

ACEITE DE NEEM (*Azadirachta indica*: MELIACEAE) COMO BIOFUMIGANTE DE HONGOS PATÓGENOS DE RAÍCES EN PORTAINJERTOS DE AGUACATE (*Persea americana* VAR. *drymifolia*: LAURACEAE)

Neem oil (*Azadirachta indica*: Meliaceae) as biofumigant of root pathogenic fungi in avocado rootstocks (*Persea americana* var. *drymifolia*: Lauraceae)

Abraham BIBIANO-FLORES¹, Daniel TÉLIZ-ORTIZ², José Sergio SANDOVAL-ISLAS², Agustín DAMIÁN-NAVA³, Moisés CAMACHO-TAPIA⁴, Eugenia CABRERA-HUERTA² y José Antonio MORA-AGUILERA^{2*}

¹ Campo Experimental Rosario Izapa, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, km 18 Carretera Tapachula-Cacahoatán, 30870 Tuxtla Chico, Chiapas, México.

² Instituto de Fitosanidad, Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas, km 36.5 Carretera México-Texcoco, Montecillo, 56264 Texcoco, Estado de México, México.

³ Maestría en Ciencias Agropecuarias y Gestión Local, Universidad Autónoma de Guerrero, 40101 Iguala, Guerrero, México.

⁴ Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Chapingo, km. 38.5 Carretera México-Texcoco Chapingo, 56230 Texcoco, Estado de México, México.

*Autor para correspondencia: aguilera@colpos.mx

(Recibido: abril de 2025; aceptado: agosto de 2025)

Palabras clave: manejo de viveros, marchitez, DE₅₀, DE₉₀, azadiractina.

RESUMEN

La marchitez de portainjertos de aguacate (*Persea americana* var. *drymifolia*) asociada a hongos parásitos de raíces causa la pérdida de entre 60 y 100 % de las plantas en viveros del estado de Morelos, México. El manejo convencional consiste en fumigar los sustratos con metam sodio, lo que conlleva un riesgo para la salud humana y ambiental. La biofumigación con aceite de neem (azadiractina) constituye una alternativa ecológica para evitar este problema. Los objetivos de la investigación fueron: (1) determinar la etiología de la pudrición radical en portainjertos de aguacate con base en los postulados de Koch; (2) evaluar in vitro la dosis efectiva 50 % (DE₅₀) y 90 % (DE₉₀) de aceite de neem contra los microorganismos causales, y (3) comparar el efecto biofumigante de la azadiractina y el metam sodio en la densidad de unidades formadoras de colonias (UFC) de bacterias y hongos nativos en un sustrato orgánico convencional. La pudrición radical de portainjertos de aguacate fue causada por *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Ilyonectria* sp., *Pythium* sp. y *Phytophthora cinnamomi*. Con excepción de *Pythium* sp., la azadiractina inhibió el crecimiento de estos patógenos (DE₅₀, 1 mL/L). En contraste, la DE₉₀ varió según la especie de microorganismo (1.86-4.85 mL/L). También limitó la esporulación y la viabilidad, así como el tamaño de los conidios y de las fiálides. La azadiractina redujo la densidad de UFC de bacterias y hongos nativos, pero no la de actinobacterias en los sustratos evaluados. El aceite de neem, como biofumigante, constituye una estrategia de manejo sustentable contra la pudrición radical en portainjertos de aguacate.

Key words: plant nursery management, wilting, ED₅₀, ED₉₀, azadirachtin.

ABSTRACT

Wilt of avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) rootstocks, associated with root-parasitic fungi, causes the loss of between 60 and 100% of plants in nurseries in the state of Morelos, Mexico. Conventional management involves fumigating substrates with metam-sodium, which poses risks to human and environmental health. Biofumigation with neem oil (azadirachtin) represents an ecological alternative to avoid this problem. The objectives of this research were: (1) to determine the etiology of root rot of avocado rootstocks based on Koch's postulates; (2) to evaluate in vitro the effective dose 50% (ED₅₀) and 90% (ED₉₀) of neem oil against the causal microorganisms; and (3) to compare the biofumigant effect of azadirachtin and metam-sodium on the colony forming units (CFU) density of native bacteria and fungi in a conventional organic substrate. Root rot in avocado rootstocks was caused by *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Ilyonectria* sp., *Pythium* sp., and *Phytophthora cinnamomi*. Except for *Pythium* sp., neem oil also inhibited the in vitro growth of these pathogens (ED₅₀, 1 mL/L); in contrast, the ED₉₀ values varied by microorganism species (1.86 to 4.85 mL/L). It also limited sporulation and viability, as well as the size of conidia and phialides. Azadirachtin reduced the CFU density of native bacteria and fungi, but not of actinobacteria, in the evaluated substrates. Neem oil as a biofumigant represents a sustainable strategy for root rot management on avocado rootstocks.

INTRODUCCIÓN

México es el principal país productor y exportador de aguacate (*Persea americana* Mill.). En 2023 registró una producción de 2.97 millones de toneladas métricas y más de 1.3 t de fruta exportada, principalmente a EUA y Canadá. Las ganancias alcanzaron 3500 millones de dólares, beneficio que se refleja en toda la cadena agrocomercial (FAOSTAT 2023).

Los portainjertos de aguacate con raíces sanas y vigorosas obtienen con mayor eficacia los nutrientes necesarios para los cultivos con los que son injertados y favorecen la adaptación postrasplante y la productividad de los huertos comerciales (Barrientos et al. 2000, Peraza 2021). Sin embargo, existen complejos de hongos y pseudohongos patógenos de raíces que reducen su viabilidad entre el 60 y 100 % en la etapa de vivero. Las especies de hongos comúnmente reportadas, solas o en combinación, incluyen *P. cinnamomi* (Rands), *Fusarium* sp. (Link ex Grey), *Rhizoctonia* sp. (De Candolle), *Verticillium* (Nees), *Pythium* sp. (Dick) y *Cylindrocladium* sp. (Morgan), entre otras (Saltarén y Varón 1997, Truong et al. 2011, Ramírez y Morales 2013, Garbanzo y Coto 2017). Su diversidad y virulencia dependen de las características edáficas y agroecológicas de cada región productora. Exhiben una alta importancia económica por causar enfermedades y epidemias significativas

en aguacate y en muchos cultivos hortícolas, frutales, ornamentales y forestales (Pegg y Brady 2002, Agrios 2005, Schroeder et al. 2013, Hernández y Brito 2014, de Cock et al. 2015).

El manejo sanitario convencional de complejos fungosos del suelo se basa principalmente en la fumigación con bromuro de metilo (CH₃Br) y metam sodio (N-methyl ditiocarbamato de sodio) (Nyoni et al. 2019, Rudolph et al. 2019), moléculas altamente tóxicas a la salud humana, perjudiciales para la fertilidad y contaminantes del suelo y el agua (Rudolph et al. 2015, 2019; Daneel et al. 2018, Ntalli et al. 2018). En este contexto, la biofumigación con extractos de especies botánicas representa un manejo alternativo de las enfermedades fungosas más compatible con la salud humana y la calidad del suelo; además, favorece la conservación e incremento de poblaciones microbianas benéficas, principalmente de *Bacillus* spp. (Cohn), y actinobacterias (Motisi et al. 2010, Wang et al. 2014, Barnes et al. 2020, Hanschen y Winkelmann 2020).

El aceite de neem, cuyo ingrediente activo es la azadiractina y se obtiene del árbol del neem (*Azadirachta indica* A. Juss.), se ha utilizado comúnmente para controlar plagas insectiles (Pijoan 2004, Lucantonio et al. 2006). Sin embargo, también se ha documentado su actividad in vitro contra fitopatógenos fungosos de importancia económica. La técnica del alimento envenenado es un procedimiento de rutina

utilizado para evaluar la actividad antifúngica de aceites esenciales y consiste en evaluar el crecimiento o la viabilidad de los organismos en cajas de Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA) suplementado con los compuestos de interés (Geethanjali et al. 2023). En este ámbito, Keta et al. (2019) reportaron de 54.8 a 96.5 % de inhibición del crecimiento micelial de *Aspergillus* spp. (*P. Micheli* ex Haller), patógeno del arroz (*Oryza sativa* L.), con dosis de 5-15 mL/L de extracto etanólico de neem. Similarmente, Mossini et al. (2014) redujeron la esporulación de *Penicillium verrucosum* (Dierckx) y *P. brevicompactum* (Dierckx) en 82.6 y 80.09 % con aceite de neem a concentraciones de 0.12 y 0.50 %. Asimismo, Barros et al. (2014) demostraron que el macerado vegetativo y la mostaza de neem, aplicados a dosis de 1.5 g/m de suelo, también poseen actividad contra nemátodos fitopatógenos del género *Meloidogyne* (Goeldi), al limitar en 97 % las poblaciones de J2, mientras que con dosis de 4.8 y 9.4 g/m redujeron la densidad de agallas y huevecillos en 68.5 y 69-82.5 %, respectivamente. La esterilización química empobrece las poblaciones microbianas nativas asociadas a la capacidad de promover el crecimiento y el desarrollo de los suelos agrícolas. Por esta razón, la biofumigación con enmiendas orgánicas se propone como una opción ecológica para el control de enfermedades con origen en el suelo (Mocali et al. 2015). Por ejemplo, la incorporación de residuos de plantas que contienen glucosinolatos tiene un efecto biocida sobre distintos patógenos fungosos de cereales, incluido *Gaeumannomyces graminis* (Sacc.) von Arx & D.L. Olivier, y, en algunos casos, también puede preservar poblaciones importantes de comunidades microbianas benéficas (Kirkegaard et al. 2000, Mocali et al. 2015). Los objetivos de este estudio fueron: a) estudiar la etiología de la pudrición de raíces en portainjertos de aguacate nativo, *P. americana* var. *drymifolia* (Schltdl. & Cham.) Blake, asociada a hongos y pseudohongos en Tetela del Volcán, Morelos, México; b) evaluar la sensibilidad in vitro de los organismos causales al aceite de neem (PROGRANIC Nimicide 80), incluyendo la determinación de las DE₅₀ y DE₉₀, y c) evaluar el efecto biofumigante del aceite de neem incorporado en un sustrato orgánico convencional de uso local.

MATERIALES Y MÉTODOS

Área de estudio y material vegetativo

El experimento de campo se realizó de septiembre de 2021 a abril de 2024 en el vivero comercial

de aguacate Los Dos Diamantes, en Tetela del Volcán, Morelos, México (18.851664, -98.736291 y 2085 msnm), con temperatura promedio de 24 °C, precipitación media anual de 2300 mm y humedad relativa del 65 %. Los portainjertos experimentales se propagaron a partir de semillas de genotipos nativos cosechados en la región. Las muestras de raíces se obtuvieron de plantas de 10 meses de edad, injertadas con varetas del cultivar (cv.) 'Hass' por el método de incrustación (Izquierdo y Hosfield 1982). Las actividades biológicas se desarrollaron en el Laboratorio de Enfermedades de Frutales y Epidemiología-Lanref del Colegio de Postgraduados y en el Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal de la Universidad Autónoma Chapingo.

Aislamiento e identificación cultural de hongos y pseudohongos

Se recolectaron muestras de raíces de 45 plantas injertadas con el cv. 'Hass' de 10 meses de edad; cinco fueron asintomáticas y 40 exhibieron marchitez, amarillamiento y necrosis radical (**Fig. 1**). Fragmentos de raíces de aproximadamente 1 cm de largo, obtenidos de ramificaciones independientes, se lavaron con agua corriente, se desinfectaron con hipoclorito de sodio (NaClO) al 1 % por 30 s y se lavaron con agua destilada estéril por 1 min. Posteriormente, se secaron con papel Sanitas (Fapsa, TI2250, Mexicali, B.C, México) estéril e incubaron a 27 °C por ocho días en cajas de Petri con medios de cultivo harina de maíz-NARPH, adicionados con natamicina, ampicilina, rifampicina, pimaricina e himexazol, de acuerdo con Erwin y Ribeiro (1996) y PDA (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, EUA) suplementado con ácido láctico (0.5 mL/L). Los organismos obtenidos a los diez días de edad y purificados por la técnica de punta de hifa (Pérez y García-Godos 2019) se identificaron preliminarmente con base en características culturales de las colonias y en morfométricas de hifas y estructuras reproductivas en medio PDA, utilizando las claves taxonómicas propuestas por Erwin y Ribeiro (1996), Barnett y Hunter (1998) y Cabral et al. (2012).

Prueba de patogenicidad

De cada cultivo puro obtenido de hongos y pseudohongos se preparó un inóculo de acuerdo con el protocolo sugerido por Jemai et al. (2021), con modificaciones. Frascos de vidrio de 6 × 15 cm ancho-largo (W-L) con 50 g de semilla de *Avena sativa* L. var. Turquesa y 50 mL de agua destilada se esterilizaron dos veces en autoclave a 120 °C por 1 h, con un periodo de reposo de 3 h entre cada

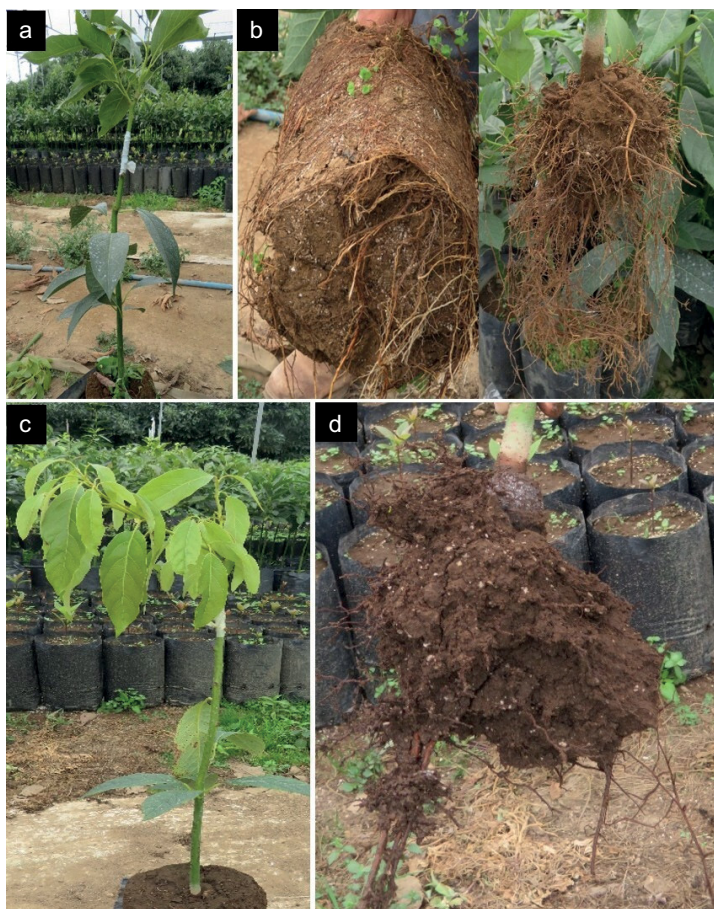


Fig. 1. Plantas de aguacate cv. 'Hass' (*Persea americana*) de 10 meses de edad, injertadas sobre portainjertos de raza mexicana (*P. americana* var. *drymifolia*) en un vivero comercial ubicado en Tetela del Volcán, Morelos, México. (a) Planta asintomática con follaje turgente y vigoroso, y (b) raíces sanas; (c) planta enferma que muestra amarillamiento y marchitez; y (d) necrosis radical asociada a hongos y pseudohongos del suelo.

esterilización. En cada uno se depositaron cinco discos de PDA de 5 mm de diámetro, con crecimiento fungoso de tres días de edad, y se incubaron por 30 días. La patogenicidad se verificó en plántulas de aguacate propagadas a partir de semillas de 30-40 g, provenientes del genotipo nativo 'El Religioso', localizado en Cuapexco, Puebla, México. Las semillas se desinfectaron con NaClO al 2 % por 5 min y se lavaron con agua destilada estéril. La siembra se realizó en charolas de plástico de 25 × 40 cm W-L con sustrato a base de musgo de turbera (*Sphagnum* sp.) (Kekkila DSM, Grupo INVECO, Zapopan, Jalisco, México) y perlita en proporción 2:1 y esterilizado en autoclave a 120 °C por 3 h. Después de 40 días, las plántulas se trasplantaron a bolsas de polietileno con capacidad de 2.2 kg que contenían suelo combinado a base de tierra de monte y hoja de aguacate en descomposición en proporción 3:1 v/v esterilizado con metam sodio (33 % de ingrediente activo), a dosis de 100 mL/m². Cuando las plantas alcanzaron 35 cm de altura y desarrollaron ocho hojas verdaderas, se inocularon con el método de sustrato infestado propuesto por

Scandiani et al. (2011), con modificaciones. En cada contenedor se colocaron 3.0 g de semillas colonizadas adyacentes a la corona, a las cuales se les realizaron cinco punciones de 3.0 mm de profundidad con una aguja de disección desinfectada con alcohol al 70 %. Se inocularon ocho plantas por cada especie de microorganismo y cada prueba se repitió dos veces. El tratamiento testigo se inoculó con semillas de avena estériles. Las plantas tratadas se mantuvieron en invernadero a 23 ± 3 °C y humedad relativa > 80 %. La patogenicidad se estimó con base en la incidencia de síntomas (pudrición de corona, raíces y marchitez). Para cumplir los postulados de Koch, tejido radical de plantas enfermas y asintomáticas se procesó para reaislamiento e identificación de los organismos inoculados con los procedimientos morfológicos ya señalados.

Sensibilidad in vitro de hongos y pseudohongos al aceite de neem

La sensibilidad de microorganismos al aceite de neem con 80% de ingrediente activo (Progranic

Nimicide 80, Ultraquímica Agrícola, Jiutepec, Morelos, México) se evaluó *in vitro* con las siguientes dosis (tratamientos): 1) 0.7 mL/L, 2) 1.4 mL/L, 3) 3.0 mL/L y 4) testigo (PDA sin aceite de neem), mediante la técnica de alimento envenenado (Geethanjali et al. 2023). Se esterilizó el medio de cultivo PDA a 120 °C por 15 min (Peñuelas-Rubio et al. 2015). El extracto botánico se adicionó al medio de cultivo disuelto en acetona (1:1 v/v); la mezcla se homogeneizó y se vertió en cajas de Petri. En el centro de cada una se colocó un disco de PDA con crecimiento micelial de tres días de edad por organismo aislado e incubó a 27 °C por ocho días. Cada caja con 20 mL de PDA, con o sin aceite de neem y crecimiento fungoso, fue una unidad experimental. Cada tratamiento tuvo ocho repeticiones y el experimento se replicó tres veces.

Aceite de neem como biofumigante

La actividad biocida del aceite de neem se contrastó con metam sodio al 33 % (Busan1020, Summit Agro México). El sustrato utilizado incluyó suelo de origen local adicionado con residuos de hojas de aguacate parcialmente descompuestas en proporción 3:1 (v/v). El sustrato tuvo textura franco-arcillosa, contenido medio (2.24 %) de materia orgánica, pH de 6.8 sin problemas de salinidad, deficiencias ni excesos de N, P, K, Ca, B, Mn, Zn, Mg, Fe y Cu. En cada contenedor (bolsa de plástico de 25 × 40 cm W-L), con sustrato previamente irrigado con agua común, se depositaron 1000 mL de una solución con aceite de neem a dosis de 3 mL/L o metam sodio a concentración de 5 mL/L (tratamientos), y se cubrieron con plástico blanco lechoso de 4.20 × 6.0 m W-L, calibre 720 (IMAAS, Texcoco, Estado de México) por 30 días. Posteriormente, los contenedores se descubrieron y ventilaron por 20 días para liberar los residuos del producto. Contenedores sin biofumigante e irrigados solo con agua constituyeron el tratamiento testigo. El experimento se replicó dos veces.

Variables evaluadas

Sensibilidad in vitro de hongos y pseudohongos al aceite de neem

Las variables registradas fueron las siguientes: inhibición del crecimiento micelial de colonias (%) según Tetlow y Vincent (1947); densidad de esporulación (conidios/mL) y viabilidad (%) de acuerdo con Vélez et al. (1997) y Viera et al. (2018); caracterización morfológica, macro y microscópica de hifas, conidios, fiálides y clamidosporas según Barnett y Hunter (1998), Erwin y Ribeiro (1996) y Cabral et al. (2012); días a inicio de formación

de clamidosporas y oosporas (Alcalá et al. 2005); y determinación de las DE₅₀ y DE₉₀ (Ming-Tsung et al. 2008, Molina y Melo 2010). La viabilidad de conidios se estimó únicamente con *Fusarium* sp. e *Ilyonectria* sp. (Chaverri y Salgado) en una alícuota de 10 µL, obtenida de 1.0 mL de una dilución 10⁻³ (equivalente a una concentración de 6.1 y 2.67 × 10⁹ esporas), utilizando un microscopio compuesto y una cámara de Neubauer (Viera et al. 2018). Cada variable se evaluó cinco veces por unidad experimental (caja de Petri) y experimento replicado.

Aceite de neem como biofumigante

Se estimó la densidad de unidades formadoras de colonias (UFC/g en suelo seco) de poblaciones residuales de bacterias, actinobacterias y hongos totales. Sesenta y dos días después de aplicados los tratamientos, se recolectaron 5 g de sustrato por contenedor, de un total de 20 contenedores por tratamiento seleccionados al azar, para formar tres muestras compuestas. Se usó la técnica de dilución en serie en placas de Petri (Báez et al. 2019), considerando las diluciones 10⁻³ para hongos y 10⁻⁴ para bacterias y actinobacterias. De cada una se obtuvo un volumen de 100 µL que se depositó en placas de Petri con medio de cultivo PDA-TS (Steiner y Watson 1965), adicionado con ácido láctico (0.5 mL/L) y tetraciclina (Biotricina, Bioresearch de México) a dosis de 100 mg/L para cuantificación de hongos o en agar nutritivo (Bioxon, Becton Dickinson de México) suplementado con benomilo (Promyl 50 %, Promotora Técnica Industrial, Jiutepec, Morelos, México) a concentración de 75 mg/L para bacterias y actinobacterias. Las cajas se incubaron durante seis días a 27 °C (Ramírez et al. 2013). Las UFC se determinaron visualmente por cuantificación directa en placa. De cada dilución (10⁻³ y 10⁻⁴) se realizaron cuatro repeticiones por tratamiento, donde cada caja DE Petri individual fue una repetición. El experimento se replicó tres veces.

Diseño experimental y análisis estadístico

La sensibilidad de los patógenos *in vitro* y la actividad biofumigante del neem se evaluaron mediante un diseño completamente al azar. Se realizaron análisis de normalidad usando las pruebas de Shapiro-Wilk ($\alpha = 0.001$) (Shapiro y Wilk 1965) y de varianza (Proc GLM) para las siguientes variables: inhibición de colonias; densidad de esporulación; viabilidad e inicio de formación de estructuras; y UFC de hongos, bacterias y actinobacterias. Las dosis efectivas DE₅₀ y DE₉₀ se determinaron por análisis Probit a partir de la proporción de inhibición del crecimiento micelial de

colonias de hongos y pseudohongos, de acuerdo con Ming-Tsung et al. (2008) y Molina y Melo (2010). Los indicadores coeficiente de variación (CV), valor de probabilidad (p-Value) y coeficiente de determinación (R^2) permitieron conocer la precisión del modelo, la probabilidad de error para rechazar la hipótesis nula (ausencia de diferencias entre tratamientos) y la variabilidad debida a tratamientos, respectivamente. Todos los análisis se realizaron con el programa estadístico SAS v. 9.0 (SAS 2002).

RESULTADOS

Aislamiento e identificación cultural de hongos y pseudohongos

De portainjertos con marchitez se obtuvieron 970 aislados de hongos y pseudohongos. Con base en

características culturales y morfométricas, las especies identificadas fueron *Fusarium* sp., *Rhizoctonia* sp., *Ilyonectria* sp., *Pythium* sp. y *P. cinnamomi* (**Cuadro I**).

Prueba de patogenicidad

Las plántulas exhibieron síntomas iniciales de amarillamiento y marchitez de las hojas 10 días después de inoculadas (ddi) con sustrato infestado y por heridas (**Fig. 2b**), y a los 79 ddi mostraron colapso total. Los síntomas variaron según el organismo inoculado e incluyeron necrosis de la corona (*Rhizoctonia* sp.), de los ápices de raíces alimenticias (*P. cinnamomi*) o de cotiledones y raíces (*Ilyonectria* sp., *Fusarium* sp.). En algunos casos se observó a *Pythium* sp. e *Ilyonectria* sp. causando pudrición combinada de corona y raíces (**Fig. 2d-h**), mientras que las plantas inoculadas con sustrato estéril

CUADRO I. CARACTERIZACIÓN CULTURAL Y MORFOMÉTRICA DE HONGOS Y PSEUDOHONGOS AISLADOS DE RAÍCES DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE (*Persea americana* var. *drymifolia*) CON MARCHITEZ Y CULTIVADOS EN MEDIO DE CULTIVO PAPA-DEXTROSA-AGAR (PDA).

<i>Fusarium</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Ilyonectria</i> sp.	<i>Pythium</i> sp.	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
Colonia radial, algodonosa, aérea, abundante y con anillos. Micelio blanco-púrpura claro a oscuro. Fiálides de 15-25 × 3.5-5 µm, hialinas con forma de botella. Microconidios de 5-12.5 × 2.5-3.75 µm, unicelulares, 0 septas, hialinos, elipsoides, ovoides o reniformes, agrupados en falsas cabezuelas sobre monofiálides cortas. Macroconidios de 20-32.5 × 3.75-5 µm, con 1-3 septos, hialinos, lisos, con forma lunata o falcada. Clamidosporas de 7.5-10 µm, dispuestas en parejas y series. Esporodocios ausentes.	Colonia radial, homogénea, en anillos. Micelio rastrero regular y algodonoso, blanco-amarillo claro. Hifas de 30-175 × 7.5-10 µm del origen de la ramificación a la siguiente, gruesas, septadas, subhialinas. Ramificación en ángulos rectos a agudos, con una ligera constricción en el sitio de origen y septo cercano al punto de ramificación.	Colonia radial homogénea, con presencia de anillos. Micelio aéreo abundante, algodonoso y afelpado, beige a canela. Fiálides de 12.5-32.5 × 1.5-2.5 µm, ramificadas alrededor de conidióforos, de 1-4 (generalmente 3) son rectas a ligeramente curvadas con forma cilíndrica o de botella con septo cerca del origen. Microconidios de 3.75-12.5 × 1.25-2.5 µm, unicelulares, 0-1 septados, lisos, hialinos, elipsoidales, ovoides o subcilíndricos, a menudo agregados en falsas cabezas. Macroconidios de 25-48.5 × 3.5-5 µm, con 1-3 septos, hialinos, lisos, de forma cilíndrica. Clamidosporas globosas de 8.5 × 12.7 µm, lisas, con apariencia rugosa, dispuestas en parejas, hialinas a marrón dorado.	Colonia con crecimiento irregular (cameloides). Micelio aéreo, regular, hialino, cenocítico, ligeramente hinchado, algodonoso y color blanco. Esporangios de 10-15 µm, esféricos, globosos, terminales e intercalados. Oospora de 20-30 µm de diámetro, simple, con pared gruesa, lisa y doble membrana.	Colonia con crecimiento irregular en roseta. Micelio aéreo abundante, hialino, cenocítico, toruloso con textura venosa y color blanco. Clamidosporas de 20-40 µm, esféricas con pared gruesa.

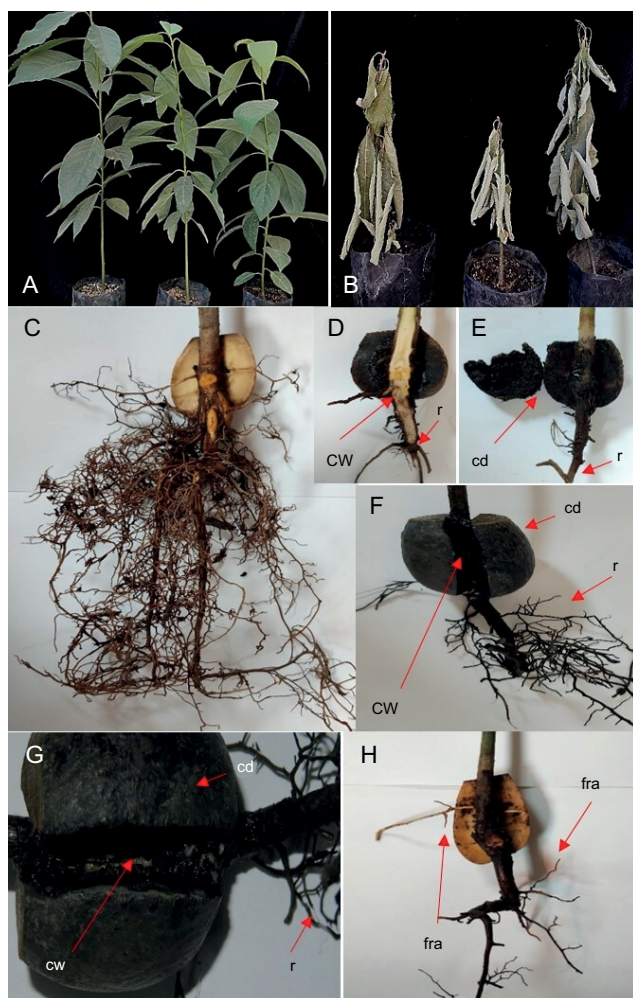


Fig. 2. Marchitez, amarillamiento y necrosis radical en portainjertos de aguacate nativo *Persea americana* var. *drymifolia*, inoculados con hongos y pseudohongos del suelo. (a) Planta asintomática; (b) portainjertos con marchitez y amarillamiento; (c) sistema radical sano de planta asintomática; (d) necrosis de corona y raíz causada por *Rhizoctonia* sp.; (e) necrosis de cotiledones y raíces inducida por *Fusarium* sp. e *Ilyonectria* sp.; (f) necrosis de cotiledones, corona y raíces por *Pythium* sp. y (g) por *Ilyonectria* sp.; y (h) necrosis de ápices de raíces alimenticias causada por *Phytophthora cinnamomi*. (cw: necrosis de corona; cd: cotiledones; r: raíz; fra: ápices de raíces alimenticias.)

y heridas permanecieron asintomáticas (**Fig. 2a, c**). Los patógenos se reaislaron únicamente de plantas inoculadas y su identidad se confirmó con los criterios morfológicos ya descritos, mismos que corroboraron los postulados de Koch.

Sensibilidad in vitro de hongos y pseudohongos al aceite de neem

Con excepción de *Pythium* sp. los microorganismos aislados fueron altamente sensibles al aceite de neem en todas las dosis probadas. Sin embargo, la más alta (3.0 mL/L) inhibió en mayor grado la expansión de colonias de *Rhizoctonia* sp. e *Ilyonectria* sp., con valores de 96.9 y 81.6 %, respectivamente, pero no se encontraron diferencias (Tukey $p > 0.05$) entre las dosis media y alta para *Fusarium* sp. y *P. cinnamomi*. El análisis probit demostró que es necesaria una dosis de 1 mL/L del extracto botánico para inhibir en 50 % (DE₅₀) el desarrollo de colonias de

cualesquiera de los patógenos identificados, mientras que para alcanzar la DE₉₀ se requieren dosis diferentes para cada microorganismo, las cuales fluctuaron entre 1.86 y 4.85 mL/L, como se observa en el **cuadro II** y la **figura 3** ($p \leq 0.05$). El aceite de neem aplicado a la dosis más alta (3.0 mL/L) también redujo la esporulación y germinación conidial de *Fusarium* sp. en 15.9 y 6.7 % e *Ilyonectria* sp. en 10.8 y 2.7 %, respectivamente (**Cuadro III**). Asimismo, modificó el color, textura y patrón de crecimiento de las colonias y redujo la relación largo-ancho de conidios, clamidosporas, fiálides e hifas (**Cuadro IV**, **Figs. 4, 5**). Todas las dosis de azadiractina retrasaron la formación de clamidosporas de *P. cinnamomi*, con un periodo tres veces más prolongado (21 días) con la dosis de 3.0 mL/L en comparación con los siete días registrados en el tratamiento testigo. En el caso de *Fusarium* sp. e *Ilyonectria* sp., todas las concentraciones inhibieron la formación de estas estructuras,

CUADRO II. SENSIBILIDAD IN VITRO AL ACEITE DE NEEM DE UN COMPLEJO FUNGOSO Y *Phytophthora cinnamomi*, AISLADOS DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE (*Persea americana* var. *drymifolia*) CON MARCHITEZ, AMARILLAMIENTO Y NECROSIS RADICAL, EN TETELA DEL VOLCÁN, MORELOS, MÉXICO.

Tratamiento*	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Ilyonectria</i> sp.	<i>P. cinnamomi</i>
	Inhibición**	Inhibición**	Inhibición**	Inhibición**
T0	8.5 ± 0.0 c	8.5 ± 0.0 d	8.5 ± 0.0 d	8.5 ± 0.0 c
T1	5.53 ± 0.09 b	4.48 ± 0.05 c	5.98 ± 0.02 c	4.20 ± 0.05 b
T2	2.08 ± 0.10 a	1.32 ± 0.11 b	2.35 ± 0.02 b	2.07 ± 0.03 a
T3	1.65 ± 0.02 a	0.26 ± 0.04 a	1.56 ± 0.01 a	1.61 ± 0.05 a
DE ₅₀ ***	0.72	0.90	1.02	0.59
DE ₉₀ ***	3.97	1.86	3.75	4.85
Valor p	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001
CV (%)	10.9	12.5	2.75	7.16
R ²	0.84	0.91	0.99	0.94

*Tratamientos y coeficientes estadísticos: T0: testigo (sin aceite de neem); T1: 0.7 mL/L de aceite de neem (*Azadirachta indica*); T2: 1.4 mL/L; T3: 3.0 mL/L; **inhibición del desarrollo micelial (cm) en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) mezclado con aceite de neem; ***dosis efectiva (mL/L) para 50 % (DE₅₀) y 90 % (DE₉₀) de inhibición de crecimiento micelial (cm).

Valor p: probabilidad de error para rechazo de hipótesis nula (ausencia de diferencias significativas); CV: coeficiente de variación asociado a la precisión del modelo; R²: coeficiente de determinación que muestra la variabilidad debida a tratamientos.

Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$). Cada valor representa un valor medio de ocho unidades experimentales por tratamiento en un ensayo replicado tres veces

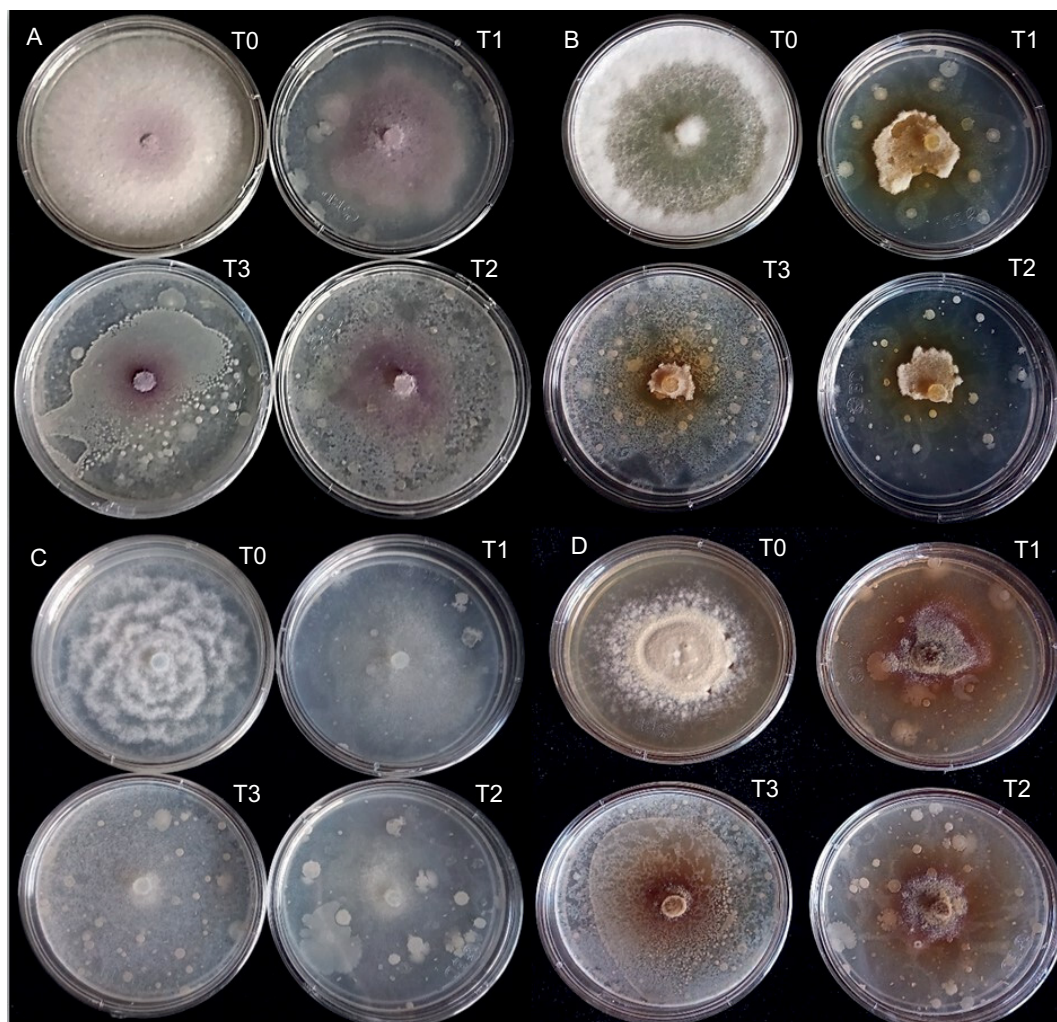


Fig. 3. Sensibilidad in vitro al aceite de neem de un complejo fungoso y *Phytophthora cinnamomi*, aislados de portainjertos de aguacate nativo *Persea americana* var. *drymifolia*, con marchitez, amarillamiento y necrosis radical en Tetela del Volcán, Morelos, México. (a) *Fusarium* sp., (b) *Rhizoctonia* sp., (c) *P. cinnamomi* y (d) *Ilyonectria* sp. Colonias de ocho días de edad evaluadas en medio de cultivo PDA adicionado con cuatro dosis del extracto botánico: T1 (0.7 mL/L), T2 (1.4 mL/L), T3 (3.0 mL/L) y T0 (testigo, sin aceite de neem).

CUADRO III. EFECTO DETRIMENTAL DEL ACEITE DE NEEM EN LA ESPORULACIÓN Y VIABILIDAD CONIDIAL DE *Fusarium* sp. e *Ilyonectria* sp. AISLADOS DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE (*Persea americana* var. *drymifolia*) CON MARCHITEZ, AMARILLAMIENTO Y NECROSIS RADICAL, EN TETELA DEL VOLCÁN, MORELOS, MÉXICO.

Tratamiento*	Esporulación** (%)		Viabilidad** (%)	
	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Ilyonectria</i> sp. P.	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Ilyonectria</i> sp.
	Conidios/mL	Conidios/mL	UFC/mL	UFC/mL
T0	$6.1 \times 10^9 \pm 0.13$ a	$2.67 \times 10^9 \pm 0.13$ a	$6.1 \times 10^9 \pm 0.13$ a	$2.67 \times 10^9 \pm 0.13$ a
T1	$4.15 \times 10^9 \pm 0.16$ b	$4.48 \times 10^8 \pm 0.16$ b	$3.33 \times 10^9 \pm 0.16$ b	$3.04 \times 10^8 \pm 0.16$ b
T2	$2.89 \times 10^9 \pm 0.16$ c	$2.43 \times 10^8 \pm 0.16$ c	$1.95 \times 10^9 \pm 0.16$ c	$1.37 \times 10^8 \pm 0.16$ c
T3	$9.69 \times 10^8 \pm 0.13$ d	$1.78 \times 10^8 \pm 0.13$ d	$6.48 \times 10^8 \pm 0.13$ d	$7.02 \times 10^7 \pm 0.13$ d
Valor p	< 0.0001		< 0.0001	
CV (%)	0		0	
R ²	1.0		1.0	

*Tratamientos y coeficientes estadísticos: T0: testigo (sin aceite de neem); T1: 0.7 mL/L de aceite de neem (*Azadirachta indica*); T2: 1.4 mL/L; T3: 3.0 mL/L; **esporulación y viabilidad estimadas en 1.0 mL de una dilución 10^{-3} (equivalente a 6.1 y 2.67×10^9 esporas).

UFC: unidades formadoras de colonias; valor p: probabilidad de error para rechazo de hipótesis nula (ausencia de diferencias significativas); CV: coeficiente de variación asociado a la precisión del modelo; R²: coeficiente de determinación que muestra la variabilidad debida a tratamientos.

Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$). Cada valor representa un valor medio de ocho unidades experimentales por tratamiento en un ensayo replicado tres veces.

CUADRO IV. EFECTO DEL ACEITE DE NEEM EN LAS CARACTERÍSTICAS CULTURALES Y MORFOMÉTRICAS DE HONGOS Y PSEUDOHONGOS AISLADOS DE RAÍCES DE PORTAINJERTOS DE AGUACATE (*Persea americana* var. *drymifolia*) CON MARCHITEZ Y CULTIVADOS EN MEDIO DE CULTIVO PAPA-DEXTROSA-AGAR (PDA).

<i>Fusarium</i> sp.	<i>Rhizoctonia</i> sp.	<i>Ilyonectria</i> sp.	<i>Pythium</i> sp.	<i>Phytophthora cinnamomi</i>
Colonia radial irregular, algodonosa, aérea, escasa y sin anillos. Micelio púrpura claro a oscuro. Fiálides de $5-11.25 \times 1.25-3.75$ μm, hialinas, en forma de botella. Microconidios de $5-7.5 \times 1.25-2.5$ μm, unicelulares, 0 septas, hialinos, obovoides a ligeramente elipsoides, sin agrupación en falsas cabezuelas. Macroconidios de $10-12.5 \times 1.25-2.5$ μm, con 1-2 septos, hialinos, lisos, con forma fusiformes a cilíndricos. Esporodocios y clamidosporas ausentes.	Colonia radial, heterogénea, sin anillos. Micelio aéreo abundante, irregular y algodonoso, blanco-amarillo claro. Hifas de $12.5-80 \times 10-12.5$ μm del origen de la ramificación a la siguiente, ligeramente más gruesas, rugosas y compactadas, septadas, subhialinas. Ramificación en ángulos rectos a agudos, con constricción ligera en el sitio de origen y septo cercano al punto de ramificación.	Colonia radial, heterogénea, sin anillos. Micelio aéreo, irregular, afelpado, café oscuro. Fiálides de $11.25-27.5 \times 1.25-2.5$ μm, ramificadas alrededor de conidióforos, de 1-3, son rectas a ligeramente curvas con forma cilíndrica o de botella, con septo cercano al origen. Microconidios de $3.75-5 \times 1.25-1.87$ μm, unicelulares, lisos, hialinos, ovoides a cilíndricos, sin agrupación en falsas cabezuelas. Macroconidios de $21.5-37.5 \times 2.5-3.2$ μm, con 1-2 septos, hialinos, lisos, de forma cilíndrica. Ausencia de clamidosporas	Colonia con crecimiento irregular (cameloides). Micelio aéreo, regular, hialino, cenocítico, ligeramente hinchado, algodonoso, blanco. Esporangios de $10-15$ μm, esféricos, globosos, terminales e intercalados. Oospora de $20-30$ μm de diámetro, simple, con pared gruesa, lisa y doble membrana.	Colonia con crecimiento semirradial sin forma arosetada. Micelio aéreo abundante, hialino, cenocítico, ligeramente toruloso con textura algodonosa y color blanco. Clamidosporas de $15-25$ μm, esféricas con pared gruesa.

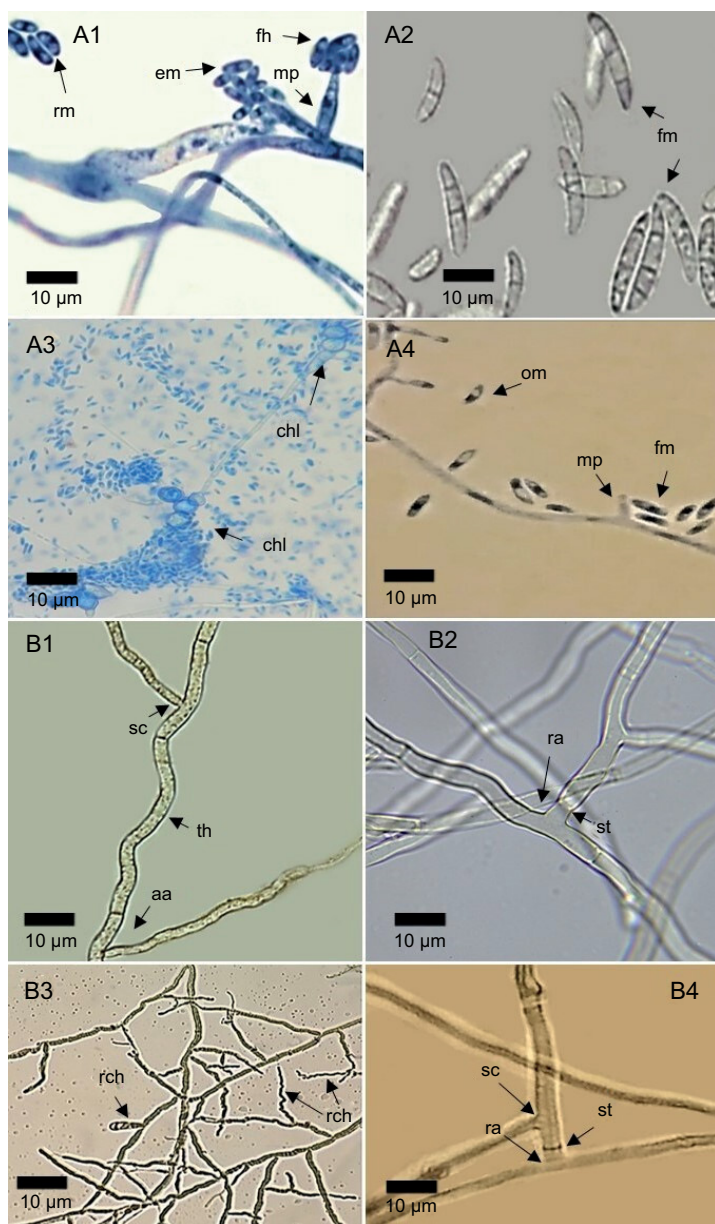


Fig. 4. Efecto del aceite de neem adicionado en medio PDA sobre la morfología de hongos aislados de raíces de portainjertos de aguacate nativo *Persea americana* var. *drymifolia* con marchitez. (a1-a3) *Fusarium* sp. (tratamiento sin aceite de neem) mostró monofiálides cortas en forma de botella (mp), microconidios elipsoidales (em) o reniformes (rm) agrupados en falsas cabezuelas (fh), macroconidios falcados (fm) y clamidosporas dispuestas en parejas y series (chl). (a4) La adición de neem indujo monofiálides más cortas (mp), así como macroconidios fusiformes (fm) y microconidios obovoides (om). (b1-b2) En el tratamiento de testigo, *Rhizoctonia* sp. exhibió hifas gruesas (th) ramificadas en ángulos rectos (ra) a agudos (aa), ligeramente constreñidas en la base (sc) y presencia de septo en la base de la ramificación (st). (b3-b4) El aceite de neem indujo hifas ligeramente más gruesas, rugosas y compactadas (rch), aunque el hongo conservó la ramificación típica en ángulo recto (ra, sc, st).

mientras que, en ausencia de neem, su desarrollo inició a los ocho y siete días. El extracto de neem no limitó la formación de oosporas de *Pythium* sp., como se muestra en el **cuadro V** ($p \leq 0.05$).

Aceite de neem como biofumigante

El aceite de neem en dosis de 3 mL/L superó al metam sódico al reducir hasta en 63.4 % la densidad de UFC de bacterias nativas (**Fig. 6a**), aunque ambos tratamientos fueron igualmente efectivos al limitar la flora fungosa global hasta en 95 y 100 % (**Fig. 6c**). Los únicos géneros sobrevivientes después de la

biofumigación fueron *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp. (**Fig. 6 d**). Las poblaciones de actinobacterias nativas (**Fig. 6b**) no fueron afectadas por ninguno de los tratamientos de fumigación ($p > 0.05$).

DISCUSIÓN

Se aisló un complejo de patógenos a partir de raíces de portainjertos de aguacate con marchitez, cuyas características culturales, morfológicas y coinfectivas fueron concordantes con los reportes realizados

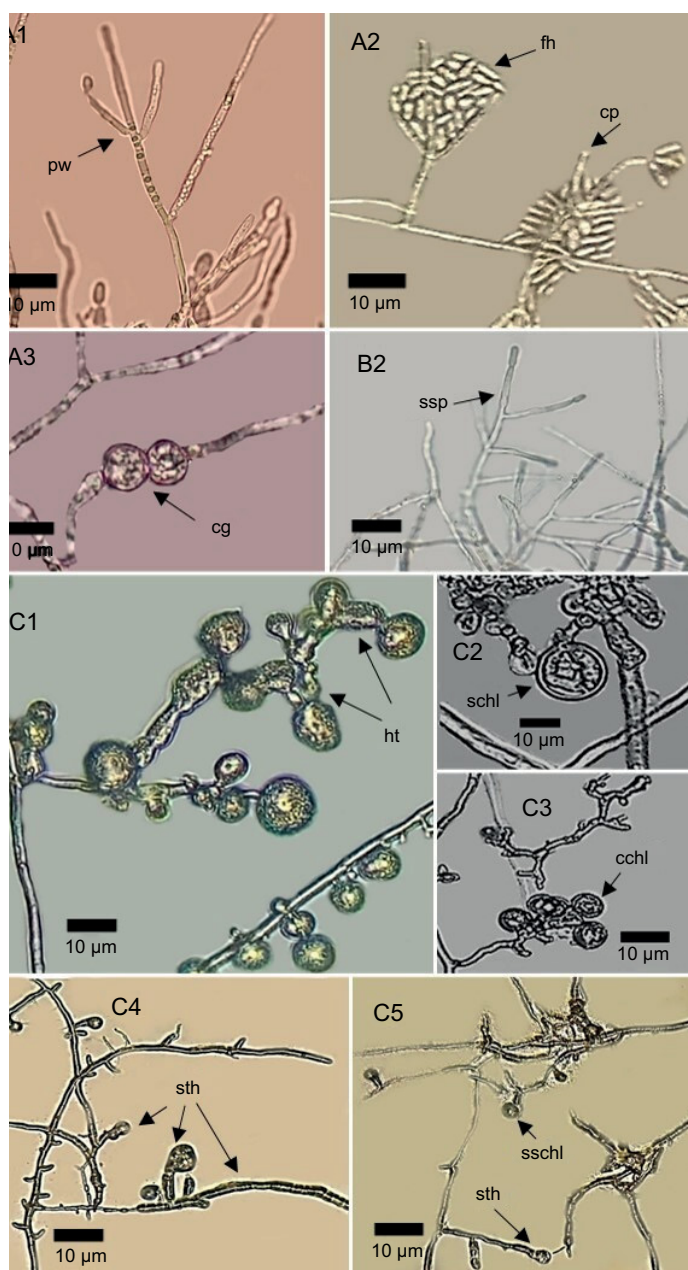


Fig. 5. Efecto del aceite de neem en la morfología de hongos y *Phytophthora cinnamomi* aislados de raíces de portainjertos de aguacate nativo *Persea americana* var. *drymifolia*, con marchitez en medio PDA. (a1-a3) *Ilyonectria* sp. sin aceite de neem mostró fiálides en verticilos (pw) y conidios agrupados en falsas cabezuelas (fh) sobre fiálides con forma cilíndrica (cp) o botella (bsp) con septo cercano al origen, clamidosporas globosas dispuestas en pares (cg); (b1) con neem, las fiálides fueron ligeramente más cortas (ssp). (c1-c3) *P. cinnamomi* sin aceite de neem mostró hifas cenocíticas con apariencia notoriamente torulosa (ht) y clamidosporas solitarias, apicales (schl) o agrupadas en racimos (cchl). (c4-c5) En contraste, el aceite de neem promovió hifas ligeramente torulosas (sth) y clamidosporas solitarias apicales de menor tamaño (sschl).

en Chile, Portugal y EUA. Estos patógenos fueron *Fusarium* sp. (Tapia y Amaro 2014), *Rhizoctonia* sp. (Sneh et al. 1991, Misra et al. 1994), *Ilyonectria* sp. (Cabral et al. 2012, Martínez-Díaz et al. 2018), y *Pythium* sp. y *P. cinnamomi* (Jeffers y Martin 1986, Erwin y Ribeiro 1996). Estos organismos, solos o en combinación, causan la pérdida de 28.2 a 63 % de los portainjertos de aguacate propagados en viveros comerciales de distintos países (Garbanzo y Coto 2017, Ramírez-Gil et al. 2017). El ataque simultáneo

de especies observado en esta investigación explica la alta letalidad de la enfermedad, que causa necrosis del cuello, de los cotiledones y de las raíces. Se ha demostrado que la diversidad y densidad de microorganismos presentes en viveros de aguacate dependen de factores como tipo de suelo, pH, contenido de materia orgánica, densidad y composición de la flora nativa, entre otros (Bures 1993, Ramírez-Gil et al. 2017). Para las condiciones físicas y químicas del sustrato utilizado en este estudio (textura franco-arcillosa,

CUADRO V. EFECTO DEL ACEITE DE NEEM EN EL INICIO DEL PERIODO DE FORMACIÓN DE CLAMIDOSPORAS Y/O OOSPORAS EN *Fusarium* sp., *Ilyonectria* sp., *Phytophthora cinnamomi* y *Pythium* sp. EN MEDIO DE CULTIVO PAPA-DEXTROSA-AGAR (PDA).

Inicio de formación de estructuras de resistencia (días)*				
Tratamiento**	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Ilyonectria</i> sp.	<i>P. cinnamomi</i>	<i>Pythium</i> sp.
T0	8.0 ± 0.19 a	7.0 ± 0.13 a	7.0 ± 0.50 a	7.0 ± 0.46 a
T1	0.0 ± 0.00 b	0.0 ± 0.00 b	11.0 ± 0.71 b	7.0 ± 0.65 a
T2	0.0 ± 0.00 b	0.0 ± 0.00 b	16.0 ± 1.00 c	7.0 ± 0.80 a
T3	0.0 ± 0.00 b	0.0 ± 0.00 b	21.0 ± 1.31 d	7.0 ± 0.57 a
Valor p	< 0.0001	< 0.0001	< 0.0001	1.000
CV (%)	23.3	23.3	18.4	24.6
R ²	0.96	0.95	0.84	0.89

*Días posteriores a la inoculación de *Fusarium* sp., *Ilyonectria* sp., *P. cinnamomi* y *Pythium* sp. en cajas Petri, adicionadas con aceite de neem (*Azadirachta indica* A. Juss.); **Tratamientos y coeficientes estadísticos: T0: testigo (sin aceite de neem); T1: 0.7 mL/L de aceite de neem (*Azadirachta indica*); T2: 1.4 mL/L; T3: 3.0 mL/L.

Valor p: probabilidad de error para rechazo de hipótesis nula (ausencia de diferencias significativas); CV: coeficiente de variación asociado a la precisión del modelo; R²: coeficiente de determinación que muestra la variabilidad debida a tratamientos.

Medias con la misma letra dentro de columnas no difieren estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$). Cada valor representa el valor medio de ocho unidades experimentales por tratamiento en un ensayo replicado tres veces.

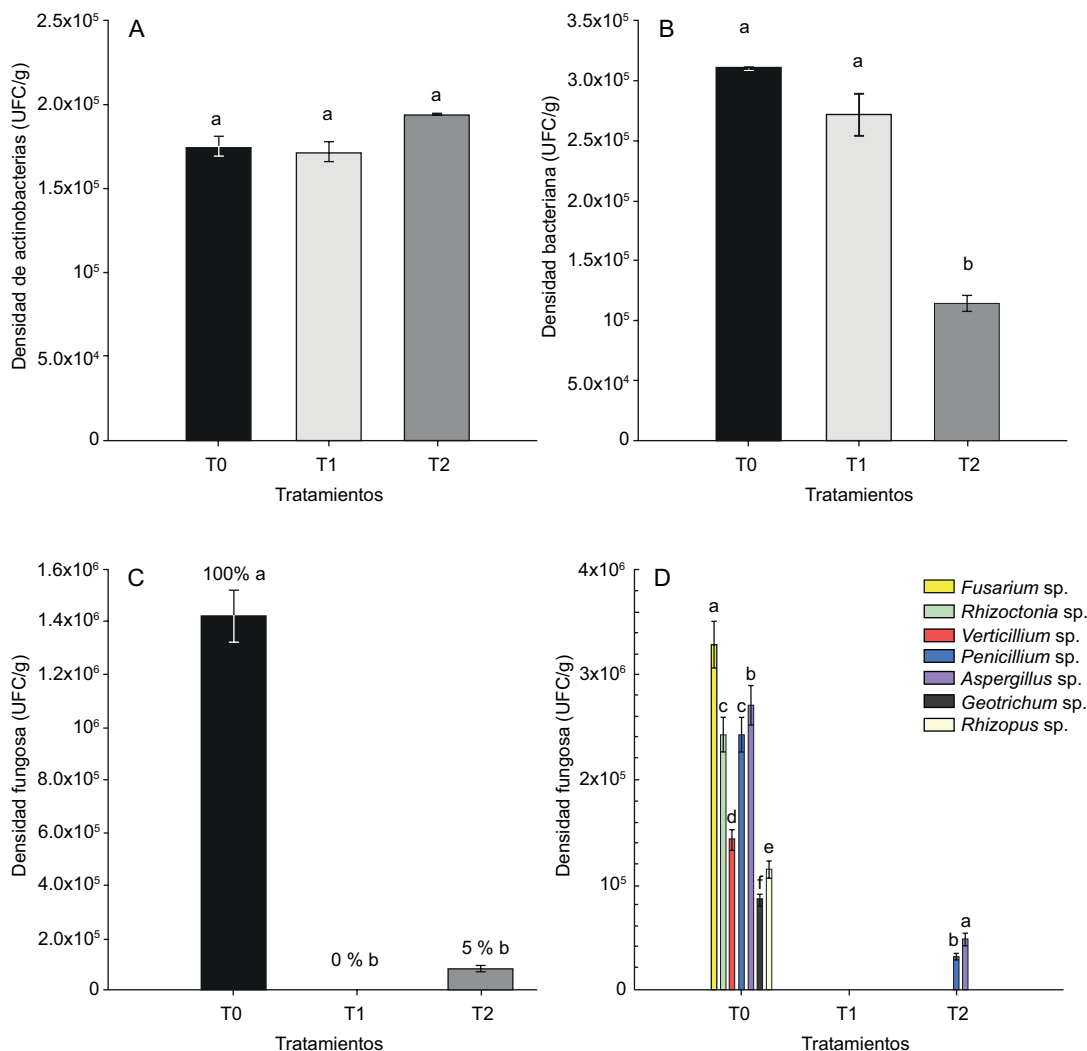


Fig. 6. (a) Densidad de actinobacterias, (b) densidad de bacterias, y (c y d), densidad fungosa (de hongos nativos) en un sustrato orgánico utilizado en un vivero de aguacate nativo *Persea americana* var. *drymifolia*, 62 días después de la aplicación de los tratamientos de fumigación [(c) poblaciones de hongos totales y (d) población residual de géneros fungosos). Las líneas de error representan los intervalos de confianza del valor medio. Barras con la misma letra no difieren estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$). (T2: suelo adicionado con aceite de neem [azadiractina]; T1: sustrato tratado con metano [N-metil ditiocarbamato de sodio]; T0: sustrato sin fumigación.)

MO 2.24 %, pH 6.8 y sin problemas de salinidad), *Fusarium* sp. y *Rhizoctonia* sp. fueron las especies aisladas con mayor frecuencia en portainjertos asintomáticos o con marchitez.

Los resultados mostraron que todos los microorganismos aislados fueron altamente sensibles a la azadiractina, con una mayor inhibición a la dosis más alta (3.0 mL/L). Esta actividad *in vitro* se ha estudiado frente a distintos patógenos fungosos de importancia económica (Jabeen et al. 2013, Kumari et al. 2013, Shrivastava y Swarnkar 2014). De acuerdo con Ferreira et al. (2010), los diámetros de colonias de *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis* (W.C. Snyder & H.N. Hansen) y *F. subglutinans* (Wollenw & Reinking) se redujeron de 50.5 a 59.75 % con extracto de neem (BioNeem) al 1 %. Similarmente, concentraciones de 0.5 a 3.5 % de extracto metanólico de neem inhibieron de 86 a 90 % el desarrollo de biomasa de *Sclerotium rolfsii* (Sacc.) en plantas de garbanzo (Khan et al. 2020). Un efecto óptimo fue reportado por Duong et al. (2014) y Nnam et al. (2022), quienes redujeron en la misma proporción el crecimiento de *R. solani* (J.G. Kühn), *S. rolfsii* y *A. flavus* (Link) con extracto de neem al 100 %, mientras que la efectividad de este fluctuó entre 90.35 y 95 % contra *Colletotrichum* spp. (Corda), *P. capsici* (Leonian), *A. niger* (Tiegh), *P. notatum* (Thom) y *Rhizopus nigricans* (Ehrenb.).

Esta investigación muestra el potencial del aceite de neem para su incorporación en tecnologías de manejo de hongos patógenos de raíces con dosis que pueden fluctuar de 1-1.86 mL/L (DE₅₀) a 4.85 mL/L (DE₉₀). Este hallazgo coincidió con los de Duong et al. (2014), quienes obtuvieron la DE₅₀ con dosis de 7.4, 3.0, 5.1 y 43.3 g/L de extracto de neem al 20 % contra *R. solani*, *S. rolfsii*, *Colletotrichum* spp. y *P. capsici*, respectivamente. Asimismo, según Mohamed et al. (2017), se requieren 13.67 y 14.71 ppm/L de nanoemulsiones de extracto de neem para inhibir en la misma proporción el desarrollo de *R. solani* y *S. rolfsii*.

El aceite de neem también afectó negativamente algunos procesos relacionados con la fisiología reproductiva de los patógenos estudiados. La dosis más alta (3.0 mL/L) redujo en mayor grado la esporulación y germinación de conidios de *Fusarium* sp. (15.9 y 6.7 %) e *Ilyonectria* sp. (10.8 y 2.7 %), respectivamente. En estudios previos se documentó que el aceite de neem, aplicado a 62.5 ppm de azadiractina al 55 %, redujo en 11 % la germinación de esporas de *Sphaerotheca fuliginea* (Schltdl.) Pollacci, y, sucesivamente, en 27.9-100, 43.2-100 y 70.3-100 % la viabilidad conidial de *C. gloeosporioides* (Penz) f. sp. *mangiferae*, *Curvularia lunata* (R.R. Nelson

& F.A. Haasis) y *Helminthosporium penniseti* (A.P. Misra) con azadiractina a concentraciones de 0.20 a 1.0 % (Coventry y Allan 2001, Kumari et al. 2013). A su vez, Ferreira et al. (2010) y da Costa et al. (2010) restringieron la esporulación de *F. oxysporum* f. sp. *medicaginis*, *F. subglutinans* y *A. flavus* en 70.22, 18.89-75.78 y 89 %, así como la viabilidad de conidios en 37.33, 79.55-85.33 y 96.25 %, respectivamente. Por otro lado, Alcalá et al. (2005) encontraron que el extracto de neem redujo la densidad de esclerocios de *S. rolfsii* en 49.3 % y retrasó en 21 días el inicio de la formación de estas estructuras, mientras que en el tratamiento testigo dicho lapso fue de ocho días. En esta investigación, la azadiractina modificó los patrones de crecimiento, textura, coloración, forma y tamaño de hifas, conidios, fiálides o clamidosporas, así como la densidad de esporulación y viabilidad en *Fusarium* sp., *Ilyonectria* sp., *Rhizoctonia* sp. y *P. cinnamomi*. Los resultados fueron concordantes con da Costa et al. (2010), quienes al usar aceite de neem (0.5-4 %) observaron conidióforos anormales o indiferenciados y patrón de ramificación de hifas atípico en el desarrollo de *A. flavus*. Estas observaciones evidencian el potencial antifúngico del neem, debido a que contiene azadiractina, un tetranor-triterpenoide inhibidor de la síntesis de quitinasa, la cual interviene en el desarrollo de la pared celular y la ramificación de hifas, así como en procesos de autólisis durante la esporulación y germinación de esporas (Campos et al. 2016); asimismo, limita la producción de tirosinasa necesaria para la diferenciación adecuada de estructuras reproductivas y esporas (Sheng 2009). Adicionalmente, este terpenoide modifica la composición de ácidos grasos de la membrana celular de bacterias, causando hidrofobicidad e inhibiendo la formación de peptidoglicano, lo que limita su supervivencia (Abd-Elmonsef et al. 2024). No obstante, en este trabajo el extracto de azadiractina no inhibió el desarrollo de *Pythium* sp. Es posible que esta especie no muestre sensibilidad a ciertos compuestos orgánicos específicos, como documentaron Sarwar et al. (1998), quienes también registraron ausencia de sensibilidad de este microorganismo a biofumigantes a base de especies de Brassicaceae en un complejo fungoso encontrado en cereales. La capacidad inhibitoria del aceite de neem observada *in vitro* también se reflejó en el sustrato de vivero tratado. La dosis de 3 mL/L redujo, en proporción directa respecto a las concentraciones inferiores evaluadas, la densidad de poblaciones totales de bacterias (hasta en 63.4 %) y hongos nativos (95 %), pero no de actinobacterias. Resultados similares fueron obtenidos por Wang et al. (2014) y Mocali et al. (2015), quienes, al incorporar

residuos de *Brassica napus* (Linnaeus) y *B. carinata* (A. Braun) al 0.4 % en dosis de 2.1 g/contenedor, redujeron la densidad de microorganismos parásitos en 33.8 % y simultáneamente incrementaron los nematodos bacteriófagos (77 %) y micófagos (6 %), así como las alfaproteobacterias, actinobacterias y Firmicutes en 32 %. En contraste, con dazomet al 0.03% y Vapam al 42 %, en dosis de 2.31 mL/contenedor, abatieron poblaciones de microorganismos parásitos hasta en 50 %, aunque sólo aumentaron la microflora benéfica en 21 %. Los mismos autores consignaron el efecto diferenciado de la biofumigación sobre la diversidad microbiana del suelo, ya que mientras con el tratamiento orgánico predominaron principalmente organismos no patógenos pertenecientes únicamente a los filos Basidiomycota y Ascomycota, así como nematodos del orden Dorylaimida, en el suelo tratado químicamente sólo se encontraron colonias de *F. oxysporum* (Schltdl.) y *F. solani* (Mart.) Sacc. De manera similar, Hu et al. (2015) documentaron que el uso de diferentes isotiocianatos redujo las poblaciones de hongos patógenos hasta 15 %, y aunque las bacterias gramnegativas, en general, no fueron afectadas, aumentaron hasta en 38% la diversidad de especies de Firmicutes y Actinobacteria, promotoras del crecimiento vegetal y antagonistas contra algunos patógenos con origen en el suelo (Czaban et al. 2004a, b, Huang et al. 2018). A su vez, Ibrahim (2021), redujo las UFC de *F. lateritium* (Ness) en 23.4 % e incrementó simultáneamente poblaciones benéficas nativas de *Aspergillus* spp. y *Penicillium* spp., con residuos de diferentes especies de Brassicaceae (Burnett).

CONCLUSIONES

Los resultados obtenidos mostraron que el aceite de neem puede inhibir directamente la germinación de esporas y el crecimiento micelial de hongos y pseudohongos que atacan las raíces de portainjertos de aguacate en Morelos, México, a la vez que incrementa la flora microbiana benéfica, al servir como alimento, y reduce la contaminación de los recursos naturales. Aun cuando la efectividad biofumigante del aceite de neem contra bacterias fue de 63.4 % y en hongos de 95 %, su eficiencia puede potenciarse si se combina con otras medidas de control físico o cultural, incorporadas en un modelo de manejo integrado de plagas (MIP). También se observó que es factible incrementar la dosis de aceite de neem para usarlo con mayor eficiencia en patosistemas de aguacate donde *Fusarium* sp. y *P. cinnamomi* son más prevalentes.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen a la Secretaría de Ciencia, Humanidades, Tecnología e Innovación (SECIHTI) por la beca otorgada al primer autor para realizar sus estudios de Maestría en Ciencias. Asimismo, al Sr. Gabriel Abdón Mendoza, productor y viverista de aguacate en Tetela del Volcán, Morelos, México, a profesores e investigadores adscritos al Colegio de Postgraduados en Ciencias Agrícolas y al Laboratorio Nacional de Investigación y Servicio Agroalimentario y Forestal, por las facilidades brindadas para realizar esta investigación.

REFERENCIAS

- Abd-Elmonsef M.G., Rashed M.N., El-Ganainy M.S. y Salem H.S. (2024). Unveiling the neem (*Azadirachta indica*) effects on biofilm formation of food-borne bacteria and the potential mechanism using a molecular docking approach. *Plants* 13 (18), 2669. <https://doi.org/10.3390/plants13182669>
- Agrios G.N. (2005). *Plant pathology*. 5a ed. Elsevier Academic Press, Burlington, EUA, 922 pp. <https://doi.org/10.1016/C2009-0-02037-6>
- Alcalá de M.D., Vargas N. y Pire A. (2005). Efecto de extractos vegetales y fungicidas sintéticos sobre el crecimiento micelial in vitro de *Sclerotium rolfsii* y *Thielaviopsis basicola*. *Revista de la Facultad de Agronomía* 22 (4), 315-323.
- Báez F., Perdomo C., Jaronski S., Villamizar L.F., Viera-Arroyo W., Kumar S.D.S., Tello C. y Pincay A. (2019). Manual de análisis de calidad para formulaciones con base en hongos biocontroladores. Manual No. 112. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Estación Experimental Santa Catalina, Mejía, Ecuador, 45 pp.
- Barnes B.R.J., Glaze-Corcaran S., Wick R. y Hashemi M. (2020). Biofumigation: An alternative strategy for the control of plant parasitic nematodes. *Journal of Integrative Agriculture* 19 (7), 1680-1690. [https://doi.org/10.1016/S2095-3119\(19\)62817-0](https://doi.org/10.1016/S2095-3119(19)62817-0)
- Barnett H. y Hunter B. (1998). *Illustrated genera of imperfect fungi*. 2a ed. APS Press, Minnesota, EUA, 197 pp.
- Barrientos P.A.F., Muñoz P.R., Borys W.M. y Martínez D.M.T. (2000). Cultivares y portainjertos del aguacate. En: *El aguacate y su manejo integrado* (Téliz D., Ed.). Ediciones Mundi-Prensa, Ciudad de México, 35-54.
- Barros A.F., Campos V.P., Silva J.C.P., López L.E., Silva A.P., Pozza E.A. y Pedrosa L.A. (2014). Tempo de exposição de juvenis de segundo estágio a voláteis emitidos por macerados de nim e de mostarda e biofu-

- migação contra *Meloidogyne incognita*. Nematrópica 44 (2), 190-199.
- Bures S. (1993). Aspectos químicos, físicos y biológicos de los sustratos. Congreso Internacional de Sustratos. Horticultura 86, 30-41.
- Cabral A., Groenewald Z.J., Rego C., Oliveira H. y Crous W.P. (2012). *Cylindrocarpon* root rot: Multi-gene analysis reveals novel species within the *Ilyonectria radicola* species complex. Mycological Progress 11, 655-688. <https://doi.org/10.1007/s11557-011-0777-7>
- Campos V.R.E., de Oliveira J.L., Pascoli M., de Lima R. y Fraceto F.L. (2016). Neem oil and crop protection: From now to the future. Frontiers in Plant Science 7 (1494), 1-8. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.01494>
- Coventry E. y Allan J.E. (2001). Microbiological and chemical analysis of neem (*Azadirachta indica*) extracts: New data on antimicrobial activity. Phyto-parasitica 29 (5), 441-450. <https://doi.org/10.1007/BF02981863>
- Czaban J., Ksiezniak A. y Paszkowski A. (2004a). An attempt to protect winter wheat against *Fusarium culmorum* by the use of rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus mycoides*. Polish Journal of Microbiology 53 (3), 175-182.
- Czaban J., Ksiezniak A., Wroblewska B. y Paszkowski W.L. (2004b). An attempt to protect winter wheat against *Gaeumannomyces graminis* var. *tritici* by the use of rhizobacteria *Pseudomonas fluorescens* and *Bacillus mycoides*. Polish Journal of Microbiology 53 (2), 101-110.
- Da Costa L.C., Geraldo R.F.M., Arroteia C.C. y Kemmelmeier C. (2010). In vitro activity of neem oil [*Azadirachta indica* A. Juss (*Meliaceae*)] on *Aspergillus flavus* growth, sporulation, viability of spores, morphology and aflatoxins B1 and B2 production. Advances in Bioscience and Biotechnology 1 (4), 292-299. <https://doi.org/10.4236/abb.2010.14038>
- Daneel M., Engelbrecht E., Fourie H. y Ahuja P. (2018). The host status of Brassicaceae to *Meloidogyne* and their effects as cover and biofumigant crops on root-knot nematode populations associated with potato and tomato under South African field conditions. Crop Protection 110, 198-206. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.09.001>
- De Cock A.W.A.M., Lodhi A.M., Rintoul T.L., Bala K., Robideau G.P., Abad Z.G., Coffey M.D., Shahzad S. y Lévesque C.A. (2015). *Phytophthora*: Molecular phylogeny and systematics. Personalia 34, 25-39. <https://doi.org/10.3767/003158515X685382>
- Duong H.D., Quang X.N., Giap D.D., Hong A.T.L., Thanh V.N. y Smol N. (2014). Effective control of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) cake to plant parasitic nematodes and fungi in black pepper diseases in vitro. Vietnamese Environment 6 (3), 233-238. <https://doi.org/10.13141/jve.vol6.no3.pp233-238>
- Erwin D.C. y Ribeiro O.K. (1996). *Phytophthora* diseases worldwide. American Phytopathological Society Press, St. Paul, MN, EUA, 562 pp.
- FAOSTAT (2023). Base de datos estadísticas corporativas de la Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura [en línea]. <http://www.fao.org/faostat/es/?#data/QC/visualize> 31/10/2025
- Ferreira G.M.R., Arroteia C.C. y Kemmelmeier C. (2010). The effects of neem [*Azadirachta indica* A. Juss (*Meliaceae*)] oil on *Fusarium oxysporum* f. sp. *medicaginis* and *Fusarium subglutinans* and the production of fusaric acid toxin. Advances in Bioscience and Biotechnology 1 (1), 1-6. <https://doi.org/10.4236/abb.2010.11001>
- Garbanzo S.M. y Coto A.A. (2017). Manual para el establecimiento y manejo de un vivero de aguacate (*Persea americana* Mill). Ministerio de Agricultura y Ganadería. Sector Agroalimentario. San José, Costa Rica, 43 pp.
- Geethanjali R., Aathiya V., Pratibha K. y Marhoob B. (2023). Antifungal assay by poisoned food technique. World Journal of Pharmaceutical Research 12 (9), 1768-1775.
- Hanschen S.F. y Winkelmann T. (2020). Biofumigation for fighting replant disease-A review. Agronomy 10 (3), 425. <https://doi.org/10.3390/agronomy10030425>
- Hernández P.B. y Brito H.E. (2014). Detección de *Phytophthora cinnamomi* por técnicas moleculares. Revista Granja Agropecuaria 21, 72-75.
- Hu P., Hollister B.E., Somenahally C.A., Hons M.F. y Gentry J.T. (2015). Soil bacterial and fungal communities respond differently to various isothiocyanates added for biofumigation. Frontiers in Microbiology 5, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00729>
- Huang S.J., Peng H.Y., Chung R.K. y Huang W.J. (2018). Suppressive efficacy of volatile compounds produced by *Bacillus mycoides* on damping-off pathogens of cabbage seedlings. Agricultural Science 156 (6), 795-809. <https://doi.org/10.1017/S0021859618000746>
- Ibrahim M.M. (2021). The effect of biofumigation with various Brassicaceae plants on the number and diversity of soil-borne fungi in Arish city Egypt. Catrina: The International Journal of Environmental Sciences 24 (1), 81-88. <https://doi.org/10.21608/cat.2022.83230.1089>
- Izquierdo A.J. y Hosfield L.G. (1982). A simplified procedure for making cleft-grafts and its utility for evaluating roots of common beans. HortScience 17 (5), 750-752. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.17.5.750>
- Jabeen R., Manzoor M., Irfan S. y Iftikhar T. (2013). Potential of azadirachtin-d fraction against bacterial leaf blight disease in rice caused by *Xanthomonas*

- oryzae* pv. *Oryzae*. Pakistan Journal of Botany 45 (5), 1789-1794.
- Jeffers N.S. y Martin B.S. (1986). Comparison of two media selective for *Phytophthora* and *Pythium* species. Plant Disease 70, 1038-1043. <https://doi.org/10.1094/pd-70-1038>
- Jemai N., Gargouri S., Hemissi I., Mahmoud B.K., Ksouri F.M. y Jemmali A. (2021). *Rhizoctonia solani* affecting micropropagated garnem (*Prunus amygdalus* x *Prunus persica*) rootstock – characterization and biocontrol with *Rhizobia*. Journal of Plant Pathology 103, 207-215. <https://doi.org/10.1007/s42161-020-00712-1>
- Keta J.N., Suberú H.A., Shehu K., Yahayya U., Mohammad N.K. y Gudú G.B. (2019). Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) leaf extract on the growth of *Aspergillus* species isolated from foliar diseases of rice (*Oryza sativa*). Science World Journal 14 (1), 98-102.
- Khan H.I., Javaid A., al-Taie H.A. y Ahmed D. (2020). Use of neem leaves as soil amendment for the control of collar rot disease of chickpea. Egyptian Journal of Biological Pest Control 30 (98), 1-8. <https://doi.org/10.1186/s41938-020-00299-w>
- Kirkegaard J.A., Sarwar M., Wong W.P.T., Mead A., Howe G. y Newell M. (2000). Field studies on the biofumigation of take-all by *Brassica* break crops. Australian Journal of Agricultural Research 51, 445-456. <https://doi.org/10.1071/AR99106>
- Kumar S., Bhanjana G., Sharma A., Sidhu C.M. y Neeraj D. (2014). Synthesis, characterization and on field evaluation of pesticide loaded sodium alginate nanoparticles. Carbohydrate Polymers 101, 1061-1067. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.10.025>
- Kumari A., Kumar R., Maurya S., Choudhary S.J. y Kumar S. (2013). Antifungal efficacy of aqueous extracts of neem cake, karanj cake and vermicompost against some phytopathogenic fungi. The Bioscan 8 (2), 671-674.
- Lucantoni L., Giusti F., Cristofaro M., Pasqualini L., Esposito F., Lupetti P. y Habluetzel A. (2006). Effects of a neem extract on blood feeding, oviposition and oocyte ultrastructure in *Anopheles stephensi* Liston (Diptera: Culicidae). Tissue and Cell 38 (6), 361-371. <https://doi.org/10.1016/j.tice.2006.08.005>
- Martínez-Díaz M.P., Díaz-Losada E., Armengol J., León M., Berlanas C., Andrés-Sodupe M. y Gramaje D. (2018). First report of *Ilyonectria robusta* causing black foot disease of grapevine in Spain. Plant Disease 102 (11), 2381-2381. <https://doi.org/10.1094/PDIS-05-18-0730-PDN>
- Ming-Tsung Y., Joan-Hwa Y. y Jeng-Leun M. (2008). Antioxidant properties of chitosan from crab shells. Carbohydrate Polymers 74 (4), 840-844. <https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2008.05.003>
- Misra J.K., Merca S.D. y Mew T.W. (1994). Fungal pathogens. En: A manual of rice seed health testing (Mew T.W., Ed.). Research Institute, Manila, Filipinas, 75-89.
- Mocali S., Landi S., Curto G., Dallavalle E., Infantino A., Colzi C., d'Errico G., Roversi F.P., D'Avino L. y Lazzeri L. (2015). Resilience of soil microbial and nematode communities after biofumigant treatment with defatted seed meals. Industrial Crops and Products 75, 79-90. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.04.031>
- Mohamed A.E.O., Shakil A.N., Rana S.V., Sarkar J.D., Majumder S., Kaushik P., Singh B.B. y Kumar J. (2017). Antifungal activity of nano emulsions of neem and citronella oils against phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Industrial Crops and Products 108, 379-387. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.06.061>
- Molina V.L.F. y Melo M.S.E. (2010). Importance of the statistical method applied to calculate the EC₅₀ and EC₉₅ of some isothiocyanates evaluated against *Rhizoctonia solani* Kühn. Agronomía Colombiana 28 (2), 235-244.
- Mossini A.G.S., Arrotéia C.C. y Kimmelmeier C. (2009). Effect of neem leaf extract and neem oil on *Penicillium* growth, sporulation, morphology and ochratoxin A production. Toxins 1 (1), 3-13. <https://doi.org/10.3390/toxins1010003>
- Motisi N., Doré T., Lucas P. y Montfort F. (2010). Dealing with the variability in biofumigation efficacy through an epidemiological framework. Soil Biology and Biochemistry 42 (12), 2044-2057. <https://doi.org/10.1016/j.soilbio.2010.08.016>
- Nnam R.E., Onyemachi V.C., Okoro N.U. y Nwaorgu I.S.E. (2022). Microbial inhibitory potency of oven-dried mechanically extracted neem seed oil for eco-friendly pest control in food system. International Journal of Scientific Research in Biological Sciences 9 (2), 35-43.
- Ntalli N., Monokrousos N., Rumbos C., Kontea D., Zioga D., Argyropoulou D.M., Menkissoglu-Spiroudi U. y Tsiropoulos G.N. (2018). Greenhouse biofumigation with *Melia azedarach* controls *Meloidogyne* spp. and enhances soil biological activity. Journal of Pest Science 91, 29-40. <https://doi.org/10.1007/s10340-017-0909-1>
- Nyoni M., Mazzola M., Wessels B.J.P. y McLeod A. (2019). The efficacy of semiselective chemicals and chloropicrin/1,3-dichloropropene-containing fumigants in managing apple replant disease in South Africa. Plant Disease 103 (6), 1363-1373. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-18-1844-RE>
- Pegg F.G. y Brady L.B. (2002). *Verticillium* Wilts. CAB International, Nueva York, EUA, 552 pp. <https://doi.org/10.1079/9780851995298.0000>

- Peñuelas-Rubio O., Arellano-Gil M., Vargas-Arispuro I.C., Lares-Villa F., Cantú-Soto E.U., Hernández-Rodríguez S.E., Gutiérrez-Coronado M.A. y Mungarro-Ibarra C. (2015). Bioactividad in vitro de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición de hongos Poscosecha: *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, *Penicillium polonicum* y *Rhizopus oryzae*. *Polibotánica* 40, 183-198. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.12>
- Peraza M.A.Y. (2021). Propagación de aguacate y selección de plantas en vivero. En: Manual para el establecimiento del cultivo de aguacate en la zona centro norte de Sinaloa (Calderón V.C.L., Ed.). Consejo para el Desarrollo Económico de Sinaloa, Sinaloa, México, 25-33.
- Pérez D. y García-Godos P. (2019). Identificación del agente causal del marchitamiento en *Caesalpinia spinosa* “tara” y el efecto antagónico de aislados de *Bacillus* spp. y *Trichoderma* sp. *Ecología Aplicada* 18 (1), 51-57. <https://doi.org/10.21704/rea.v18i1.1306>
- Pijoan M. (2004). El neem: “la farmacia de la aldea”. *Etnofarmacia* 23 (5), 128-133.
- Ramírez G. y Morales J. (2013). Primer informe de *Cylindrocarpon destructans* (Zinss) Scholten afectando plántulas de aguacate (*Persea americana* Mill) en Colombia. *Protección Vegetal* 28 (1), 27-35.
- Ramírez G.J.G., Castañeda S.D.A. y Morales O.J.G. (2013). Estudios etiológicos de la marchitez del aguacate en Antioquia-Colombia. *Revista Ceres, Viçosa* 61 (1), 050-061. <https://doi.org/10.1590/S0034-737X2014000100007>
- Ramírez-Gil J.G., Gilchrist R.E. y Morales O.J.G. (2017). Economic impact of the avocado (cv. Hass) wilt disease complex in Antioquia, Colombia, crops under different technological management levels. *Crop Protection* 101, 103-115. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.023>
- Rudolph E.R., Sams C., Steiner R., Thomas H.S., Walker S. y Uchanski E.M. (2015). Biofumigation performance of four *Brassica* crops in a green chile pepper (*Capsicum annuum*) rotation system in southern New Mexico. *Horticultural Science* 50 (2), 247-253. <https://doi.org/10.21273/HORTSCI.50.2.247>
- Rudolph E.R., Zasadab A.I., Hesseb C. y DeVetterc W.L. (2019). Brassicaceous seed meal, root removal, and chemical fumigation vary in their effects on soil quality parameters and *Pratylenchus penetrans* in a replanted florican raspberry production system. *Applied Soil Ecology* 133, 44-51. <https://doi.org/10.1016/j.apsoil.2018.08.024>
- Saltarén L.F. y Varón de A.F. (1997). *Cylindrocladium* sp. asociado con muerte de plántulas de aguacate (*Persea americana* Mill.) en viveros del Valle y Risaralda. *Fitopatología Colombiana* 23 (4), 40-42.
- Sarwar M., Kirkegaard J.A., Wong P.T.W. y Desmarchelier J.M. (1998). Biofumigation potential of brassicas. *Plant and Soil* 201, 103-112. <https://doi.org/10.1023/A:1004381129991>
- SAS (2002). Version 9.0. Statistical Analysis System Institute, Cary, NC, EUA [en línea]. https://www.sas.com/es_mx/software/stat.html 04/04/2025
- Scandiani M.M., Ruberti S.D., Giorda M.L., Pioli N.R., Luque G.A., Bottai H., Ivancovich J.J., Aoki T. y O'Donnell K. (2011). Comparison of inoculation methods for characterizing relative aggressiveness of two soybean sudden-death syndrome pathogens *Fusarium virguliforme* and *F. tucumaniae*. *Tropical Plant Pathology* 36 (3), 133-140. <https://doi.org/10.1590/S1982-56762011000300001>
- Schroeder L.K., Martin N.F., de Cock W.A.M.A., Lévesque C.A., Spies F.J.C., Okubara A.P. y Paulitz C.T. (2013). Molecular detection and quantification of *Pythium* species: Evolving taxonomy, new tools, and challenges. *Plant Disease* 97 (1), 4-20. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-12-0243-FE>
- Shapiro S.S. y Wilk M.B. (1965). An analysis of variance test for normality (complete samples). *Biometrika* 52, 591-611. <https://doi.org/10.1093/biomet/52.3-4.591>
- Sheng C.T. (2009). An updated review of tyrosinase inhibitors. *Molecular Sciences* 10 (6), 2440-2475. <https://doi.org/10.3390/ijms10062440>
- Shrivastava D.K. y Swarnkar K. (2014). Antifungal activity of leaf extract of neem (*Azadirachta Indica* Linn). *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences* 3 (5), 305-308.
- Sneh B., Burpee L. y Ogoshi A. (1991). Identification of *Rhizoctonia* species. APS Press, St. Paul, EUA, 133 pp. <https://doi.org/10.1017/S0021859600074323>
- Steiner G.W. y Watson R.D. (1965). Use of surfactants in the soil dilution and plate count method. *Phytopathology* 55, 728-730.
- Tapia C. y Amaro J. (2014). Género *Fusarium*: retrato microbiológico. *Revista Chilena de Infectología* 31 (1), 85-86.
- Tetlow S.K. y Vincent M.J. (1947). Distortion of fungal hyphae in the presence of certain inhibitors. *Nature* 159, 850. <https://doi.org/10.1038/159850b0>
- Truong H.H.T., Ki-Taek K., Su K., Myoung-Cheol C., Hyun-Ran K. y Jong-Gyu W. (2011). Development of gene-based markers for the Bs2 bacterial spot resistance gene for marker-assisted selection in pepper (*Capsicum* spp.). *Horticulture, Environment and Biotechnology* 52 (1), 65-73. <https://doi.org/10.1007/s13580-011-0142-4>
- Vélez P.A., Posada F.J., Marín P., González M.T., Osorio E. y Bustillo A. (1997). Técnicas para el control de calidad de formulaciones de hongos entomopatógenos. 17a ed. Chinchiná, Caldas, Colombia, 37 pp.

- Viera W., Noboa M., Bermeo J., Báez F. y Jackson T. (2018). Parámetros de calidad de cuatro tipos de formulaciones a base de *Trichoderma asperellum* y *Purpuricillium lilacinum*. Enfoque UTE 9 (4), 145-153. <https://doi.org/10.29019/enfoqueute.v9n4.348>
- Wang Q., Ma Y. Yang H. y Chang Z. (2014). Effect of biofumigation and chemical fumigation on soil microbial community structure and control of pepper *Phytophthora* blight. World Journal of Microbiology and Biotechnology 30, 507-518. <https://doi.org/10.1007/s11274-013-1462-6>