales como el súperóxido, el radical hidroxilo y el peróxido de hidrogeno, b) La apertura de canales iónicos, y c) Los eventos de fosforilación y desfosforilación de proteínas.

Posteriormente, se da un aumento de los niveles del ácido jasmonico, el ácido salicílico y el etileno, la acumulación de proteínas relacionadas a la patogénesis, un aumento de la producción de ME con actividad antimicrobiana o antioxidante y el fortalecimiento de la pared celular, como son las proteínas ricas en prolina y activa la expresión de los genes de las enzimas involucradas en la síntesis de ME tales como la acetil CoA carboxilasa, la chalcona sintasa, la fenilalanina amonio liasa, la hidroximetil-glutaril-CoA reductasa (García-Ponce y Rocha-Sosa, 2000; Wasternack y Parthier, 1997).

Por su parte, las ERO pueden tener dos funciones, en la primera debido a su toxicidad, puede aumentar el daño producido por el estrés, mientras que en la segunda, puede actuar como una señal para la activación de las respuestas de defensa (Dat *et al.*,2000).

En la RH, las ERO pueden limitar la expansión del microorganismo patógeno causando la muerte de la célula vegetal huésped y matando directamente al microorganismo patógeno. Esta muerte celular puede resultar de procesos de oxidación tales como la peroxidación de lípidos de membranas, la oxidación de proteínas, la inhibición de enzimas y daños al DNA y al RNA.

El entrecruzamiento oxidativo con componentes de la pared celular vegetal como las proteínas ricas en prolina y los polisacáridos, es un mecanismo que puede reducir el ingreso del microorganismo patógeno y atraparlo en la célula huésped destinada a morir (Lamb y Dixon, 1997).

En su función como molécula señal, las ERO, pueden inducir la expresión de genes de enzimas antioxidantes que intervienen regulando los niveles excesivos y tóxicos tales como la súperoxido dismutasa, la ascorbato peroxidasa y la catalasa, así como la de genes de enzimas para la síntesis de ME con capacidad antioxidante, como son el ácido ascórbico,  $\alpha$ -tocoferol, los carotenoides, las antocianinas y las betacianinas (Grant y Loake, 2000; Mittler, 2002).

De tal forma que los ME son importantes en la respuesta de defensa de las plantas, restringiendo la invasión o matando directamente al microorganismo patógeno, o bien por su capacidad antioxidante contribuyen al mantenimiento del estado de óxido-reducción de la célula vegetal.

## 4.6 Los glucosinolatos

El término glucosinolatos hace referencia a la fracción de glucosilo ( " gluco " ), la presencia de un grupo sulfato (ate), y la propiedad de ser un precursor de un aceite de mostaza (sinol) (Niels *et al.*, 2012). Las principales fuentes de los glucosinolatos son las plantas de las familias de las crucíferas entre las que se destacan y que tiene interés comercial, col de bruselas, brócoli, coliflor y repollo, de acuerdo con (Shahidi *et al.*, 1997) y la cantidad de glucosinolatos varía de una especie a otra e influye de manera directa el tipo de tejido de la planta.

Los glucosinolatos son hidrolizados por la enzima mirosinasa, fruto de esta fase se obtienen compuestos biológicamente activos entre los que se destacan isotiocianatos sulfuranos, nitrilos y tiocianatos, estos procesos dependen de las condiciones de reacción y la presencia de proteínas asociadas (Inis *et al.*, 2011). El proceso de hidrólisis ocurre en los glucosinolatos cuando el tejido del vegetal se rompe como consecuencia de un daño mecánico, entonces las enzimas tioglucosidasa o mirosinasa se pone en contacto con el sustrato y libera moléculas de glucosa, de bisulfato y de la correspondiente aglucona; posteriormente, esta última experimenta un acomodamiento (Olga N. *et al.*, 2009).

Las rutas de biosíntesis de los glucosinolatos comprenden procesos de elongación de la cadena de aminoácidos de proteínas. De igual manera, en el proceso biosintético de los glucosinolatos están implicadas tres etapas: etapa uno, alargamiento de aminoácido de cadena, etapa dos, formación de la estructura del núcleo y etapa tres, modificación secundaria del glucosinolato inicial (Sonderby *et al.*, 2010).

Dentro de cada especie en particular, el número de glucosinolatos es variable, existiendo especies con pocos glucosinolatos y otras con mayor cantidad y estos metabolitos se encuentran en diferentes concentraciones en función del estado fenológico de la planta y de la concentración de nutrientes como el azufre que está disponible para la planta (Mikkelsen *et al.*, 2002).

La molécula de los glucosinolatos está constituida por un grupo  $\beta$ -D-tioglucoído unido a una oxima sulfonada y a una cadena lateral (R) derivada de un aminoácido (metionina, valina, alanina, leucina, isoleucina, fenilalanina, tirosina o triptófano) como se muestra en la Figura 6 (Mikkelsen *et al.*, 2002).

La cadena lateral los clasifica en glucosinolatos alifáticos, aromáticos e indólicos dependiendo de su precursor biosintético, según sea metionina, fenilalanina o triptófano, respectivamente (Brown & Morra, 1995); (Palmieri *et al.*, 1998); (Lee *et al.*, 1999). A la vez determina las diferencias en las propiedades químicas, la actividad biológica y los productos de degradación (Gimsing & Kirkegaard, 2009).

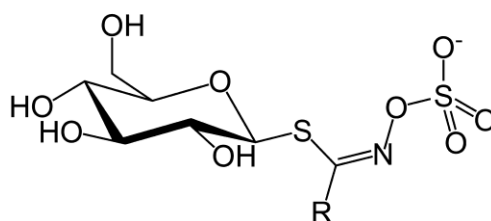


Figura 6. Estructura general de los glucosinolatos (Mikkelsen *et al.*, 2002).

La cantidad de glucosinolatos varía de una especie a otra e influye de manera directa el tipo de tejido de la planta según se observa en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Contenido de glucosinolatos en hortalizas del género *Brassica* (Verkerk *et al.*, 1997).

Hortalizas	Contenido de glucosinolatos( mg/g)
Col de Bruselas	0.60 – 3.90
Coliflor	0.61 – 1.14
Nabo	0.21 – 2.27
Rábano	0.42 – 1.19
Rábano picante	33.2 – 35.4
Mostaza	22.0 – 52.0.



Dentro de cada planta, hay glucosinolatos que son más abundantes en determinadas partes de la planta, como es el caso de la gluconasturtina, que se localiza preferentemente en las raíces, glucobrasicina en las hojas y la progoitrina en las semillas. La concentración en glucosinolatos varía también en función del estado fenológico de la planta y de la concentración de nutrientes (azufre en particular) disponibles por la planta (Jiracek *et al.*, 1974).

#### **4.7 Biosíntesis de los glucosinolatos**

Las rutas de biosíntesis de los glucosinolatos comprende procesos de elongación de la cadena de aminoácidos de proteínas, en los cuales la descarboxilación oxidativa de los aminoácidos a su correspondiente aldoxima, la conversión de la oxima en estructura básica de los glucosinolatos y sus modificaciones secundarias (Sixue *et al.*, 2001); de igual manera, en los procesos de biosíntesis de los glucosinolatos se incluyen una serie de pasos responsables de la formación de la estructura del núcleo, así como diversos procesos responsables de la cadena lateral y la otra la diversificación (Niels *et al.*, 2012).

La biosíntesis de los glucosinolatos son subconjuntos significativo de metabolitos especializados, sin embargo, en la degradación enzimática de estos, existe mucha diversidad, este proceso ocurre en las plantas intactas, pero la enzimología y reacciones involucradas son poco conocidos (Grubb *et al.*, 2006).

En el proceso biosintético de los glucosinolatos están implicadas tres etapas (Figura 7): primera, alargamiento de aminoácido de cadena; segunda, formación de la estructura del núcleo y tercera, modificación secundaria del glucosinolato inicial (Sonderby *et al.*, 2010), de igual manera, existen tres categorías de glucosinolatos: glucosinolatos de origen alifático derivados de metionina, glucosinolatos indol o indólico de fuente de triptófano, y glucosinolatos aromáticos formados a partir de fenilalanina (Yan y Chen 2007; Sonderby *et al.*, 2010), los glucosinolatos comparten una estructura de núcleo común de una  $\beta$ - D - tioglucosa grupo ligado a un resto aldoxima sulfonado.

La diversidad estructural de los glucosinolatos se puede atribuir a sus diferentes cadenas laterales y modificaciones (Yazhou, *et al.*, 2011).

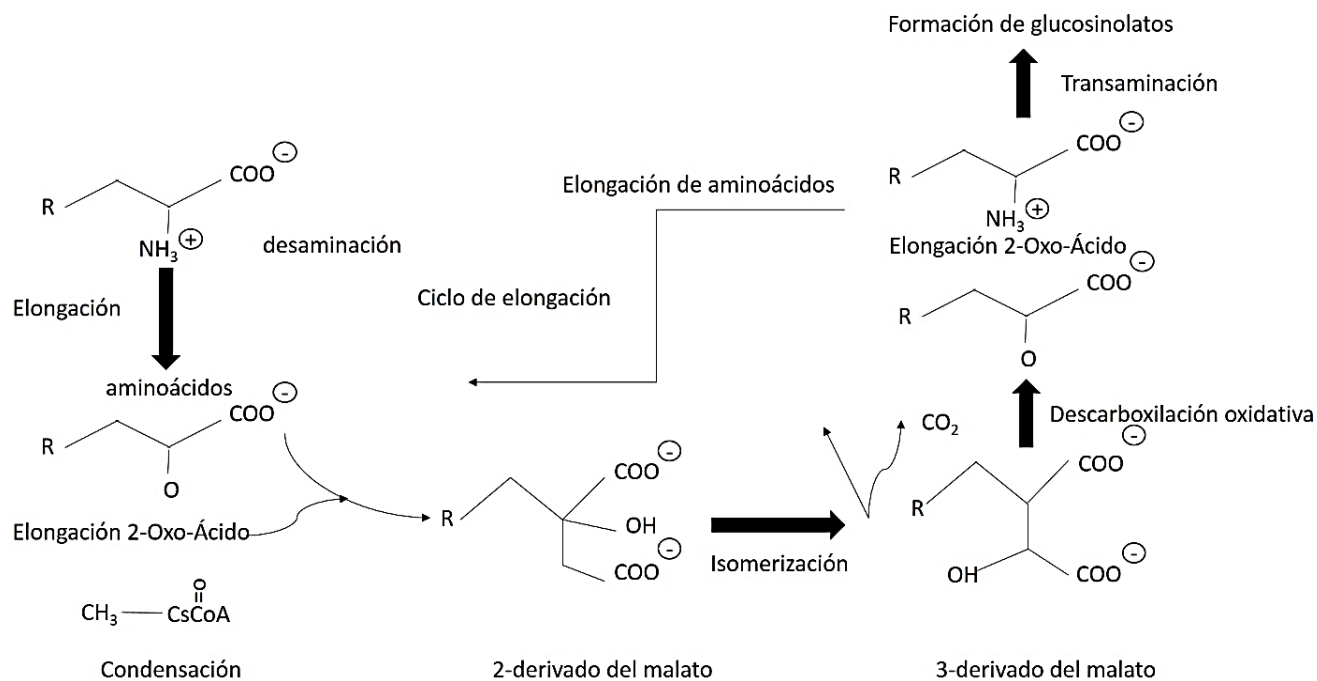


Figura 7. Ciclo de alargamiento de aminoácidos en la biosíntesis de glucosinolatos (Sonderby *et al.*, 2010).

Los glucósidos cianogénicos son grupos de metabólicos secundarios de las plantas y están relacionados directamente con los glucosinolatos. La conversión desde el aminoácido a aldoxíma es catalizada por el citocromo P450, que cataliza dos NADPH consecutivamente y O<sub>2</sub> dependientes de N-hidroxilaciones, lo que conlleva a la formación de N, N – dihidroxi aminoácidos que espontáneamente se deshidratan y descarboxila para rendir oximas (Sixue *et al.*, 2001).

Existen tipos de enzimas dependientes del citocromo P450 como son: Monooxigenasas, que contiene flavina y peroxidasas que se encuentran en la membrana plasmática son las encargadas de catalizar la conversión del aminoácido a aldoxíma (Bennett *et al.*, 1997).

Los microsomas aislados de *Sinapis alba*, *Tropaeolum majus* y *Carica papaya* fueron capaces de convertir los aminoácidos aromáticos fenilalanina y tirosina a sus correspondientes oximas. Las actividades fueron sometidas a la inhibición foto reversible monóxido de carbono, además de ser inhibida por los inhibidores del citocromo P450.

La flavina-monooxigenasas que contiene en la formación de aldoximas de homofenilalanina y derivados de metionina de cadena-alargada se ha caracterizado en una variedad de especies productora de glucosinolatos, pero sin proponer ningún mecanismo catalítico, en cuanto al sistema de peroxidasa de membrana plasmática se dice que es capaz de catalizar la conversión de triptófano en indol acetaldoxima proceso involucrado en glucosinolatos y posiblemente, la biosíntesis de aminoácidos (Sixue *et al.*, 2001).

Estudios realizados con plantas maduras de col china (*B. campestris ssp. pekinensis*), mostraron una correlación entre el perfil de glucosinolatos indol y la actividad peroxidasa en la membrana plasmática, este mecanismo implica la oxidación del nitrógeno del grupo amino por el peróxido de hidrógeno, seguido de des hidrogenación y descarboxilación (Ludwig *et al.*, 1990).

#### **4.8 Glucosinolatos en la defensa de las plantas**

La mirosinasa es considerada un sistema de defensa químico que se activa al daño en los tejidos de las plantas y actúa como primera barrera química para disuadir a un amplio espectro de patógenos (Koroleva *et al.*, 2000).

Los glucosinolatos que cumplen la función de defensa en las plantas son los tioglicósidos que son derivados del ácido amino (Nabamita *et al.*, 2013) y sus principales fuentes son las col de bruselas, repollo, brócoli y rábano, de igual manera existen otros compuestos que desempeñan un papel de defensa de muchas plantas, como son los glucósidos cianogénicos.

Los glucosinolatos se almacenan en la vacuola de la célula de la planta, cuando se presenta ataque de plagas, los glucosinolatos reaccionan con la enzima  $\beta$ -glucosidasa, liberando el hidrógeno tóxico cianhídrico (HCN) (Nabamita *et al.*, 2013).

El sistema binario Glucosinolato- $\beta$ -glucosidasa es similar al sistema de glucosinolatos-mirosinasa se muestra en la figura 8, en el cual ambos conjuntos de componentes son químicamente inertes cuando se separan, proporcionando plantas con una defensa inmediata contra intrusos herbívoros y patógenos, sin embargo el HCN puede ser letal para los seres humanos, con una dosis de 1,5mg/kg de peso corporal (Kermanshai *et al.*, 2001).

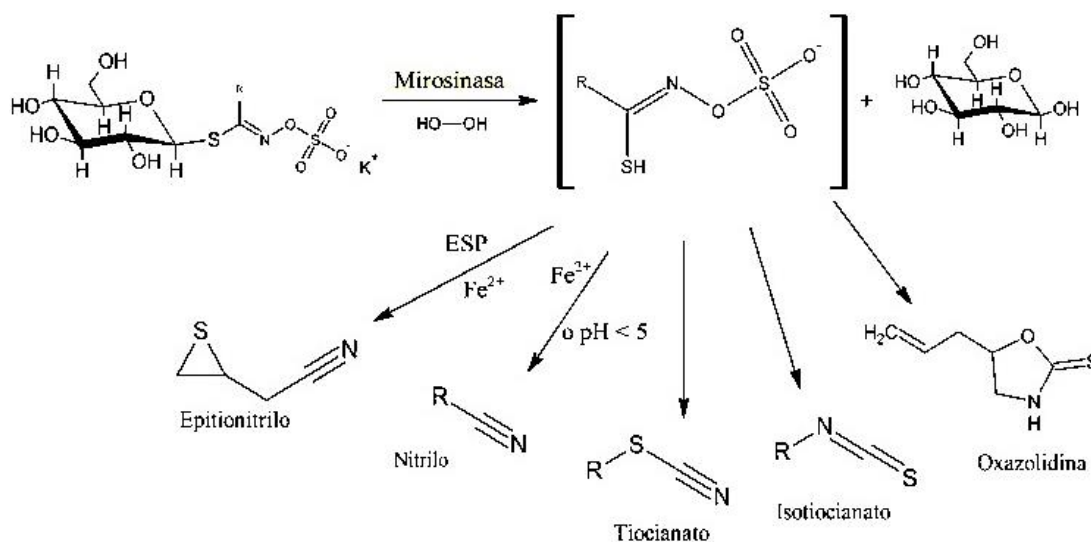


Figura 8. Complejo glucosinolatos- mirosinasa y sus diferentes derivados (Bones & Rossiter, 2006)

Los insectos que se alimentan del floema de productos de degradación glucosinolatos, actúan como aleloquímicos y desempeñan un papel en la defensa de las plantas, por ejemplo, isotiocianatos de origen natural poseen un rango de actividad antifúngica, antibacteriana y antimicrobiana, y por lo tanto repelen microorganismos e insectos (Sixue *et al.*, 2001).

Dado que la mirosinasa no solo es producida por las plantas, sino también por los insectos, los hongos y las bacterias, su actividad también se puede encontrar en el suelo (Gimsing, *et al.*, 2005), permitiendo el uso de plantas que contengan glucosinolatos como una fuente viable para el control de una amplia variedad de plagas y enfermedades de los cultivos, es decir, permite el uso de estos compuestos como biofumigantes reduciendo de esta manera el uso de pesticidas y el potencial contaminante asociado (Brown & Morra, 1995).

#### **4.9 Transporte de glucosinolatos en plantas**

Es importante destacar que los glucosinolatos sintetizados en las hojas maduras se cargan fácilmente y son transportados por el floema, junto con fotoasimilados en la corriente de translocación osmóticamente impulsado desde la fuente al sumidero (source-sink), además de la posible función nutritiva en caso de estrés ambiental, el transporte por el floema de glucosinolatos puede ayudar a la planta a defenderse contra los organismos que se alimentan de floema y también adquirir la capacidad para coordinar la síntesis y el uso de los recursos de protección entre los distintos órganos (Sixue *et al.*, 2001).

Los glucosinolatos se encuentran en todos los órganos de las crucíferas, pero la capacidad biosintética varía entre los órganos en diferentes etapas, por ejemplo la actividad biosintética es alta en las hojas jóvenes, brotes y paredes y disminuyen a medida que madura el tejido, sin embargo estudios demuestran que la actividades enzimática implicadas en la formación de oximas a partir de aminoácidos de cadena alargada y de la disminución de triptófano con la creciente madurez de las hojas, además de la reducción de los glucosinolatos podría ser debido a la degradación y translocación (Clossais *et al.*, 1991).

El producto de los metabolitos secundarios se transportan en las plantas, es el caso de la nicotina, la cafeína y la citoquinina que se producen en las raíces y son trasladadas a las hojas, y en el de los glucosinolatos para ser transportados activamente en las plantas es necesario altas cantidades de benzilglucosinato, producto que es sintetizado en las hojas (Sixue *et al.*, 2001), el análisis de perfil de glucosinolatos de las semillas y tejido de las

hojas de *B. napus* híbridos F1 de cruces recíprocos entre cv. Cobra y una línea sintética mostró que el perfil de los glucosinolatos alifáticos en la semilla era idéntico al perfil en las hojas de la matriz materna (Magrath *et al.*, 1993), por lo tanto, se puede afirmar que la biosíntesis de glucosinolatos y las diferentes interconversiones de glucosinolatos, hidroxilación o sulfatación, no se forman en el embrión y que los glucosinolatos completamente formados se transfieren a partir de tejido materno en las semillas en desarrollo (Sixue *et al.*, 2001).

#### **4.10 Elicitores o factores modificadores del metabolismo (FMM).**

Un elicitor o FMM vegetal es cualquier sustancia o microorganismo aplicado a las plantas con el objetivo de mejorar la eficiencia en la nutrición, tolerancia al estrés abiótico y / o rasgos de calidad de los cultivos, como puede ser (color, sabor, contenido en bioactivos) independientemente de su contenido de nutrientes. Los bioestimulantes pueden ser microorganismos beneficiosos, algas o incluso aminoácidos (\_Du Jardín, 2015).

#### **4.11 Tipos de Elicitores y su modo de acción.**

Las plantas pueden activar diferentes vías de defensa dependiendo del patógeno que se detecte, por ejemplo, el ácido jasmónico y las respuestas dependientes del etileno parecen iniciarse por hongos necrotróficos, mientras que las respuestas dependientes del ácido salicílico son activadas por patógenos biotróficos.

El conocimiento de las vías de señalización en plantas, ha permitido detectar diferentes compuestos naturales y sintéticos llamados FMM o elicitores capaces de inducir respuestas de defensa al igual que algún ataque por producido por patógenos o insectos. Por lo anterior, se han caracterizado diferentes tipos de bioestimulantes desde polímeros, polisacáridos, oligosacáridos, lípidos, glicopeptidos, glicoproteínas entre otras moléculas (Bautista y Bravo, 2012).

La activación de las vías de transducción de señales generalmente conducen a la producción de especies reactivas de oxígeno, biosíntesis de fitoalexinas, refuerzos en las paredes de las células vegetales asociados con compuestos de fenilpropanoides, deposiciones de calosa, síntesis de enzimas de defensa, y la acumulación de proteínas relacionadas con la patogénesis, algunas de los cuales poseen propiedades antimicrobianas (Farouk y Osman, 2011).

Las especies reactivas de oxígeno generan una respuesta hipersensible en plantas en las cuales se presenta una muerte rápida de algunas células en el sitio de infección, esto con el fin de contrarrestar el ataque por el patógeno y delimitar su avance. Seguido de esto la activación de la respuesta hipersensible en las partes donde aún no han sido infectadas, desarrollan resistencia a infecciones posteriores a este fenómeno se le conoce como sistema de respuesta adquirida, la cual es efectiva para diversos patógenos, incluyendo virus, bacterias, hongos e insectos (Du Jardín, 2015).

El termino bioestimulante o FMM, fue utilizado para moléculas capaces de inducir la producción de fitoalexinas, pero ahora son utilizados para estimular cualquier tipo de respuesta de defensa en las plantas y los ejemplos de estos se muestran en el Cuadro 2.

Cuadro 2. Lista de diferentes tipos de factores modificadores del metabolismo adaptación de Du Jardín, 2015.

<b>Tipos de factores modificadores del metabolismo y sus ejemplos</b>				
<b>FMM</b>	<b>Modo de acción</b>	<b>Tipo de inductor</b>	<b>Molécula</b>	<b>Ejemplo</b>
<b>Físico</b>	Heridas	Insectos		Mosca blanca, minador de la hoja, trip
		Animales		
		Humanos		
<b>Químico</b>		Estrés abiótico	Iones metálicos	Plomo, Estaño. Cadmio, arsénico.
			ROS	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
			HR	Ac. Salicílico

---

	Nutrientes		Ácidos Húmicos y fulvicos Sales minerales
Daños por levaduras,	Estrés biótico	polisacáridos	Oligosacáridos, manuronato, guluronato, galactoronidos
Micelio en las paredes celulares y esporas de hongos		Alginato, pectina y quitosan	manuronato, Quitina, guluronato, galactoronidos
	Péptidos glutación		proteínas Celulosa y oligandrin
	Lipopolisacaridos Glycoproteinas Compuestos volátiles		
Extractos			Extractos de algas marinas Extractos botánicos
Bacterias benéficas			<i>Bauveria bassiana</i> , <i>Basilus subtilis</i> , <i>Basilus thuringensis</i> ,
Hongos benéficos			Rhizobium Micorrizas, Ttrichoderma, Piriformospora

---



Por ejemplo, el ácido salicílico forma parte de un amplio grupo de compuestos sintetizados en plantas denominados fenólicos. Estos compuestos participan en muchas funciones metabólicas en plantas, como son la síntesis de lignina, actividad alelopática, y en algunos casos en la biosíntesis de compuestos relacionados a la defensa como las fitoalexinas (Vlot *et al.*, 2009).

El peróxido de hidrógeno debido a que puede atravesar la membrana vegetal, es capaz de actuar como molécula de señalización de una célula a otra participando en varias rutas (Sauceda, 2011). En dichas rutas participa como activador y desactivar de proteínas involucradas con transducción de señales para la expresión de genes relacionados con la tolerancia a diversos tipos de estrés incluyendo el estrés oxidativo, hídrico y derivado de patógenos (Mert, 2002).

El quitosan es un polisacárido compuesto por glucosaminas, esta molécula tiene potencial uso en la agricultura, ya que se emplea para el control de enfermedades debido a que inhibe el crecimiento y toxicidad de los hongos, además promueve la acumulación de fitoalexinas (El-Hadrami, *et al.*, 2010).

Efectos similares han sido observados con ciertos fertilizantes y mezclas a base de oligosacarinas que son oligosacáridos derivados de la pared celular de plantas y hongos que en concentraciones bajas presentan actividad biológica, estas se generan por hidrólisis enzimática de la pared celular y se cree que están involucradas en varios procesos de desarrollo en plantas (Vorwerk *et al.*, 2004).

Las oligosacarinas son reconocidas en la superficie celular por diferentes receptores, lo que resulta en la estimulación de distintas vías metabólicas y un incremento de la resistencia sistémica adquirida, aun cuando la planta no posea genes determinantes de la resistencia específica a cierto patógeno (Silipo *et al.*, 2010; Cameroni, 2013).

## 4.12 La biofumigación

La biofumigación se refiere a la eliminación de plagas y patógenos del suelo mediante el uso de compuestos volátiles, producto de la descomposición de materia orgánica. Ésta hace uso del sistema defensivo de los tejidos heridos de las plantas para el control de organismos fitopatógenos. Los beneficios que presenta esta alternativa están relacionados con su potencial para controlar diversos patógenos del suelo, cambiando simultáneamente las propiedades físicas y químicas, de tal manera que lo convierten en un medio favorable para el cultivo así como el ser una práctica agrícola de bajo costo y fácil acceso, especialmente de los pequeños productores (Franco- Navarro *et al.* 2002).

El uso de la biofumigación con diferentes enmiendas orgánicas ha dado resultados efectivos en el control de patógenos en el suelo. Arnault *et al.* (2008) obtuvo resultados prometedores en el control de nemátodos con el uso de los residuos de cebolla en el proceso de desinfección del suelo.

La actividad biosida la atribuyó a las sustancias dimetil disulfuro, dipropil disulfuro y dialilo disulfuro. Kirkegaard *et al.* (2008) usaron residuos de mostaza y rábanos para pruebas de biofumigación y encontraron respuesta positiva en la reducción de la población de los patógenos *Ralstonia solanacearum* y *Meloidogyne arenaria*. El efecto biosida se le atribuyó a la formación de isotiocianatos en el proceso de descomposición de los residuos.

En general en el proceso de descomposición de la materia orgánica se liberan sustancias orgánicas que tienen efecto biosida, entre ellas amoníaco, nitratos, sulfuro de hidrógeno, ácidos orgánicos, sustancias orgánicas volátiles, enzimas, fenoles, etc. (Barres *et al.*, 2006).

En el caso de las *Brassicas*, es un término que describe la utilización de isotiocianatos tóxicos que existen naturalmente, obtenidos como productos de la hidrólisis de los glucosinolatos presentes en las plantas o productos vegetales aplicados al suelo. Este proceso puede lograrse incorporando materiales frescos o secos y/o harina de semillas y se favorece

por la disrupción celular, la adición de agua y las altas temperaturas en el suelo. El uso de rotación de cultivos donde se incluyan las Brassicas también puede ser considerado biofumigación (Gimsing & Kirkegaard, 2006; Gimsing, *et al.*, 2005; Nastruzzi *et al.*, 1996; Poulsen, *et al.*, 2008).

La aplicación de residuos de *Brassica carinata* en dosis de 10 kg m<sup>-2</sup> en el cultivo de fresa fue efectiva para el control de *Phytophthora cactorum*. El destino de los glucosinolatos en el suelo es determinado por su elevada solubilidad y la pérdida de grupos funcionales que pueden interactuar con la superficie reactiva del suelo. Los glucosinolatos se adsorben débilmente en todos los tipos de suelo y se degradan microbiológicamente. Por lo tanto, los liberados de la planta son altamente móviles en el suelo y por ende tendrán elevada bio-disponibilidad. Las principales rutas de producción y pérdidas de glucosinolatos se muestran en la Figura 9 (Gimsing y Kirkegaard, 2009).

En contraste, los isotiocianatos son fuertemente adsorbidos por la materia orgánica del suelo, reaccionando fuertemente con los grupos nucleofílicos presentes; sin embargo, son propensos a pérdidas por la volatilización, degradación microbiana y mineralización.

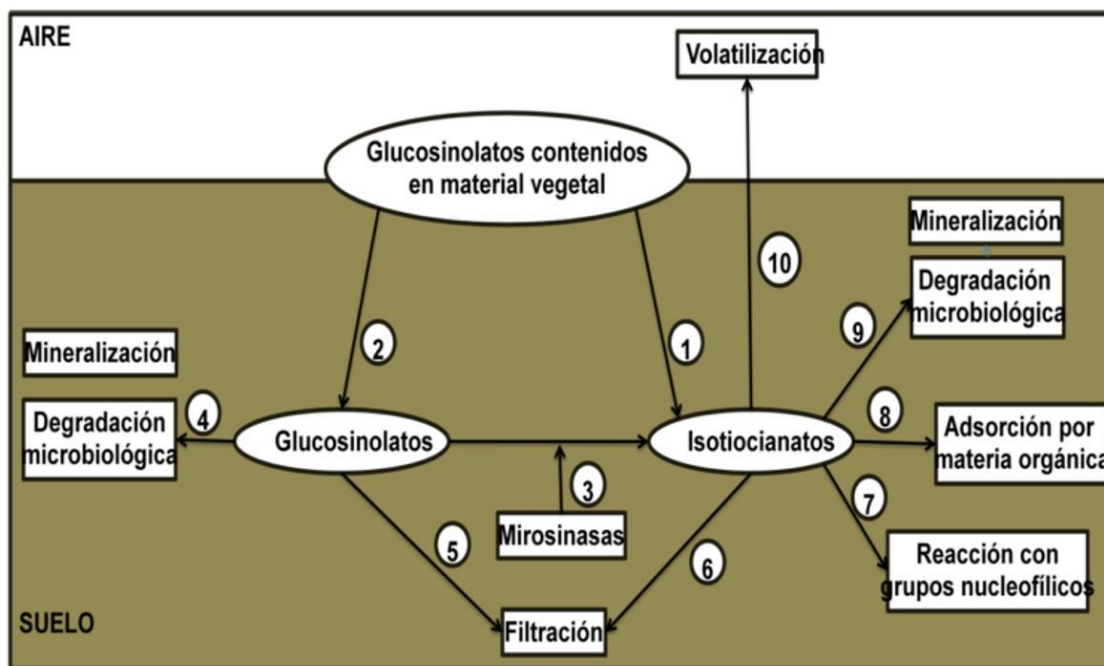


Figura 9. Destino de los glucosinolatos e isotiocianatos en el suelo (Gimsing y Kirkegaard, 2009).

Cuando los materiales incorporados al suelo para biofumigar son tejidos de brassicas, entre los productos de la degradación de los mismos, se liberan unos compuestos denominados glucosinolatos. Los isotiocianatos y otros compuestos volátiles derivados de los glucosinolatos realizan un papel muy importante en la supresión rápida (< 10 días) de patógenos. En diferentes ensayos, enmiendas con residuos de boniato, papa, espinaca, tomate y sorgo fueron en algunos casos tan efectivos como los residuos de brassicas, por lo que numerosos autores suponen que el aporte de materia orgánica sobre la comunidad microbiana puede favorecer la aparición de antagonistas y contribuir a la reducción de la población de patógenos (Morra y Kirkegaard, 2002).

## **V. Hipótesis y objetivos**

### **5.1 Hipótesis**

La aplicación de los FMM ácido salicílico, quitosan, peróxido de hidrogeno y el oligosacárido XH®, incrementan los niveles de glucosinolatos en *Sinapis Alba L*, cultivada bajo invernadero, debido a su capacidad de generar respuestas inducidas de resistencia, y el material vegetal puede ser utilizado para la biofumigación.

### **5.2 Objetivo General**

Incrementar la producción de glucosinolatos en diferentes órganos de la planta de mostaza blanca (*Sinapis Alba L*), mediante el uso de FMM y evaluar estas plantas como material para uso en biofumigación de suelo.

### **5.3 Objetivos específicos**

- Determinar el tratamiento adecuado de FMM en mostaza para incrementar glucosinolatos bajo condiciones de invernadero.
- Cuantificar la concentración de glucosinolatos totales en los diferentes órganos de plantas muestreadas.
- Determinar cambios en niveles de metilación del DNA (CpG) global en plantas de mostaza tratadas o no con FMM.
- Evaluar plantas de mostaza elicidadas o no en la biofumigación en suelo contaminado con *Fusarium oxysporum*.

## **VI. Materiales y métodos**

### **6.1 Localización del estudio**

El presente experimento se desarrolló en el Campus Amazcala de la Facultad de Ingeniería de la Universidad Autónoma de Querétaro. El Campus se encuentra en la comunidad de Amazcala en el municipio del Marqués, Qro., el cual se localiza en el sector Suroeste del estado, ubicada entre las coordenadas  $20^{\circ} 31'$  y  $20^{\circ} 58'$  de latitud Norte. Su longitud se encuentra entre los  $100^{\circ} 09'$  y los  $100^{\circ} 24'$  del Oeste a 1,850 m sobre el nivel del mar.

### **6.2 Características del invernadero**

El invernadero en el cual se llevó a cabo la experimentación es tipo español (figura 10) con paredes rectas de policarbonato y techo de plástico tricapa con una difusión del 10% de 800 galgas de espesor, el invernadero está completamente automatizado con control de variables como humedad relativa, temperatura, radiación y riego. Cuenta con una ventana cenital cubierta con malla antiafidos blanca, un extractor, dos ventiladores, un calefactor y una pantalla térmica, el invernadero tiene las siguientes medidas, 50 metros de largo por 10 metros de ancho y 5 metros de altura.



Figura 10. Invernadero tipo español de la facultad de ingeniería campus Amazcala

### 6.3 Preparación del invernadero

El invernadero se limpió y se desinfectaron los pasillos con cloro para evitar cualquier patógeno, se colocaron canaletas plásticas sobre las camas, como se muestra en la Figura 11.



Figura 11. Tubería blanca para calefacción

### 6.4 Sistema de riego

El sistema de riego que se utilizó fue por goteo con manguera ciega de 16 mm con goteros de 8 l/h con distribuidor de una salidas insertado en el gotero, un tubin y una estaca de flujo de 2 l/h, al final. Se colocara un gotero por planta como se muestra en la Figura 12.



Figura 12. Sistema de riego para planta de mostaza.

## 6.5 Material vegetal

Se utilizó mostaza blanca (*Sinapis alba* L) proveniente de china variedad Sichuan (Figura 13). Es una planta anual que alcanza un tamaño de hasta 75 cm de altura, erecta, ramificada, la semilla es proveniente de china.



Figura 13. Mostaza blanca variedad Sichuan.

## 6.6 Germinación

La germinación de la mostaza se realizó en charolas de poliestireno de 200 cavidades Figura 14a, se utilizó como sustrato una mezcla profesional Sunshine No 3 a base de musgo. Primero se hizo una desinfección de charolas con sales cuaternarias a una dosis de 10 ml/litro de agua, posteriormente el sustrato se puso en capacidad de campo agregando agua con un pH de 5.5.

Una vez hecho esto se llenaron las charolas con el sustrato humedecido y se sembraron la semilla a una distancia de 0.5 mm para no enterrar demasiado la semilla y favorecer la germinación.



Después de esto se metieron a una cámara de germinación con la que cuenta la facultad de Ingeniería en el campus Amazcala, la cual se mantuvieron en condiciones constantes de humedad al 70% y temperatura a 29°C durante el periodo de germinación.

Ya que se apreció la plúmula de las primeras semillas, se llevaron a un invernadero de plántula en el cual se cuidaron y se regaron diariamente, al inicio se regaron solo con agua de pH 5.5, posteriormente se utilizó una solución nutritiva con una conductividad de 1.5 y pH de 5.5, hasta tener un tamaño ideal para el trasplante esto es cuando presentó de 3 a 4 hojas verdaderas figura 14b.



Figura 14a. Charola de 200 cavidades sembradas con mostaza. 14b. planta de mostaza lista para trasplante con 3 hojas verdaderas.

## 6.7 Trasplante

El trasplante se hizo en bolsas de diez litros llenas de sustrato, el sustrato utilizado fue tezontle, el cual se cribó para obtener una granulometría de 0.5 a 2 mm, las bolsas se colocaron a una distancia de 10 cm. Se utilizó una densidad de siembra de 2 plantas por metro cuadrado. Para tener una buena ventilación y sanidad de las plantas (Figura 15).



Figura 15. Trasplante de mostaza en tezontle.

## 6.8 Diseño de experimentos

El diseño experimental fue en bloques completamente al azar con 6 repeticiones, 10 plantas por unidad experimental, 2 niveles por elicitador: para el ácido salicílico 0.1 mM y 10 mM, para el peróxido de hidrógeno 200 mM y de 400 mM, para Quitosan 10 mg/ml y 100 mg/ml, para el Oligosacárido XH® 0.6 ppm y 6 ppm. Las plantas control se trataron solamente con agua destilada los tratamientos se muestran en el Cuadro 3.

Los tratamientos se aplicaron de manera foliar después del trasplante y durante todo el ciclo de cultivo.

Los datos fueron analizados con el programa Graphpad prism 6 y se les aplicó una prueba de ANOVA para ver si existían diferencias significativas, y posteriormente se realizó una prueba estadística de Dunnett para comparar todos los tratamientos con el control.

Cuadro 3. Tratamientos y dosis de los FMM utilizados

<b>DISEÑO DE EXPERIMENTOS</b>		
<b>TRATAMIENTO</b>	<b>VARIABLE</b>	<b>CONCENTRACIÓN</b>
<b>T1</b>	AC. SAL	0.1 mM
<b>T2</b>		1 mM
<b>T3</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	200 mM
<b>T4</b>		400 mM
<b>T5</b>	QUITOSAN	10 mg/ml
<b>T6</b>		100 mg/ml
<b>T7</b>	OLIGOSACÁRIDO	6 ppm
<b>T8</b>		0.6 ppm
<b>Control</b>	AGUA DESTILADA	

## **6.9 Determinación de glucosinolatos mediante espectrofotometría**

Con base en el método de Jezek *et al.* (1999), la muestra se cosechó e inmediatamente se colocó en nitrógeno líquido, para evitar que actúe la enzima mirosinasa. Se molió en un mortero sin dejar que la muestra se descongelara una vez hecho esto se llevó a cabo el siguiente procedimiento:

Se pesaron 50 mg de muestra, en una balanza analítica marca Sartorius (Figura 16), se le adicionan 7.5 mL de buffer de acetato (0.2 M; pH 4.2). El buffer se mantiene a

ebullición en baño maría, se pesa la muestra y enseguida se le vacía a la muestra, para evitar acción de la enzima.



Figura 16. Pesado de muestra en balanza analítica.

Esta mezcla se mantuvo a ebullición (en baño maría) durante 15 minutos con agitación se colocó una gradilla de unisel para que los tubos Falcon no se hundieran, una vez realizada esta acción se dejó enfriar 5 minutos, y se adiciona 1.5 mL de acetato de plomo y bario (0.5 M) y 0.4 g de polivinilpolipirrolidona (PVPP), la muestra se mantuvo en agitación orbital durante 15 minutos, sin calentamiento en un agitador marca Orbit. Posteriormente se adicionaron 1.5 ml de sulfato de sodio 2 M y se centrifuga a 8 000 rpm durante 10 minutos

Se extrajeron 1.5 ml del sobrenadante y se mezclaron con 1.5 ml de NaOH 2M y se incubó a temperatura ambiente durante 30 minutos, pasado el tiempo se adicionó 1 parte de HCl concentrado por 13 partes de solución alcalina, es decir se agregaron 3 ml de NAOH se divide entre 13 y lo que se agregó de ácido fue 230.7  $\mu$ L

Esta mezcla se centrifuga a 8 000 rpm durante 6 minutos y el sobrenadante se cargó en las placas de 96 pozos y se le agrego ferrocianuro 2Mm en relación 1:2 que se prepara en buffer de fosfato (0.2 M y pH de 7).

Esto se realizó a un lado del espectrofotómetro de placa Thermo scientific multiskan 60, se incubaban las muestras durante no más de 15 segundos, se agitó en el espectro a 420 nm con el buffer de fosfato (0.2 M, pH7) como blanco, se realiza un blanco 2, que consta del extracto hidrolizado y fosfato (0.2 M, pH7) en relación 1:1.

Para la construcción de la curva de calibración se utilizó el patrón sinalbina  $5.60 \times 10^{-3}$  M y se hicieron diluciones de 0 a 90  $\mu$ l de solución. Las medidas se hicieron sobre cada réplica. Con los datos del espectrofotómetro se ajustó un modelo de regresión, para determinar la concentración de los glucosinolatos obtenidos de las diferentes partes de la mostaza. Se realizó una curva de sinalbina de (0.125 mM-1mM) en NaOH (1 M), una vez obtenidos los datos se utiliza la Ecuación 1 para obtener el contenido de glucosinolatos.

$$c = \frac{\Delta OD - \text{intercepción}}{\text{pendiente}} * \frac{V_d}{m}$$

Ecuación 1. Fórmula para determinar la cantidad de glucosinolatos totales.

## 6.10 Determinación de Metilación Global de DNA

Se recolectó tejido de las plantas de mostaza de todos los tratamientos, una vez que se les aplicaron los FMM por 15 días. Fueron congeladas en nitrógeno líquido y posteriormente se almacenaron a  $-80^{\circ}\text{C}$ . Se llevó a cabo extracción de ADN genómico de la siguiente manera: Se molieron en un mortero usando nitrógeno líquido, hasta obtener un polvo fino, se tomaron 100 mg de cada muestra tratada y después se mezclaron con 750  $\mu$ l de buffer CTAB.

Las muestras fueron sometidas a vortex y se incubaron durante 5 min a temperatura ambiente. A continuación, se añadieron 750  $\mu$ l de cloroformo: alcohol isoamílico en una concentración (24:1) seguido por vortex y una centrifugación a 12.000 RPM durante 5 min a  $4^{\circ}\text{C}$ . La capa superior o fase acuosa se eliminó con ayuda de una micro pipeta, se transfirió a un nuevo tubo cónico de polipropileno y se mezcló con 2/3 de su volumen de isopropanol al 100% y 1/10 de su volumen de acetato sódico 5 M.

Después de una incubación de 10 min a temperatura ambiente, las muestras se centrifugaron a 12.000 RPM durante 5 min a 4°C. A continuación, el sobrenadante se desechó y el sedimento de ADN obtenido se lavó con 1 ml de etanol enfriado al 70% y se sometió a vortex suave. Las muestras se centrifugaron de nuevo a 7.500 RPM durante 5 minutos a 4°C y el sobrenadante se desechó.

Las pastillas se secaron al aire y se re suspendieron en 50 µl de agua destilada tratada con DEPC. El ensayo de porcentaje de metilación se llevó a cabo siguiendo el protocolo incluido en el manual de instrucciones del Kit de ELISA de ADN de 5 mC de ZYMO RESEARCH, que funciona básicamente detectando y cuantificando 5-metilcitosina en las muestras de ADN mediante un anticuerpo monoclonal (Anti-5-Metilcitosina). La relación de la densidad de dinucleótidos CpG / longitud del genoma utilizada fue aquel para *Arabidopsis thaliana*, 0,022, dando una diferencia de pliegue de 3,409. Este kit solo detecta metilación del DNA en el dinucleotido CpG, y no en CpHG o CpHH, que también son sitios de metilación de DNA reportados en plantas.

## **6.11 Prueba de biofumigación**

Se elaboraron cajas de madera para siembra de 30 cm de altura x 30 cm de ancho x 50 cm de largo, las cuales se forraron con bolsas de plástico negras como se muestra en la Figura 17, posteriormente se agregó el suelo infectado con *Fusarium oxysporum*, se regaron todas las cajas a capacidad de campo en las cajas donde llevarían productos comerciales se aplicó una vez humedecido el suelo en un 80%, en las cajas donde llevaría tratamiento con mostaza se pusieron plántulas de mostaza, el estiércol utilizado era fresco, en todos los tratamiento se llevó a cabo el monitoreo de la temperatura, los tratamientos se muestran en el cuadro 4.



Figura 17. Cajas forradas de plástico negro para prueba de biofumigación.

Cuadro 4. Tratamientos para la prueba de biofumigación.

Tratamiento	Descripción
<b>Control</b>	Tierra infectada con <i>Fusarium oxysporum</i>
<b>T1</b>	Metan sodio 3000 ppm
<b>T2</b>	Dióxido de cloro
<b>T3</b>	Mostaza sin elicitar con estiércol
<b>T4</b>	Mostaza elicitada con estiércol
<b>T5</b>	Mostaza sin elicitar
<b>T6</b>	Mostaza elicitada

Para el T1 se aplicó metam sodio a una dosis de 3000 ppm dosis sugerida por el fabricante, se cubrió con plástico y se dejó por 40 días posteriormente se extrajeron las muestras y se siguió el procedimiento de incubación y conteo.

Para el T2 se aplicó Dióxido de cloro en una dosis de 400 ppm dosis sugerida por el fabricante y también se dejó durante 40 días, se cubrieron con plástico.

El T3 se trasplanto mostaza en las cajas como se muestra en la Figura 18 una vez que la mostaza cumplió 60 ddt se cortaron a ras de suelo y se incorporaron 250 gr de materia verde de mostaza y 500g de estiércol fresco y se humedeció a capacidad de campo, posteriormente se cubrieron con un plástico.



Figura 18 Mostaza trasplantada en cajas de madera.

El T4 se realizó el trasplante sin embargo se comenzó a aplicar el FMM en este caso se seleccionó el que mayor aumento de glucosinolatos dio en la prueba anterior, el cual fue el quitosan a una concentración de 100 mg/ml esto se realizó una vez por semana durante 60 días y posteriormente se incorporaron 250 gr de materia verde de mostaza y 500 gr de estiércol fresco se humedeció a capacidad de campo y se cubrieron con un plástico como se muestra en la Figura 19.





Figura 19. Cajas cubiertas con plástico, en donde se muestra el termómetro para monitoreo

El tratamiento 5 y 6 se trasplanto la mostaza y se dejó crecer durante 60 días posteriormente se incorporaron 250 gramos de materia verde y se cubrieron con plástico en el caso del T6 se aplicó quitosan como en el caso del tratamiento cuatro una vez por semana durante 60 días.

Para la recolección de muestra, se colecta una muestra de suelo entre los primeros 30 cm de profundidad se almacenaron en bolsas de papel y se dejaron secar en condiciones asépticas por 24 horas al aire.

Una vez realizado esto el suelo se molió en un mortero y se pesó 1 gr de suelo y se colocaron en 9 ml de agua estéril, se agito vigorosamente para obtener una suspensión homogénea. Posteriormente se la suspensión de suelo se diluyo de la siguiente manera 1:100. (900  $\mu$ l de agua estéril y 100  $\mu$ l de la solución de suelo = 1 ml).

Se pipeteo para homogenizar la solución y se diluyo el ml de la suspensión en 4 placas de Petri con medio PDA al 25% (16 gr de agar bacteriológico y 10 gr de PDA para 1 L acidificado), adicionado con estreptomycinina y cefalotina, para inhibir el crecimiento de bacterias.

Una vez repartido en las cajas Petri se distribuyó con una varilla de vidrio lo más uniforme posible y se dejó alrededor de 30 minutos para retirar el exceso de agua. Se incubaron a temperatura ambiente durante 72 h para el conteo de UFC el crecimiento del hongo se muestra en la Figura 20.

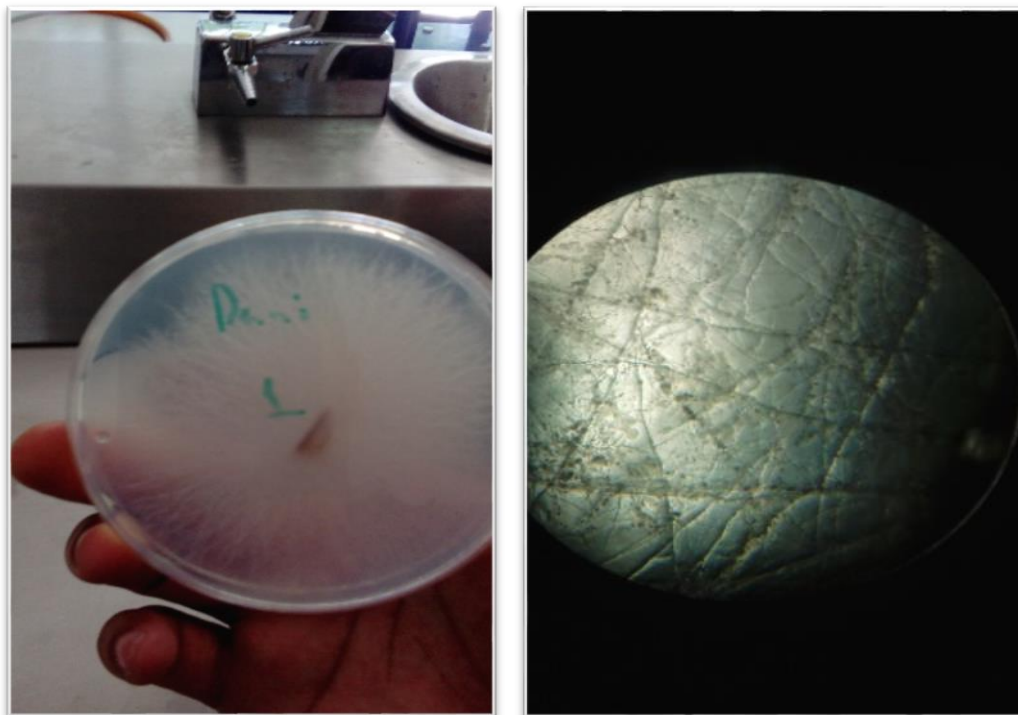


Figura 20. Crecimiento de hongo *Fusarium Oxysporum* y vista del hongo en microscopio con objetivo de 40x.

Se tiñó el hongo con azul de lacto fenol como se muestra en la Figura 21.

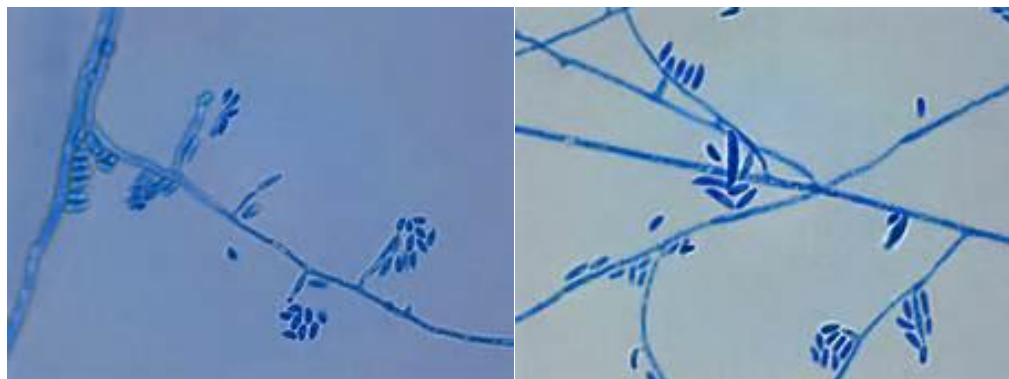


Figura 21. Tinción de *fusarium oxysporum* con azul de lacto fenol.

## **6.12 Bioseguridad y ética**

Las sustancias y el material vegetal utilizadas durante la investigación no representan ningún peligro para el medio ambiente, sin embargo los desechos serán utilizados para incorporarlos al suelo y realizar una biofumigación, de esta manera los desechos de las plantas se integraran a la materia orgánica del suelo. Cabe mencionar que no se utilizaran plantas que estén en peligro de extinción o que se encuentren en riesgo como lo marca en la NOM-059-SEMARNAT-2010.

En cuanto a la seguridad de los trabajadores que apoyen en la investigación se tendrá el manejo del invernadero de acuerdo al manual de prácticas seguras para el sector agrícola, específicamente para la construcción, equipamiento y operación de invernaderos. Se brindara al personal el equipo de protección, guantes, cofia, mascarillas y mandiles para que lleven a cabo la preparación de soluciones nutritivas, se capacitara a los trabajadores para que sepan llevara a cabo el manejo se sustancias peligrosas como lo son los ácidos utilizados para la nutrición y puedan contener un derrame. Se trabajara bajo la NOM-007-STPS-2000 para brindarle al trabajador el equipo de seguridad correspondiente, por último no se generaran residuos tóxicos ni dañinos para el medio ambiente o para la comunidad en la cual se llevara a cabo el experimento.

## VII. Resultados y discusiones

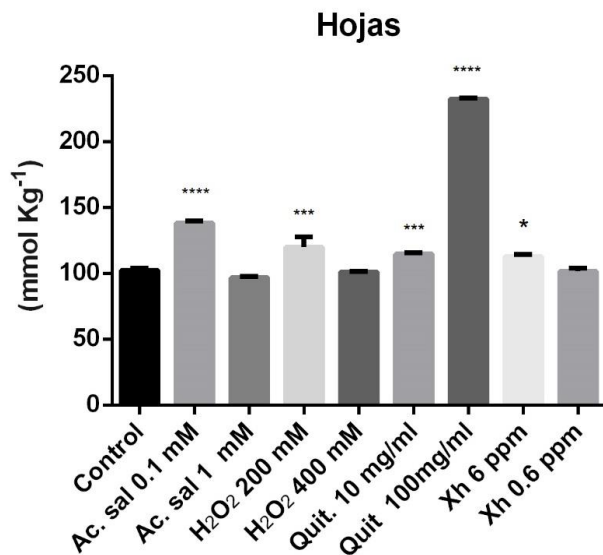
### 7.1 Resultados de niveles de glucosinolatos

El análisis estadístico se llevó a cabo con ayuda del programa Graph Prism versión 6, y se realizó primero una prueba de ANOVA con el 95% de confianza para determinar si existían diferencias significativas entre tratamientos una vez realizado este análisis se realizó una prueba de Dunnett para comparar todos los tratamientos con el control.

En el análisis que se realizó para los datos obtenidos en la hoja de la planta de mostaza (

Figura 22) se mostraron diferencias significativas para los tratamientos con Ac. Salicílico 0.1 mM, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 200 mM, Quitosan 10 mg/ml y para el Oligosacarido Xh 6ppm, los incrementos se muestran en el cuadro 5, sin embargo para el tratamiento 6, en el cual se le aplicó una dosis de 100 mg/ml de Quitosan el incremento fue del 126% con respecto del control.

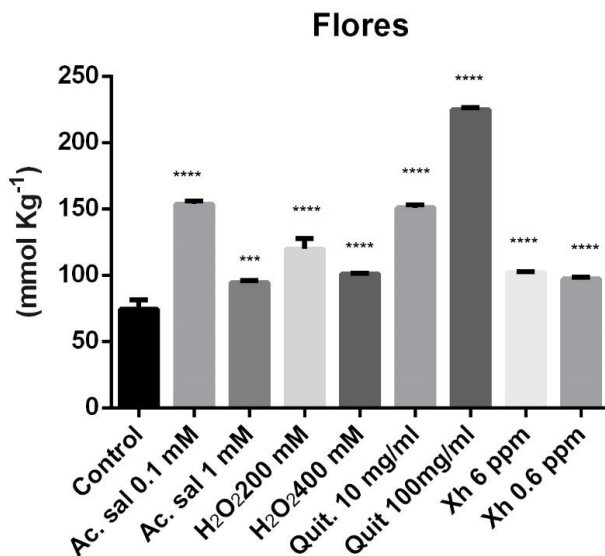
Esto pudiera deberse a que el Quitosan activa las enzimas fenilalanil amonioliasa (PAL) y tirosina amonioliasa (TAL) en las hojas, esto de acuerdo a lo reportado por Khan *et al.* en el 2003, además el quitosan genera la síntesis de ROS de acuerdo a Caiyan *et al.* en 2011, y debido a que la fenilalanina y la tirosina son aminoácidos precursores de los glucosinolatos es posible que el aumento en este órgano de la planta sea significativamente incrementado.



\*\*\*\* P<0.0001, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 de acuerdo al a prueba de Dunnett

Figura 22. Concentración de glucosinolatos totales en hoja de mostaza blanca

En la Figura 23 se muestran los resultados obtenidos sobre la concentración de glucosinolatos totales en flores de mostaza blanca. En la cual se muestra que para todos los tratamientos existen diferencias significativas y se mostraron incrementos estos se muestran en el Cuadro 5.



\*\*\*\* P<0.0001, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 de acuerdo al a prueba de Dunnett

Figura 23. Concentración de glucosinolatos totales en flores de mostaza blanca

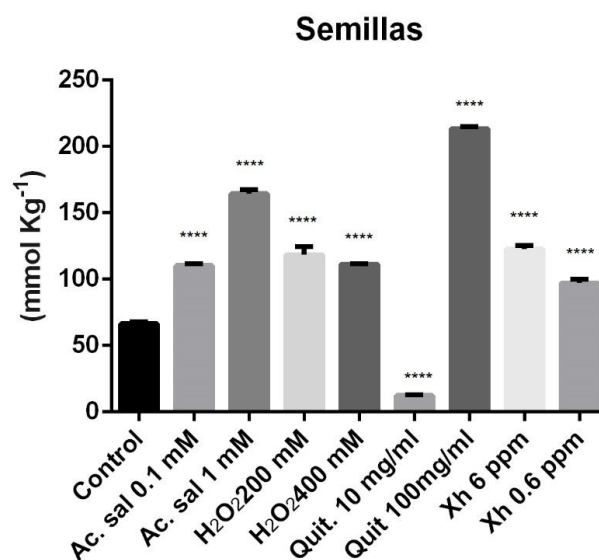
Los resultados mostrados en el cuadro anterior que la planta responde a los FMM y enciende su mecanismo de defensa, ya que detecta el ataque por distintas vías y la planta prende las diferentes cascadas de señalización para la generación de estos compuestos, sin embargo en el tratamiento 6 al cual se aplica quitosan vuelve a ser el que presenta mayor significancia y un incremento del 202% en comparación con el control, esto puede deberse a que el quitosan es detectado por la planta como un ataque producido por algún hongo y ya que la quitina está ampliamente distribuida en hongos Basidiomicetos, Ascomicetos, Zigomiceto y Ficomicetos (Becerra-Jimenez *et al.* 2011).

Se encuentra en la pared celular del micelio, esporas y tallo, la concentración de quitina en la pared celular depende de su fisiología, medio ambiente y condiciones de fermentación, por lo tanto, las características químicas de la pared celular fúngica han llevado a estudiar esta fuente alterna para la producción del derivado funcional de la quitina que es el quitosán (Mejia-Teniente *et al.* 2014). Por lo que la planta lo detecta y prende el sistema inmunológico de la planta generando glucosinolatos para su protección ya que tiene los glucosinolatos tienen propiedades anti fúngicas y anti bacteriales. Los resultados anteriores coinciden de los resultados mostrados por Bohinc, *et al.* (2013) en el que la cantidad de glucosinolatos de diferentes tipos de *brassicas* y en la que el aumento que tienen cuando se expone a un estrés biótico, como las picaduras de un insecto, no mostraron diferencias significativas entre el contenido de hojas y flores ( $P = 0,3544$ ,  $F = 0,3544$ ,  $Df = 3$ ).

Para el caso de los glucosinolatos totales presentes en las semillas de mostaza blanca, se muestran los datos en la figura 24, en la cual se observa que para todos los tratamientos existen diferencias significativas con respecto al control. Dichas diferencias y porcentajes de incremento se muestran en el cuadro 5.

Sin embargo nuevamente para el tratamiento 6 el cual se le aplico Quitosan en una dosis de 100 mg/ml, se presenta un incremento del 221% lo cual se debe a que el Quitosan, favorece la acumulación de fitoalexinas y metabolitos especializados en vainas de chícharo por lo que se puede tener una respuesta parecida en las vainas o silicuas de

mostaza en las cuales se encuentran las semillas. Esto va de la mano con lo que se demostró en el trabajo realizado por Rungfang *et al.* (2013), en el cual las semillas bioestimuladas de *Arabidopsis thaliana* tienen un aumento significativo en la cantidad de glucosinolatos.



\*\*\*\* P<0.0001, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 de acuerdo al a prueba de Dunnett

Figura 24. Concentración de glucosinolatos totales en semillas de mostaza blanca.

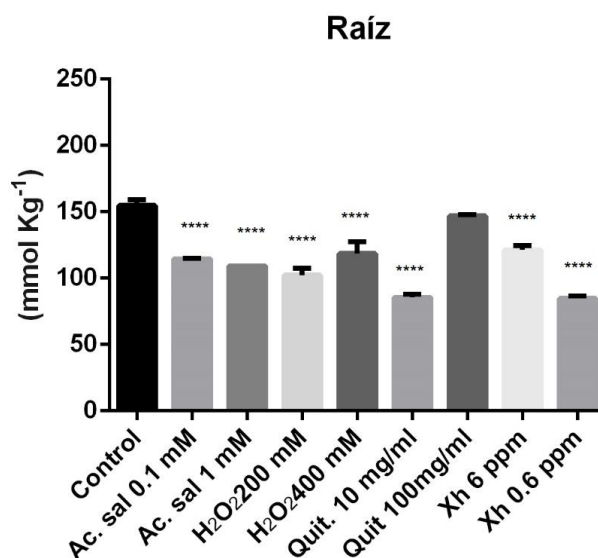
Cuadro 5. Porcentajes de incremento de glucosinolatos totales en flores de mostaza blanca con respecto al control.

Tratamiento	Concentración	Incremento de niveles en flor (%)	Incremento de niveles en semilla (%)	Incremento de niveles en Hoja (%)
<b>T1</b>	Ac. Salicílico 0.1 mM	106	65	35
<b>T2</b>	Ac. Salicílico 1 mM	27	147	
<b>T3</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 200mM	32	78	17
<b>T4</b>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> 400mM	31	67	
<b>T5</b>	Quitosan 10mg/ml	102	81	11
<b>T6</b>	Quitosan 100mg/ml	202	221	126
<b>T7</b>	Oligosacarido Xh 6 ppm	36	84	10
<b>T8</b>	Oligosacarido Xh 0.6 ppm	30	46	

La concentración de glucosinolatos totales para cada uno de los tratamientos presentes en la raíz de mostaza blanca se muestra en la Figura 1

Figura 25. En la cual existen diferencias significativas en todos los tratamientos a excepción del tratamiento 6 al cual se le aplico Quitosan a una concentración de 100 mg/ml en la cual no hubo diferencias significativas, sin embargo en esta ocasión lo que se obtuvo en los tratamientos es un decremento en la concentración de glucosinolatos con respecto al control.

Esto pudiera deberse principalmente a la gran diversidad de estrategias que usan las plantas para activar los mecanismos de protección. Las propias plantas aprovechan todos sus órganos constituyentes para activar estos mecanismos y transmitir información a su entorno, que son específicos de cada órgano, y éstos al mismo tiempo, son los que definirán el tipo de información transmitida respectivamente. (Dudareva y Negre, 2005; Nguyen, 2003).



\*\*\*\* P<0.0001, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 de acuerdo al a prueba de Dunnett

Figura 25. Concentración de glucosinolatos totales en raíz de mostaza blanca

Por lo tanto, los mecanismos que pueden activarse en los órganos reproductores, como la emisión de compuestos volátiles, pueden ser muy diferentes de los activados o acumulados en la raíz.



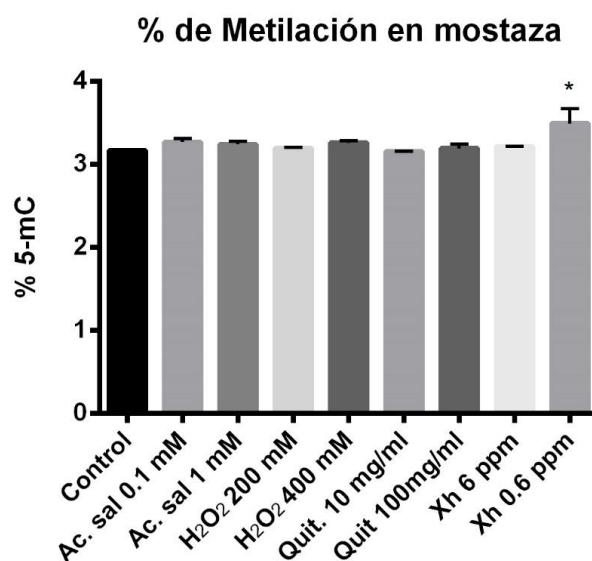
La exudación de la raíz de la planta representa varios mecanismos de defensa de tipo químico presentes en la planta, donde la manifestación en cada uno de los procesos involucrados está representada por los compuestos químicos, generalmente los metabolitos especializados, responsables de transportar la información que en ese momento es vital para la supervivencia de la planta.

Es esta propiedad dada de las plantas una alta capacidad de adaptación y resistencia a las más diversas condiciones, no sólo de tipo físico, sino también de las generadas por agentes bióticos. En términos generales, los mecanismos de interacción de las plantas con su entorno se aplican para lograr su supervivencia como objetivo fundamental.

## **7.2 Niveles de metilación global de DNA (CpG)**

En la Figura 1Figura 26 se muestra los resultados obtenidos para la prueba de metilación, en la cual se observan cambios significativos únicamente para el tratamiento que corresponde a la aplicación del oligosacárido XH. Esto pudiera deberse a que la metilación del ADN es esencial para el desarrollo normal y se asocia con una serie de procesos clave, incluyendo la impronta genómica, la inactivación del cromosoma X, la represión de elementos repetitivos, el envejecimiento, las plantas a las cuales se les aplico el oligosacárido se mostraban más jóvenes que el control esto se muestra en la Figura 27 y no presentaban tantas semillas por lo que pudiera ser que el envejecimiento se detuviera y por eso cambio el porcentaje de metilación. Además se ha reportado que el rango de citosina en la metilación del ADN es notablemente diferente entre las especies: 14% de las citosinas están metiladas en *Arabidopsis thaliana*, 4% en *Mus musculus*, 2.3% en *Escherichia coli*, 0.03% en *Drosophila*, y prácticamente ninguno (< 0.0002%) en especies de levadura (Capuano, *et al.*, 2014).

Esto muestra que la inducción de plantas con FMM puede inducir también cambio en el porcentaje de metilación.



\*\*\*\* P<0.0001, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01, \*p<0.05 de acuerdo al a prueba de Dunnett

Figura 26. Porcentaje de metilación en plantas de mostaza blanca inducidas con diferentes FMM.



Figura 27. Diferencias de tamaño, vegetación y producción de flor y semilla entre Tratamiento 8 imagen izquierda y tratamiento 9 imagen derecha.

### 7.3 Pruebas de biofumigación

En cuanto a los resultados obtenidos para las pruebas de biofumigación utilizando mostaza en suelo infestado con *Fusarium oxysporum*, se muestran en el cuadro 6, los valores de referencia donde se muestra el grado de infestación del suelo se muestran en el cuadro 7, los resultados obtenidos y los cuales fueron analizados mediante una prueba de Dunnet con un 95% de confianza en donde se compararon los tratamientos con el control, y se muestran diferencias significativas para todos los tratamientos sin embargo, se demuestra la eficacia de los tratamientos en donde se utilizó la mostaza mezclada con estiércol fresco.

Esto se debe a que muchos microorganismos quitinolíticos son efectivos en la destrucción de huevos de nematodos y micelios de algunos hongos fitopatógenos. Estos tratamientos pueden contribuir al control de enfermedades de origen edáfico particularmente cuando se combinan con otras alternativas, por ejemplo, se ha estudiado la adición al suelo de enmiendas complementadas con solarización y ofrece un potencial considerable de incremento de la eficacia de las enmiendas contra los patógenos con reducción de las cantidades necesarias de materia orgánica por hectárea (Oka, 2010).

Se ha encontrado en cereales que con residuos de *Brassica napus* y *B.juncea* se controlan los hongos del suelo (Herwaarden y Howe, 1991;; Sarwar y Kirkegaard 1998; Sarwar *et al.* 1998); la eficacia de la biofumigación depende de varios factores, pero fundamentalmente de la *brassica* empleada, la actividad enzimática de la mirosinasa que es responsable de la hidrólisis de los glucosinolatos, las pérdidas por volatilización, la absorción por la arcilla, la pérdida por percolación y la degradación microbiana (Haro-Bailón *et al.* 2013).

Estos resultados de máxima concentración coinciden con la época de floración, habiendo sido obtenidos por (Martínez-Ballesta *et al.*, 2013). Por lo que en esta etapa se tienen mayores cantidades de glucosinolatos mejorando así su eficiencia como biofumigante.

Cuadro 6. Resultados de diagnóstico para prueba de biofumigación utilizando plantas de mostaza  
 \*\*\*\* P<0.0001, \*\*\*p<0.001, \*\*p<0.01,\*p<0.05 de acuerdo al a prueba de Dunnett.

<b>Resultados de diagnóstico fitopatológico de suelo infectado con <i>Fusarium Oxisporum</i> UFC/gr de suelo</b>				
<b>Tratamiento</b>	<b>UFC/gr totales</b>	<b>Tiempo de reacción en días</b>	<b>Media de temperatura alcanzada en el proceso (°C)</b>	<b>Cantidad de glucosinolatos totales aplicados por muestra (mmol kg<sup>-1</sup>)</b>
<b>Control</b>	1600		15	-
<b>Metam sodio</b>	5 ****	40	16	-
<b>Dióxido de cloro</b>	35****	40	16	-
<b>Mostaza sin elicitar con estiércol</b>	170****	40	75	99.5
<b>Mostaza elicitada con estiércol</b>	50****	40	80	203.82
<b>Mostaza sin elicitar</b>	176.7****	40	60	99.5
<b>Mostaza elicitada</b>	166.7****	40	60	203.82

La fermentación de la materia orgánica provoca una modificación de la atmósfera del suelo incrementando el CO<sub>2</sub> y disminuyendo el O<sub>2</sub>, dando lugar a fenómenos de anaerobiosis, consiguen de 90-100% de reducción de patógenos (Oka, 2010) cuando se emplea brasicas y gramíneas, al mismo tiempo que aportan microorganismos exógenos al suelo; resultando que es más eficaz cuando se cubre el suelo con plástico negro que con transparente y que las brasicas al producir isotiocianatos volátiles son más eficaces que los metil-isotiocianatos que se obtienen en la degradación del metam sodio (Popova & Morra, 2014).

En los resultados mostrados en el cuadro 6, se observa que el tratamiento en el cual se utilizó la mostaza elicitada solo fue significativa como parte del sistema de biofumigación cuando se mezcló con estiércol de bovino fresco y no cuando se utilizó sola.

Cuadro 7. Valores de referencia de cantidad de inóculo y el riesgo de daño ocasionado (INIFAP, 2016)

<b>Cantidad de inóculo y riesgo de daño</b>	
<b>UFC</b>	<b>Riesgo</b>
<b>200&lt;</b>	Bajo
<b>201-500</b>	Medio
<b>501&gt;</b>	Alto

Como se puede observar en los inóculos de referencia de UFC presentes en la tierra son extremadamente altos, sin embargo se logra reducir hasta límites bajos en los cuales la infestación puede ser controlada con bacterias y hongos benéficos, esto conlleva a un ahorro en desinfectante de suelos y a inoculadores, con esto el manejo se puede hacer de manera orgánica.

## VIII. Conclusiones

De acuerdo con los resultados anteriores se puede concluir que la aplicación de Factores modificadores del metabolismo puede inducir significativamente la generación de glucosinolatos en mostaza blanca. Se mostraron diferencias significativas, llegando a incrementar hasta en un 100 % de concentración de estos metabolitos especializados con respecto al control.

El tratamiento que mostro mejores resultados fue el 6 que correspondió a la aplicación de Quitosan 100 mg/ml en el cual muestra un incremento del 126% con respecto del control en hoja con una media de 232.1 mmol Kg<sup>-1</sup>. Para la parte de las flores presento un incremento del 202% con respecto al control con una concentración media de 224.9 mmol Kg<sup>-1</sup>.

De acuerdo a lo obtenido la aplicación de Quitosano aumento en la parte de la semilla se obtuvo un incremento del 222% con una concentración media de 213.5 mmol Kg<sup>-1</sup>. Sin embargo, para el caso de la raíz en todos los tratamientos se presentan diferencias significativas, a excepción del tratamiento 6 pero, pero en los tratamientos se presentó un decremento de la concentración de glucosinolatos. Debido a esto se recomienda el uso de Quitosan para incrementar el contenido de glucosinolatos y poder aplicarlo como biofumigante.

Para el porcentaje de metilación global de ADN, el único tratamiento en el que se presentó diferencia significativa fue en el tratamiento 8 en el cual se muestra un porcentaje de metilación medio 3.5% esto debido a que el oligosacárido detiene el envejecimiento y por ende se detiene el proceso de metilación.

Los resultados obtenidos en las pruebas de biofumigación, mostraron que la mostaza elicitada combinada con estiércol fresco, puede ser una alternativa sustentable para controlar patógenos en el suelo. Mostrando que este tratamiento puede tener resultados favorables y reducir el inóculo de patógenos como el *Fusarium oxysporum* de

UFC en las cuales las plantas no pueden sobrevivir a formar un ambiente propicio para ello pasando de 1600 UFC promedio a una media de 50 UFC.

Con estos resultados, podemos sugerir que la aplicación de Factores modificadores del metabolismo de las plantas de manera foliar aumenta la cantidad de glucosinolatos en las partes aéreas de la mostaza blanca, lo que sugiere que el material aéreo puede ser utilizado como biofumigante y tener resultados similares a los obtenidos con productos químicos por lo que es una manera natural y sustentable de proteger los cultivos, esto también puede ser utilizado para preparar un extracto a base de Mostaza y ser utilizado como repelente de insectos o algunas otras aplicaciones en la alimentación tanto humana como animal.

## IX. Referencias bibliográficas

Arnault, I. Vey, F., Fleurance, C., Nabi, H. I., Auger J. (2008). Soil fumigation with Allium sulfur volatiles and Allium by-products. 2nd ISO FAR Scientific Conference - Cultivating the Future Based on Science. June 18-20. Modena, Italy.

Ávalos y Pérez-Urria E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. Departamento de Biología Vegetal I (Fisiología Vegetal). Facultad de Biología. Universidad Complutense de Madrid.

Barres, M.T., Bello, A., Jordá C., Tello, J.C. (2006). La eliminación del bromuro de metilo en la protección de cultivos como modelo mundial para la conservación del medio ambiente. MAPA, Madrid. 515.

Bautista, L. A., Bravo, M. A. (2012). Importancia Ecológica de la Emisión de Compuestos Volátiles Vegetales, en: ROJAS, J. MALO, E. Temas Selectos en Ecología Química de Insectos. El Colegio de la Frontera Sur. Mexico, p.268-282.

Becerra-Jiménez. M., Valdivia-Urdiales, B., Aguilar. C., Martínez-Hernandez J., Contreras-Esquivel. J.C., Cuellar-Lozano, A.C. (2011). Quitosán fúngico: fuentes y propiedades, Revista Científica de la Universidad Autónoma de Coahuila Vol. 3, No. 5.

Bennett, R., Lim, Y.S., Kissen, R., Rossiter, J.T., (2005). Characterisation of recombinant epithiospecifier protein and its overexpression in *Arabidopsis thaliana*. *Phytochemistry* 66, 859–867.

Björkman, M., Klingen, I., Birch, A. N. E. E., Bones, A. M., Bruce, T. J. A. A., Johansen, T. J., Meadow, R, Mølmann, J., Seljåsen, R., Smart, L. E., Stewart, D. (2011). Phytochemicals of Brassicaceae in plant protection and human health - Influences of climate, environment and agronomic practice. *J. Phytochemistry*. Vol. 72: 538-556.

Bohinc, T., Košir, I. J., Trdan, S. (2013). Glucosinolates as arsenal for defending Brassicas against cabbage flea beetle (*Phyllotreta* spp.) attack. *J. Zemdirbyste-Agriculture* Vol. 100: 199-204.



Borboa-Flores, J., Rueda-Puente, E.O., Acedo-Félix, E., Ponce, J.F., Cruz-Villegas, ; M, García-Hernández, J.L., Ortega-Nieblas, M.M. (2010). evaluación de la actividad antibacteriana in vitro de aceites esenciales contra *Clavibacter michiganensis* subespecie *michiganensis*. Trop. Subtrop. Agroecosystems 12, 539–547.

Bones A.M., Rossiter J.T. (1996). The myrosinase–glucosinolate system, its organization and biochemistry. *Physiol Plant* 97:194–208.

Brown P.D., Morra M.J. (1997). Control of soil-borne plant pests using glucosinolate-containing plants. *Advances in Agronomy* 61: 167-231.

Caiyan, L., Dongming M., Gaobin P., Xiaofang Q., Zhigao D., Hong W., Guofeng L., Hechun Y., Benye L. (2011). Foliar application of chitosan activates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* L. *Industrial Crops and products*. Vol. 33: 176-182.

Cameroni, G. M. (2013). Ficha Técnica de Semillas de Mostaza. Subsecretaría de Agregado de Valor y Nuevas Tecnologías. Argentina, 10-15.

Campas-Baypoli, O. N, Bueno-Solano, C.; Martínez-Ibarra, D. M.; Camacho-Gil F.; Villa-Lerma A. G.; Rodríguez-Nuñez J.R; López Cervantes J.; Sánchez-Machado, D. I. (2009). Contenido de sulforafano (1 isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos. *Archivos latinoamericanos de nutrición* 59: 95-100.

Capuano, F; Muelleder, M; Kok, R. M.; Blom, H. J.; Ralser, M. (2014). «Cytosine DNA methylation is found in *Drosophila melanogaster* but absent in *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* and other yeast species». *Analytical Chemistry* 86 (8): 140318143747008. PMC 4006885.

Cardone, M., Mazzoncini, M., Menini, S., Rocco, V., Senatore, A., Seggiani, M., Vitolo, S. (2003). *Brassica carinata* as an alternative oil crop for the production of biodiesel in Italy: agronomic evaluation, fuel production by transesterification and characterization. *Biomass Bioenergy* 25: 623-636.

Chambers, K. F., Bacon, J. R., Kemsley, E. K., Mills, R. D., Ball, R. Y., Mithen, R. F., Traka, M. H. (2009). Gene expression profile of primary prostate epithelial and stromal cells in response to sulforaphane or iberin exposure. *Prostate* 69: 1411-1421.

Clossais, B.N., Larher F. (1991). Physiological role of glucosinolates in *Brassica napus*. Concentration and distribution pattern of glucosinolates among plant organs during a complete life cycle, *J. Sci. Food Agric.* 56: 25–38.

COFEPRIS. (2013). Programa de acción específico, protección contra riesgos sanitarios. 11-17.

Croteau, R., Kutchan, T.M., and Lewis, N.G. (2000). Natural products (Secondary metabolites). pp. 1250-1318. In: B. Buchanan., W. Gruissem., and R. Jones R. (eds.). *Biochemistry and Molecular Biology of Plants*. Vol. 24. American Society of Plant Physiologists. Maryland, USA. 1367 p.

Dat, J., Vandenabeele, S., Vranová, E., Van Montagu, M., Inzé, D., and Van Breusegem, F.(2000). Dual action of the active oxygen species during plant stress responses. *Cell and Molecular Life Sciences* 57:779-795.

Del Rio, J.A., Gomez, P., Baidez, A., Fuster, M., Ortuño, A. and Frias, V. (2000). Phenolic compounds ave a role in the defence mechanism-protecting grapevine against the fungi involved in Petri diseases. *Phytopathol. Mediterr.* 43: 87-94.

Dempsey, D. A., Vlot, C. A., Wildermuth, M. C., Klessig, D. F. (2011). Salicylic acid biosynthesis and metabolism. *The Arabidopsis book / American Society of Plant Biologists*, Vol. 9: 156.

Divakaran. M. and Babu, K.N. (2016). *Encyclopedia of Food and Health*. Indian Institute of Spices Research, Kozhikode, India. 2: 9-19.

Dotor, R.M.Y., Cabezas, G.M. (2014). *Mecanismo de Resistencia Sistémica en plantas*. Facultad de Ciencias Agropecuarias, Maestría en Fisiología Vegetal. Universidad Pedagógica y tecnológica de Colombia.

Dudareva, N.; Negre, F. (2005). Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission current opinion in plant biology volume 8, issue 1, february 2005, pp. 113–118 growth and development.

Du Jardin, P. (2015). Plant biostimulants: Definition, concept, main categories and regulation. *Scientia Horticulturae* 196 (2015) 3–14.

Eddleston M., Karalliedde L., Buckley N., Fernando R., Hutchinson G., Isbister G., Konradsen F., Murray D., Piola J.C., Senanayake N., Sheriff R., Singh S., Siwach S.B. y Smit L. (2002). Pesticide poisoning in the developing world—a minimum pesticide list. *The Lancet* 360: 1163–1167.

Edwards, R., and Gatehouse, J.A. (1999). Secondary metabolism. pp. 193-218. In: P.J. Lea., and R.C. Leegood (eds.). *Plant Biochemistry and Molecular Biology*. John Wiley and Sons Ltd. Maryland, USA. 384 p.

El Hadrami, Fahey, J.W., Zalcman, A.T., Talalay, P. (2001). The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants. *Phytochemistry* 56: 5–51.

FAO. (2003). Código Internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas. Organización de las Naciones Unidas para la agricultura y la alimentación. Roma. 40.

FAO. (2012). Los plaguicidas, en cuanto contaminantes del agua.

Farouk, S. O., Osman M.A. (2011). The effect of plant defense elicitors on common bean (*Phaseolus vulgaris* L.) growth and yield in absence or presence of spider mite (*Tetranychus urticae* Koch) infestation. *Journal of Stress Physiology & Biochemistry*, n7, p5-22.

Franco-Navarro, F., del Prado-Vera, C., Zavaleta-Mejía, E., & Sáchez-García, P. (2002). Aplicación de enmiendas orgánicas para el control de *Nacobbus aberrans* en tomate. *Nematrónica*, 32, 113-125.

Gardner, G. (2003). The Center for Plants and Human Health: An Interdisciplinary Approach. NABC Report on Foods for Health: Integrating Agriculture, Medicine and Food for Future Health. In National Agricultural Biotechnology Council; Eaglesham, A., Carlson, C., Hardy, R.W.F., Eds.; USG Publishers: Ithaca, NY, USA; pp. 299–308.

García-Gutiérrez, Cipriano y Rodríguez-Meza, G.D. (2012). Problemática y riesgo ambiental por el uso de plaguicidas en Sinaloa. *Ra Ximhai* 8, 1–10.

García-Mateos., Perez-Leal. (2003). Fitoalexinas: Mecanismo de Defensa de las Plantas. *Revista Chapingo*, n.9: 5-9.

García-Ponce, B., and Rocha-Sosa, M. (2000). The octadecanoid pathway is required for pathogen-induced multi-functional acetyl-CoA carboxylase accumulation in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Plant Science* 157:181-190.

Gimsing, A. L., Kirkegaard, J. A., & Bruun Hansen, H. C. (2005). Extraction and Determination of Glucosinolates from Soil. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53(25), 9663-9667.

Gimsing, A. L., & Kirkegaard, J. A. (2006). Glucosinolate and isothiocyanate concentration in soil following incorporation of Brassica biofumigants. *Soil Biology and Biochemistry*, 38(8), 2255-2264.

Gimsing, A., & Kirkegaard, J. (2009). Glucosinolates and biofumigation: fate of glucosinolates and their hydrolysis products in soil. *Phytochemistry Reviews*, 8(1), 299-310.

Gómez, D.; Reis, C.; Erlei M. (2011). Inductores abióticos de resistencia contra fitopatógenos. *Revista Química Viva*, n10; 15-25.

González B., Bernal A., (2000). Impacto social del uso de los plaguicidas químicos en el mundo. *Universidad de Matanzas*, 3-10.

González, G, E. (2015). Agentes bióticos y abióticos como inductores de resistencia a enfermedades en el cultivo de papa. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Saltillo, Coahuila, 6.

Grant, J.J., and Loake, G.J. (2000). Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signaling in disease resistance. *Plant Physiology* 124:21-29.

Grubb CD, Zipp BJ, Ludwig-Müller J, Masuno MN, Molinski TF, Abel. (2004). Arabidopsis glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis. *Plant J* 40: 893–908.

Hammond-Kosack, K.E., and Jones, J.D.G. (1996). Resistance gene-dependent plant defense responses. *Plant Cell* 8:1773-1791.

Haro-bailón, A., De Jurado, A. Pérez-melgares, J.D., Saavedra, M., Bejarano, J., Obregon, S. (2013). Variabilidad cualitativa y cuantitativa del contenido en glucosinolatos en especies de crucíferas de interés para la biofumigación del olivar. *El Aceite de Oliva. Actas Simposio Expoliva Jaén (España)* 8-11 mayo I.S.B.N. 978-84-938900-1-8.

Heldt, H. W.; Heldt, F. (2005). *Plant Biochemistry*. San Diego, California: Elsevier Inc. p. 921-1081.

Holmgren, N. H., Holmgren P.K. & Cronquist. A.J. (2005). Vascular plants of the intermountain west, U.S.A., subclass Dilleniidae. 2(B): 1–488.

Herwaarden, A. F. and Howe G. N. (1991). Productivity and break-crop effect of winter growing oilseeds. *Aust. J. Exp. Agric.* 31,669-77.

Inis, W., Wittstock, U. (2011). Insect herbivore counteradaptations to the plant glucosinolate-myrosinase system, *Phytochemistry*, Volume 72, Issue 13, September, 1566-1575.

Jezek, J., Barry, G., Haggett, D., Atkinson, A., Rawson, D.M. (1999). Determination of glucosinolatos using their alkaline degradation and with ferricyanide. *J. Agric. Food Chem* 47. 4669-4674.

Jiracek V, Kutacek M, Salkade S and Kostir J. (1974). Effect on zinc on the biosynthesis of indole glucosinolatos, glucobrassicin and neoglucobrassicin in etiolated rape seeding (*Brassica napus* var. *arvensis* (Lam.) Thell.) *Biol. Plantarum*. 16, 454.

Juge, N., Mithen, R. F., Traka, M. (2007). Molecular basis of chemoprevention by sulforaphane: a comprehensive review. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 64: 1105-1127.

Kastell A., Smetanska I., Ulrichs C., Cai Z., Mewis I. (2013). Effects of Phytohormones and Jasmonic Acid on Glucosinolate Content in Hairy Root Cultures of *Sinapis alba* and *Brassica rapa*. *Appl Biochem Biotechnol* 2013; 169:624-635.

Khan W, Prithiviraj B, Smith D.L. (2003). Chitosan and chitin oligomers increase phenylalanine ammonia-lyase and tyrosine ammonia-lyase activities in soybean leaves. *J Plant Physiol* 160: 859–863.

Keum, Y. S., Khor, T. O., Lin, W., Shen, G., Kwon, K. H., Barve, A., Li, W., Kong, A. N. (2009). Pharmacokinetics and pharmacodynamics of broccoli sprouts on the suppression of prostate cancer in transgenic adenocarcinoma of mouse prostate (TRAMP) mice: implication of induction of Nrf2, HO-1 and apoptosis and the suppression of Akt-dependent kinase pathway. *Pharmaceutical Research*, 26: 2324-2331.

Kermanshai, R., McCarry, B.E., Rosenfeld, J., Summers, P.S., Weretilnyk, E.A., Sorger, G.J. (2001). Benzyl isothiocyanate is the chief or sole antihelminthic in papaya seed extract. *Phytochemistry* 57: 427–435.

Kirkegaard, J.A., Sarwar, M. (1998). Biofumigation potential of brassicas: I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant Soil* 201, 71–89. doi:10.1023/A:1004364713152.

Kirkegaard, J. A., Akiew, S., Pattison, T., Young, A., Prior, L. (2008). Understanding mechanism of plant pest suppression using brassica green manures. Proceedings of 3rd International Biofumigation Symposium. 21-25 July. Canberra, Australia. 21 p.

Koroleva O.A., Davies A., Deeken R., Thorpe M.R., Tomos A.D., Hedrich R. (2000). Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk, *Plant Physiol.* 124: 599–608.

Lamb, C., and Dixon, R. (1997). The oxidative burst in plant disease resistance. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48:251-275.

Lazzeri L, Leoni O. and Manici L.M. (2004). Biocidal plant dried pellets for biofumigation. *Ind. Crop. Prod.* 20: 59- 65.

Lee S, Choi H, Suh S, Doo IS, Oh KY, Choi EJ, Taylor AS, Low PS, Lee Y. (1999). Oligogalacturonic acid and chitosan reduce stomatal aperture by inducing the evolution of reactive oxygen species from guard cells of tomato and *Commelina communis*. *Plant Physiol* 121: 147–152.

López-Berenguer, C.; Martínez-Ballesta, M.C.; García-Viguera, C.; Carvajal, M. (2008). Leaf water balance mediated by aquaporins under salt stress and associated glucosinolate synthesis in broccoli. *Plant Sci.*, 174, 321–328.

Ludwig-Mueller J., Rausch T., Lang S., Hilgenberg W., (1990). Plasma membrane bound high plant isoenzymes convert tryptophan to indole-3-acetaldoxime, *Phytochemistry.* 29 1397–1400.

Mikkelsen, D. M., Carsten, H.H., Wittstock, U., Halkier, A.B. (2002). Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* Catalyzes the Conversion of Tryptophan to Indole-3-acetaldoxime, a Precursor of Indole Glucosinolates and Indole-3-acetic Acid.

Mittler, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science* 7:405-410.

Magrath R., Mithen R., (1993). Maternal effects on the expression of individual aliphatic glucosinolates in seeds and seedlings of *Brassica napus*, *Plant Breeding* 111 249–252.

Mareggiani. G. (2001). Manejo de insectos plaga mediante sustancias semio químicas de origen vegetal. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 60: 22 - 30.

Martínez, S. P., Solórzano, E., Sosa del castillo, D., Martínez, B. (2011). Efecto De Activadores Biológicos y Químicos En La Inducción de Resistencia Sistémica Adquirida y Parámetros Productivos Del Tomate Frente a *Alternaria solani* en Campo. *Estudios Interdisciplinarios*, 19-33.

Mejía-Teniente, L., (2014). Aplicación de elicitores as, quitosan y h<sub>2</sub>o<sub>2</sub> en *capsicum annuum* y su efecto de respuesta a estrés biótico. *Universidad Autonoma de Queretaro.Fcultad de Ingenieria*.

Mert, F. (2002). Phytoalexins: Defence or just response to stress, *Journal of Cell and Molecular Biology* 1:1–6..

Morra M.J., Kirkegaard J.A., (2002). Isothiocyanate release from soil-incorporated *Brassica* tissue. *Soil Biology and Biochemistry*, 34, 11, 1683-1690.

Nabamita, B., Sajal, K. M., Aritra, C., Rina, G., (2013). Trichloroisocyanuric acid (TCCA): an efficient green reagent for activation of thioglycosides toward hydrolysis, *Carbohydrate Research*, Volume 369, 22 March, Pages 10-13.

Nanda-Kumar, P. B. A., Dushenkov, V., Ensley, B. D. (1995). The use of crop *Brassica* phytoextraction: a subject of phytoremediation to remove toxic metals from soils. In *Proceedings of the 9th International Rapeseed Conference Cambridge, Reino Unido*, 4-7, 753-756.



Nastruzzi, C., Cortesi, R., Esposito, E., Menegatti, E., Leoni, O., Iori, R., & Palmieri, S. (1996). In Vitro Cytotoxic Activity of Some Glucosinolate-Derived Products Generated by Myrosinase Hydrolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 44(4), 1014-1021.

Nguyen, CH. (2003). Rhizodeposition of organic C by plants: mechanisms and controls volume 23, number 5-6, "third rhizosphere conference" (dijon 2001), pp. 376-396.

Niels, A., Carl, E. O. (2012). Glucosinolate structures in evolution, *Phytochemistry*, Volume 77, May 16-45.

NOM-E-255-CNCP-(2008) Norma Mexicana para el Diseño y Construcción de Invernaderos.

Oka, Y. (2010). Mechanisms of nematode suppression by organic soil amendments, A review, *J. Applied Soil Ecology*. Vol: 44: 101-115.

Olga N. Campas, B., Bueno, S.C. Martínez, I., Camacho, G., Villa, L., Rodríguez, N., López, C. Sánchez, M. D. (2009). Contenido de sulforafano (1-isotiocianato-4-(metilsulfinil)-butano) en vegetales crucíferos. *Archivos Latinoamericanos de Nutrición*. Vol 59: 95-100.

OMS (1990). Plaguicidas. Informe Técnico No. 12. Organización Mundial de la Salud. Ginebra.

Ongley, E. D. (1997). Lucha contra la contaminación agrícola de los recursos hídricos. Estudio FAO riego y drenaje- 55. GEMS/Water collaborating Center. Burlington, Canadá. 116.

Palmieri S., Rollin P., Sørensen H., Sørensen S. (1998). Myrosinase technology for a potential glucosinolate utilization in agro-industry, *Agro. Food Inst. Hi-Tech*. Jan. Feb. 24-27.

Patel H, Krishnamurthy R. (2013). Elicitors in plant tissue culture. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*. 2:60-65.

Perez-Martínez, S. P. Solórzano, E. Sosa del castillo, D. Martínez, B. (2016). Efecto de Activadores Biológicos y Químico en la Inducción de Resistencia Sistémica Adquirida y Parámetros Productivos del Tomate Frente a *Alternaria solani* en Campo. *Revista de Estudios Interdisciplinarios*, 3-19.

Peng, C., Zhao, S.Q., Zhang, J., Huang, G. Y., Chen, L. Y., Zhao, F. Y. (2014). Chemical composition, antimicrobial property and microencapsulation of Mustard (*Sinapis alba*) seed essential oil by complex coacervation. *J. Food chemistry*, Vol. 165: 560-568.

Peña-Cortés, H., and Willmitzer, L. (1995). The role of hormones in gene activation in response to wounding. pp. 395-414. In: P.J Davis (ed.). *Plant Hormones*. Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. 833 p.

Popova, I., Morra, M. (2014). Simultaneous Quantification of Sinigrin, Sinalbin, and Anionic Glucosinolate Hydrolysis Products in *Brassica juncea* and *Sinapis alba* Seed Extracts Using Ion Chromatography. *J. of Agricultural and food chemistry*, American Chemical Society. Vol: 62: 10687–10693.

Poulsen, J. L., Gimsing, A. L., Halkier, B. A., Bjarnholt, N., & Hansen, H. C. B. (2008). Mineralization of benzyl glucosinolate and its hydrolysis product the biofumigant benzyl isothiocyanate in soil. *Soil Biology and Biochemistry*, 40(1), 135-141.

Qasim, M.; Ashraf, M.; Ashraf, M.Y.; Rehman, S.U.; Rha, E.S. (2003). Salt induced changes in two canola cultivars differing in salt tolerance. *Biol. Plantarum*, 46, 629–632.

Radovich, T.J.K.; Kleinhenz, M.D.; Streeter, J.G. (2005). Irrigation timing relative to head development influences yield components, sugar levels, and glucosinolate concentrations in cabbage. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 130, 943–949.

Rinella, M. J. Maxwell, B. D.; Fay, P. K.; Weaver, T.; Sheley, R. L. (2010). Control Effort Exacerbates Invasive-Species Problem. *Ecological Society of America*, p. 155-162.

Rungfang, G., Wangshu. S., Hongmei, Q., Min, Z., Lihong, L., Qiaomei, W. (2013). Jasmonic acid and glucose synergistically modulate the accumulation of glucosinolates in *arabidopsis thaliana* journal of experimental botany, vol. 64, no. 18, pp. 5707–5719, 2013.

Ruiz-Garcia Y, Gómez-Plaza E. (2013). Elicitors: A tool for improving fruit phenolic content. *Agriculture*. 3: 33-52.

Runqfang Y, Liping G, Xiaolin J, Chang S, Yulin Z, Zhenxin G. (2015). Enhancement of glucosinolate and sulforaphane formation of broccoli sprouts by zinc sulphate via its stress effect. *Journal of functional foods*. 13:345–349.

Salgado-Siclan, M. L. (2012). Inductores de resistencia a tumv en *arabidopsis thaliana* (l). heynh. Montecillo, Texcoco, Edo de México. 5-26.

Sarward M. (1998). Biofumigation potential of brassicas.I. Variation in glucosinolate profiles of diverse field-grown brassicas. *Plant Soil* 201: 71-89.

Sarwar, M., Kirkegaard, J.A., (1998). Biofumigation potential of brassicas. II: Effect of environment and ontogeny on glucosinolate production and implications for screening. *Plant Soil* 201, 91–101.

Sauceda, E.N.R., (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas y hortalizas. *Ra Ximhai* 7, 153–170.

Sepúlveda, G.; Trejo-tapia, G.; Trejo-espino, J. L.; Bermúdez, K.; Rodríguez, M. (2005). La Producción de las Especies Reactivas de Oxígeno en las Interacciones de las Plantas con Patógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, p. 300-311.

Segura, J. (2006). Desarrollo Vegetal. Introducción al Desarrollo. Concepto de Hormona Vegetal. *Fundamentos de Fisiología Vegetal*, 2006; 351-376.

Shahidi, F., Daun, J.K., De Clereq. (1997). Glucosinolates in Brassica oilseeds: Processing effects and extraction. *Antinutrients Phytochemicals in Food* 622: 152-170.

Silipo, A., Erbs, G., Shinya, T., Dow, J.M., Parrilli, M., Lanzetta, R., Shibuya, N., Newman, M.A., and Molinaro, A. (2010). Glycoconjugates as elicitors or suppressors of plant innate immunity. *Glycobiology* 20:406–419.

Singh, S. V., Warin, R., Xiao, D., Powolny, A. A., Stan, S. D., Arlotti, J. A., Zeng, Y., Hahm, E. R., Marynowski, S. W., Bommarreddy, A., Desai, D., Amin, S., Parise, R. A., Beumer, J. H., Chambers, W. H. (2009). Sulforaphane inhibits prostate carcinogenesis and pulmonary metastasis in TRAMP mice in association with increased cytotoxicity of natural killer cells. *Cancer Research* 69: 2117-2125.

Sixue, C., Andreasson, E. (2001). Update on glucosinolate metabolism and transport. *Plant Physiol. Biochem* 743- 758.

Skugor, S., Jodaa Holm, H., Bjelland, A.K., Pino, J., Evensen, Ø, Krasnov, A., Wadsworth, S, (2016). Nutrigenomic effects of glucosinolates on liver, muscle and distal kidney in parasite-free and salmon louse infected Atlantic salmon. *Parasit. Vectors* 9, 639. doi:10.1186/s13071-016-1921-7.

Smetanska, I. Stahl, U., Donalies, U., Nevoigt, E., (2008) Production of Secondary Metabolites Using Plant Cell Cultures *Food Biotechnology*. Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, Volume 111, pp. 187–228, 2.

Sonderby, I.E., Flores, G.F., Halkier, B.A. (2010). Biosynthesis of glucosinolates—gene discovery and beyond. *Trends Plant Sci.* 15: 283–290.

Taiz, L., Zeiger, E. (2006). Secondary Metabolites and Plant Defense. *Plant Physiology*, Fourth Edition. Sinauer Associates, Inc. Capítulo 13.

Tello, J., Marin, J.I.G., Perez, G., (2014). Cuantificación de la microbiota fúngica y bacteriana en el suelo arenado de un cultivo bajo plástico en Almería.

Thatcher, L. (2005) Plant defense response: what have we learnt from Arabidopsis? *Functional Plant Biology*, p. 1-19.

Tofiño, A. R., Romero, H. M., Ceballos, H. (2007).Efecto del estrés abiótico sobre la síntesis y degradación de almidón. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, p. 245-254.

Traka, M. H., Spinks, C. A., Doleman, J. F., Melchini, A., Ball, R. Y., Mills, R. D., Mithen, R. F. (2010). The dietary isothiocyanate sulforaphane modulates gene expression and alternative gene splicing in a PTEN null preclinical murine model of prostate cancer. *Molecular Cancer* 9:189.

Valenciaga, N., Díaz, M.F., Mora, C., (2007). Efectividad de dos extractos del árbol del Nim (*Azadirachta indica* A. Juss) en el control de insectos-plaga asociados al cultivo de la vigna (*Vigna unguiculata* Walpeers) var. Trópico 782. *Rev. Cuba. Cienc. Agrícola* 41, 285–289.

Verkerk, R., Van der Gaag, M.S., Dekker, M., Jongen, W.M.F. (1997). Effects of processing conditions on glucosinolates in cruciferous vegetables. *Cancer Lett.* 114: 193–194.

Viuda-martos, M.; Ruiz-Navajas, Y.; Fernández-López, J.; Pérez- Alvarez, J.A. (2008). Antifungal activities of thyme, clove and oregano essential oils. *Food Safety* 27: 91-101.

Vlot, A.C., Dempsey, D.A., Klessig, D.F. (2009). Salicylic Acid, a multifacetic hormone to combat disease. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47:177-206.

Vorwerk, S., Somerville. S., Somerville, C. (2004) the role of plant cell wall polysaccharide composition in disease resistance. *Trends Plant Sci* 9: 203–209.

Wasternack, C., and Parthier, B. 1997. Jasmonate-signalled plant gene expression. *Trends in Plant Science* 2:302-307.

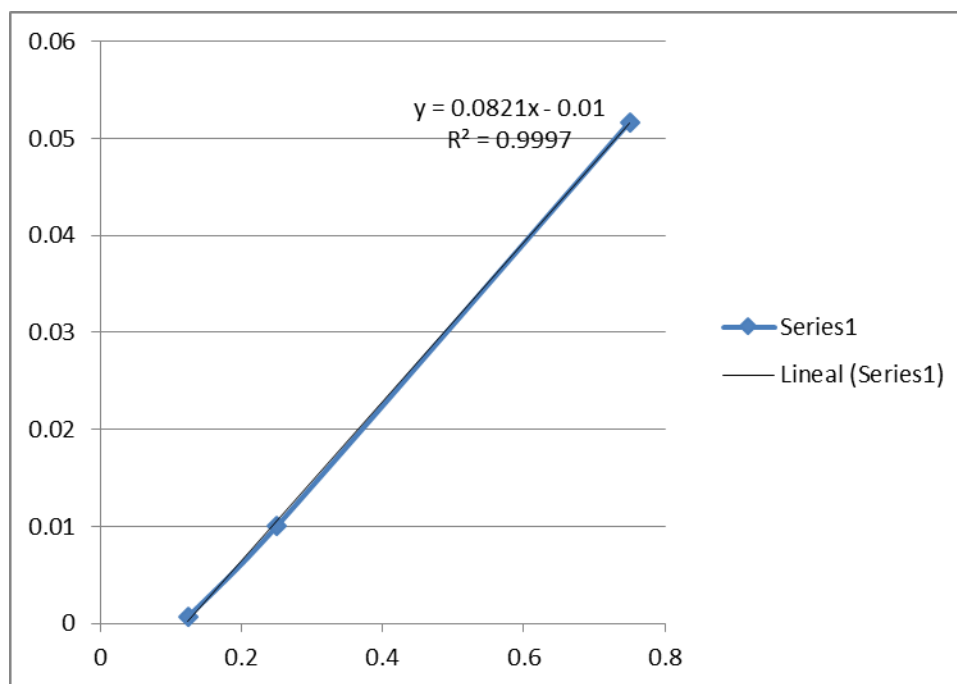
Wink, M. (1999). Introduction: Biochemistry, role and biotechnology of secondary metabolites. pp. 1-17. In: M. Wink M. (Ed.). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. Annual Plant Reviews. Sheffield Academic Press Ltd. London, UK. P. 374.

Yan, X.F., Chen, S.X., (2007). Regulation of plant glucosinolate metabolism. *Planta* 226, 1343–1352.

Yazhou Chen, Xiufeng Yan, Chen Sixue. (2011). El análisis bioinformático de la red molecular de la biosíntesis de glucosinolatos. *Biología y Química Computacional*, Volumen 35, No. 1, páginas 10-18.

## X. Anexos

Curva de calibración Sinalbina de Sigma Aldrich



**Análisis de suelo infestado de *Fusarium sp.***



**Diagnostico Fitopatologico**

Productor: Daniel Fecha: 12 Nov 2016  
 Dirección: Carretera a chichimequillas Km 1 Tel: 7712405724  
 Email: armada\_08@hotmail.com

**Composición de la muestra**

Muestra 2 Suelo \_\_\_\_\_ Cantidad recibida 500 g  
 Cultivo Anterior: Tomate Saladette Cultivo a establecer: Tomate saladette y grape

**Procedencia y uso de la muestra**

Sitio: Amazcala profundidad (0-30) Rancho: Facultad de Ingeniería  
 Municipio: Amazcala Estado: Queretaro

**Resultados del diagnóstico**

Se Utilizaron las aplicaciones de la Mezcla D1 de albe y la Mezcla ND para desinfección de suelo.

Muestra	UFC/g de suelo			UFC/g Totales	Cantidad de inoculo y riesgo de daño	
	Fusarium sp.				UFC	RIESGO
Antes	1600			1600	200<	BAJO
después	600			600	201-500	INTERMEDIO
					501>	ALTO

Observaciones: se encontraron otros patógenos como son *Penicillium*, *Aspergillus*

Responsable

*Brenda Zulema Guerrero Aguilar*  
 M en C. Brenda Zulema Guerrero Aguilar

Campo Experimental Bajío  
 Km. 6.5 Carretera Celaya-San Miguel Allende Mpio. Celaya. Guanajuato C.P. 36110