



**UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO**

**POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

ECOLOGÍA

**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ASOCIACIÓN DE CULTIVOS EN LA RESISTENCIA DEL  
FRIJOL COMÚN, *Phaseolus vulgaris*, CONTRA PATÓGENOS.**

**TESIS**

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**XICOTENCATL CAMACHO CORONEL**

**TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. MARTIN HEIL**

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS, UNIDAD IRAPUATO, IPN.

**COTUTORA DE TESIS: Dra. MARÍA GRACIELA GARCÍA GUZMÁN**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.

**COMITÉ TUTOR: Dra. ANA LUISA ANAYA LANG**

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.

**MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2015**



Universidad Nacional  
Autónoma de México



**UNAM – Dirección General de Bibliotecas**  
**Tesis Digitales**  
**Restricciones de uso**

**DERECHOS RESERVADOS ©**  
**PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL**

Todo el material contenido en esta tesis esta protegido por la Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México).

El uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde la obtuvo mencionando el autor o autores. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.









# UNIVERSIDAD NACIONAL AUTÓNOMA DE MÉXICO

POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

INSTITUTO DE ECOLOGÍA

ECOLOGÍA

EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ASOCIACIÓN DE CULTIVOS EN LA RESISTENCIA DEL  
FRIJOL COMÚN, *Phaseolus vulgaris*, CONTRA PATÓGENOS.

## TESIS

QUE PARA OPTAR POR EL GRADO DE:

**MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

PRESENTA:

**XICOTENCATL CAMACHO CORONEL**

TUTOR PRINCIPAL DE TESIS: Dr. MARTIN HEIL

CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y ESTUDIOS AVANZADOS, UNIDAD IRAPUATO, IPN.

COTUTORA DE TESIS: Dra. MARÍA GRACIELA GARCÍA GUZMÁN

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.

COMITÉ TUTOR: Dra. ANA LUISA ANAYA LANG

INSTITUTO DE ECOLOGÍA, UNAM.

MÉXICO, D.F. AGOSTO, 2015



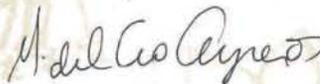
**Dr. Isidro Ávila Martínez**  
Director General de Administración Escolar, UNAM  
Presente

Me permito informar a usted, que el Subcomité de Ecología y Manejo Integral de Ecosistemas, en su sesión ordinaria del día 27 de abril de 2015, aprobó el jurado para la presentación de su examen para obtener el grado de **MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS** del alumno **CAMACHO CORONEL XICOTENCATL** con número de cuenta **406027737** con la tesis titulada "**EVALUACIÓN DEL EFECTO DE LA ASOCIACIÓN DE CULTIVOS EN LA RESISTENCIA DEL FRIJOL COMÚN, *Phaseolus vulgaris*, CONTRA PATÓGENOS**", bajo la dirección del **DR. MARTIN HEIL** y la co-tutoría de la **DRA. MARÍA GRACIELA GARCÍA GUZMÁN**:

Presidente: DR. JUAN SERVANDO NÚÑEZ FARFÁN  
Vocal: DR. RICARDO REYES CHILPA  
Secretario: DRA. ANA LUISA ANAYA LANG  
Suplente: DR. RODOLFO DE LA TORRE ALMARAZ  
Suplente: DR. FRANCISCO JAVIER ESPINOSA GARCÍA

Sin otro particular, me es grato enviarle un cordial saludo.

**ATENTAMENTE**  
"POR MI RAZA HABLARA EL ESPIRITU"  
Cd. Universitaria, D.F., a 19 de agosto de 2015.



**DRA. MARÍA DEL CORO ARIZMENDI ARRIAGA**  
COORDINADORA DEL PROGRAMA



c.c.p. Expediente del (la) interesado (a).



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Posgrado en Ciencias Biológicas, UNAM.

Al Consejo Nacional de la Ciencia y Tecnología (CONACYT) por la beca otorgada con número de becario 288714.

A los miembros del comité tutor: Dr. Martin Heil, la Dra. María Graciela García Guzmán y la Dra. Ana Luisa Anaya Lang.



## **AGRADECIMIENTOS A TÍTULO PERSONAL**

A todas aquellas personas que aprecio.

- Mis padres, José Camacho Pérez y María Rosalinda Coronel Rueda, por haberme permitido vivir y disfrutar de todas las cosas que he conocido y que me han sucedido. También les agradezco haber cuidado de mí durante estos ya 27 (casi 28) años.
- A mi novia, Navid B. Pacheco Gutiérrez, por tomar la decisión de alejarse de su familia y acompañarme en esta aventura a 300 km de nuestros hogares; en donde hemos aprendido a convivir y a disfrutar de nuestra felicidad y de nuestras discrepancias
- Un especial agradecimiento a Teresa Pérez Carbajal por ayudarme siempre con los papeleos del Instituto de ecología, a los cuales nunca pude asistir personalmente.
- A mis compañeros del Laboratorio de Ecología de Plantas, en el CINVESTAV-Irapuato, a Rosa María Adame Álvarez, por su apoyo, regaños y sinceridad; a Ariana Navarro Melendez, por soportarme como compañero de mesa; a Elizabeth, Omar, Hugo, Rosario, itahi, Dalia, Adán ..... Y los que no recuerde en este momento, que me disculpen.



# ÍNDICE DE CONTENIDO

## ÍNDICE DE CONTENIDO

|   |    |
|---|----|
| ÍNDICE DE CONTENIDO.....                                  | 13 |
| ÍNDICE DE FIGURAS. ....                                   | 15 |
| ÍNDICE DE TABLAS.....                                     | 17 |
| RESUMEN.....  | 19 |
| ABSTRACT.....   | 21 |
| INTRODUCCIÓN.....   | 23 |
| ANTECEDENTES.....   | 27 |
| Agrosistemas.....   | 27 |
| Competencia y facilitación.....                           | 27 |
| Compuestos orgánicos volátiles y protección vegetal.....  | 29 |
| Estudio de los compuestos orgánicos volátiles.....        | 31 |
| HIPÓTESIS.....  | 33 |
| OBJETIVOS.....  | 33 |
| METODOLOGÍA.....  | 35 |
| Estrategia experimental.....                              | 35 |
| Especie en estudio.....                                   | 35 |
| Especies de plantas aromáticas utilizadas.....            | 36 |
| Área de trabajo.....                                      | 37 |
| Origen del material biológico utilizado.....              | 37 |
| Diseño experimental.....                                  | 38 |
| Manejo del experimento en condiciones de campo.....       | 38 |
| Parámetros físico-químicos del suelo.....                 | 38 |
| Inoculación de conidios de <i>C. lindemuthianum</i> ..... | 39 |
| Curva de incremento de ácido salicílico.....              | 40 |
| Extracción y cuantificación de ácido salicílico.....      | 40 |
| Extracción y cuantificación de ergosterol.....            | 42 |
| Área foliar total y dañada.....                           | 42 |
| Parámetros de rendimiento.....                            | 43 |

|   |    |
|---|----|
| Cultivos en campo .....   | 43 |
| Manejo del experimento en condiciones de invernadero.....   | 44 |
| Germinación de semillas de frijol asociadas a semillas.....   | 45 |
| Germinación de semillas de frijol asociadas a plántulas.....  | 45 |
| Germinación de conidios de <i>C. lindemuthianum</i> .....   | 46 |
| Vías de percepción de compuestos volátiles.....   | 46 |
| Determinación del tiempo de exposición de las fibras SPME.....  | 48 |
| Determinación de los compuestos orgánicos volátiles.....  | 48 |
| Determinación de los compuestos volátiles representativos.....  | 49 |
| RESULTADOS.....   | 50 |
| RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA DE PROCESOS DE FACILITACIÓN EN CAMPO.....   | 50 |
| Características edáficas .....  | 50 |
| Área foliar en campo .....  | 51 |
| Daño foliar en campo .....  | 51 |
| Ácido salicílico en campo.....  | 53 |
| Ergosterol en campo .....   | 55 |
| Rendimiento de cosecha en campo.....  | 57 |
| RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN SU PAPEL DENTRO DE<br>LOS PROCESOS DE FACILITACIÓN.....      | 57 |
| Efectos de la asociación de especies en la germinación de semillas y conidios, bajo<br>condiciones de invernadero ..... | 57 |
| Área foliar en invernadero .....  | 59 |
| Determinación de compuestos orgánicos volátiles .....   | 61 |
| DISCUSIÓN.....  | 65 |
| Características físico-químicas del suelo.....  | 65 |
| Efecto en el incremento de área foliar.....   | 66 |
| Disminución en el daño foliar.....  | 67 |
| CONCLUSIONES.....   | 70 |
| LITERATURA .....  | 70 |

## ÍNDICE DE FIGURAS.

|   |    |
|---|----|
| <i>FIGURA 1 REPRESENTACIÓN DE UNA PARCELA (UNIDAD EXPERIMENTAL) DONDE SE CULTIVARON PLANTAS DE FRIJOL INTERCALADAS CON OTRAS ESPECIES DE PLANTAS AROMÁTICAS. SE UTILIZÓ UN TOTAL DE 25 PARCELAS, 5 REPETICIONES PARA CADA TRATAMIENTO.</i> .....  | 44 |
| <i>FIGURA 2 REPRESENTACIÓN DE LOS TRES TRATAMIENTOS DEL PRIMER EXPERIMENTO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE FRIJOL, EN DONDE SE COLOCARON SEMILLAS DE LAS DIFERENTES ESPECIES DENTRO DE CAJAS PLÁSTICAS.</i> .....   | 45 |
| <i>FIGURA 3 REPRESENTACIÓN DE LOS DOS TRATAMIENTOS Y DOS CONTROLES DEL SEGUNDO EXPERIMENTO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE FRIJOL, EN DONDE SE COLOCARON SEMILLAS DE FRIJOL ASOCIADAS A PLÁNTULAS DE LA MISMA O DE OTRAS ESPECIES, DENTRO DE CAJAS PLÁSTICAS.</i> .....   | 46 |
| <i>FIGURA 4 REPRESENTACIÓN DE LOS CUATRO TRATAMIENTOS DEL TERCER EXPERIMENTO EN INVERNADERO PARA EVALUAR EL EFECTO DE LAS VÍAS DE SEÑALIZACIÓN (AÉREA O SUBTERRÁNEA) EN EL DESARROLLO DE LAS PLANTAS DE FRIJOL.</i> .....   | 47 |
| <i>FIGURA 5 REPRESENTACIÓN DEL EXPERIMENTO REALIZADO PARA TOMAR MUESTRAS DE</i> .....   | 49 |
| <i>FIGURA 6 ÁREA FOLIAR DE PLANTAS DEL FRIJOL CULTIVADAS EN COMBINACIÓN CON DIFERENTES ESPECIES, DURANTE EL PERIODO JULIO-OCTUBRE DEL 2013. (MEDIA +/- EE, N= 19, 9, 5 Y 5 RESPECTIVAMENTE PARA CADA SEMANA). DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS REPRESENTADAS CON (*), TUKEY: P&lt; 0.05.</i> .....   | 50 |
| <i>FIGURA 7 ÁREA FOLIAR DE PLANTAS DE FRIJOL DEL PERIODO FEBRERO-ABRIL DEL 2014 (MEDIA +/- EE, N= 12 Y 6 RESPECTIVAMENTE PARA CADA SEMANA, DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (*) CON EL CONTROL DE CADA SEMANA, DE ACUERDO A PRUEBA DE TUKEY (P&lt; 0.05).</i> .....  | 51 |
| <i>FIGURA 8 DAÑO POR HERBÍVOROS Y PATÓGENOS DEL EL PERIODO JULIO-OCTUBRE DEL 2013 (MEDIA +/- EE, N= 19, 9, 5 Y 5 RESPECTIVAMENTE PARA CADA SEMANA).</i> .....   | 52 |
| <i>FIGURA 9 DAÑO POR HERBIVORÍA DEL PERIODO FEBRERO-ABRIL DEL 2014. (MEDIA +/- EE, N= 12 Y 6 RESPECTIVAMENTE PARA CADA SEMANA, DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (*) CON EL CONTROL DE CADA SEMANA, DE ACUERDO A TUKEY (P&lt; 0.05).</i> .....  | 52 |
| <i>FIGURA 10 RELACIÓN DAÑO FOLIAR/ÁREA FOLIAR TOTAL A 6 SEMANAS POSTERIORES A LA GERMINACIÓN DE LAS PLANTAS DE FRIJOL, DURANTE EL PERIODO DE CULTIVO FEBRERO-ABRIL DEL 2014 (MEDIA +/- EE, N=13, FRIJOL; 12, ALBAHACA Y 10, CEMPAZÚCHITL, DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (*) CON EL CONTROL DE CADA VARIABLE, DE ACUERDO A TUKEY (P&lt; 0.05).</i> .....   | 53 |
| <i>FIGURA 11 INCREMENTO DE LA CONCENTRACIÓN DE ÁCIDO SALICÍLICO LIBRE EN PLANTAS DE FRIJOL VARIEDAD FLOR DE JUNIO MARCELA, A DIFERENTES TIEMPOS POSTERIORES A LA INOCULACIÓN DE CONIDIOS DE COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM.</i> .....  | 54 |
| <i>FIGURA 12 INCREMENTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO LIBRE EN TEJIDO FOLIAR DE FRIJOL INOCULADO CON CONIDIOS DE COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM, EN EL PERIODO JULIO-OCTUBRE DEL 2013 (MEDIA +/- EE, N=5).</i> .....  | 54 |
| <i>FIGURA 13 INCREMENTO DEL ÁCIDO SALICÍLICO LIBRE EN TEJIDO FOLIAR DE FRIJOL INOCULADO CON CONIDIOS DE COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM, EN EL PERIODO FEBRERO-ABRIL DEL 2014. (MEDIA +/- EE, N=5). LA LÍNEA NEGRA REPRESENTA GRUPOS CONTROL EXTRA, SIN INOCULACIÓN DE PATÓGENO Y CON UNA SECUENCIA DE MUESTREO IGUAL A LOS TRATAMIENTOS; EL SOMBREADO REPRESENTA EL ERROR ESTÁNDAR DE ESOS GRUPOS CONTROL.</i> ..... | 55 |
| <i>FIGURA 14 CONCENTRACIÓN DE ERGOSTEROL EN TEJIDO FOLIAR DE PLANTAS DE FRIJOL POS-INOCULACIÓN DE COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM. PERIODO JULIO-OCTUBRE DEL 2013 (MEDIA +/- EE, N=5).</i> .....  | 56 |
| <i>FIGURA 15 CONCENTRACIONES DE ERGOSTEROL EN TEJIDO FOLIAR DE PLANTAS DE FRIJOL POSINFECTADOS POR COLLETOTRICHUM LINDEMUTHIANUM. PERIODO FEBRERO-ABRIL DEL 2014 (MEDIA +/- EE, N= 10,</i>  |    |

|  |    |
|--|----|
| DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (*) CON EL CONTROL, DE ACUERDO A TUKEY (P<0.05).<br>.....  | 56 |
| FIGURA 16 PRODUCCIÓN DE VAINAS POR PLANTA DE FRIJOL. LAS BARRAS CON EL NÚMERO 1 SE REFIEREN AL PERIODO JULIO-OCTUBRE DEL 2013 (MEDIA +/- EE, N= 11, 15, 18, 15, 12 RESPECTIVAMENTE PARA CADA TRATAMIENTO). LAS BARRAS CON EL NÚMERO 2 CORRESPONDEN AL PERIODO FEBRERO-ABRIL DEL 2014 (MEDIA +/- EE, N= 10 PARA TODOS LOS TRATAMIENTOS.....   | 57 |
| FIGURA 17 PORCENTAJE ACUMULADO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE FRIJOL ASOCIADAS A SEMILLAS DE FRIJOL, DE ALBAHACA O DE CEMPAZÚCHITL. (MEDIA +/- EE, N= 4). DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (*) CON EL CONTROL DE LA MISMA HORA, DE ACUERDO A TUKEY (P<0.05). ....  | 58 |
| FIGURA 18 PORCENTAJE ACUMULADO DE GERMINACIÓN DE SEMILLAS DE FRIJOL ASOCIADAS A PLÁNTULAS DE FRIJOL, DE ALBAHACA O DE CEMPAZÚCHITL, Y UN CONTROL DE SEMILLAS DE FRIJOL ASOCIADAS A SEMILLAS DE FRIJOL (MEDIA +/- EE, N= 10). ....  | 58 |
| FIGURA 19 PORCENTAJE DE GERMINACIÓN DE CONIDIOS A LAS 24 Y 48 DE EXPONERLOS EN UN AMBIENTE AÉREO DE PLANTAS. (MEDIA +/- EE, N= 4, DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (*) CON EL CONTROL, DE ACUERDO A TUKEY, P< 0.05.....   | 59 |
| FIGURA 20 ÁREA FOLIAR DE PLANTAS DE FRIJOL 4 SEMANAS POSTERIORES A SU GERMINACIÓN, EN INVERNADERO. (MEDIA +/- EE, N= 6, DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS (*) CON EL CONTROL, DE ACUERDO A TUKEY, P< 0.05.....   | 60 |
| FIGURA 21 EFECTO DE DIFERENTES VÍAS DE COMUNICACIÓN EN EL DESARROLLO DEL ÁREA FOLIAR DEL FRIJOL, EN COMBINACIÓN CON PLANTAS DE FRIJOL, ALBAHACA O CEMPAZÚCHITL. (A) EFECTO DE PLANTAS COMUNICADAS POR VÍA AÉREA, (B) EFECTO DE PLANTAS COMUNICADAS POR VÍA SUBTERRÁNEA Y (C) EFECTO DE PLANTAS CON COMPLETA COMUNICACIÓN. (MEDIA +/- EE, N= 8. NO SE ENCONTRARON DIFERENCIAS ESTADÍSTICAMENTE SIGNIFICATIVAS. .... | 61 |
| FIGURA 22 CROMATOGRAMA DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EMITIDOS POR LAS PLANTAS DE CEMPAZÚCHITL CON UN TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE LAS FRIBRAS PARA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE 12 HORAS.<br>.....   | 62 |
| FIGURA 23 CROMATOGRAMA DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EMITIDOS POR PLANTAS DE CEMPAZÚCHITL, CON UN TIEMPO DE EXPOSICIÓN DE LAS FIBRAS PARA MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA DE 2 HORAS. ....  | 62 |
| FIGURA 24 COMPUESTOS VOLÁTILES REPRESENTATIVOS DE LA ALBAHACA Y DEL CEMPAZÚCHITL CON SUS RESPECTIVAS ÁREAS BAJO LA CURVA, DETERMINADAS EN LOS CROMATOGRAMAS.....   | 64 |

## ÍNDICE DE TABLAS

|   |    |
|---|----|
| TABLA 1 TABLA DE LOS PARÁMETROS FÍSICO-QUÍMICOS ENCONTRADOS EN LAS MUESTRAS DEL SUELO DONDE SE REALIZARON LOS EXPERIMENTOS EN CAMPO. ....   | 50 |
| TABLA 2 PERFILES DE COMPUESTOS VOLÁTILES EMITIDOS POR LAS PLANTAS DE FRIJOL, ALBAHACA Y CEMPAZÚCHITL DURANTE UN TIEMPO DE 3 HORAS DE EXPOSICIÓN DE LAS FIBRAS DE MICROEXTRACCIÓN EN FASE SÓLIDA. .... | 64 |



## RESUMEN

En este trabajo se propuso que efectos como la disminución en incidencia de plagas y agentes patógenos, o el incremento en la productividad, reportados bajo manejos agrícolas como agroecosistemas y policultivos, puede llevarse a cabo por medio de compuestos orgánicos volátiles liberados por las mismas plantas.

En base a lo anterior se trabajó con policultivos de plantas aromáticas, en asociación con frijol (*Phaseolus vulgaris*). Bajo este contexto, se propuso que los fenómenos antes mencionados, que llamaremos interacciones positivas o procesos de facilitación se permitirían al inter-cultivar especies de plantas como el frijol (*Phaseolus vulgaris*) asociadas a plantas aromáticas y que los compuestos orgánicos volátiles actuarían como mediadores de tales interacciones. Para ello se propuso un diseño experimental en el que se evaluó el desarrollo y rendimiento del frijol y su resistencia en contra el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, además de la identificación de los compuestos volátiles.

La evaluación del desarrollo, rendimiento y resistencia del frijol al asociarlo con plantas aromáticas se inició con una exploración bajo condiciones de campo, en los ciclos de cultivo julio-octubre del 2013, con los tratamientos: *P. vulgaris*-*P. vulgaris* (frijol-frijol), *P. vulgaris*-*Ocimum basilicum* (frijol-albahaca), *P. vulgaris*-*Tagetes erecta* (frijol-cempazúchitl), *P. vulgaris*-*Coriandrum sativum* (frijol-cilantro) y *P. vulgaris*-*Raphanus sativus* (frijol-rábano) y febrero-abril del 2014, con los tratamientos: *P. vulgaris*-*P. vulgaris*, *P. vulgaris*-*O. basilicum* y *P. vulgaris*-*T. erecta*.

Los resultados mostraron de las cinco especies de plantas aromáticas utilizadas, sólo al cultivar el frijol con albahaca o con cempazúchitl se incrementaba el desarrollo del área foliar por planta, así como el rendimiento de las plantas de frijol en comparación con el monocultivo y la combinación con cilantro o rábano. Adicionalmente, se presentó una tendencia a disminuir el daño por agentes patógenos y por herbívoros.

Bajo condiciones controladas se determinó que las semillas de frijol asociadas a plántulas de albahaca o cempazúchitl presentaban mayores tasas de germinación que en monocultivo con semillas o plántulas. Adicionalmente, estas mismas asociaciones, frijol-albahaca y frijol-cempazúchitl disminuían el porcentaje de germinación de conidios de *C. lindemuthianum* cuando fueron encerradas en cajas que contenían a las plantas mencionadas

Al coleccionar e identificar los compuestos volátiles emitidos por las plantas de albahaca y cempazúchitl, se determinó que los más representativos eran el eugenol (con un promedio de área bajo la curva de 8,307,832) y el trans- $\alpha$ -bergamoteno (con un promedio de área bajo la curva de 19,703,313), emitidos por la albahaca; el D-limoneno (con un promedio de área bajo la curva de 9,974,280), el  $\beta$ -ocimeno (con un promedio de área bajo la curva de 3,307,897) y el cariofileno (con un promedio de área bajo la curva de 1,590,303), emitidos por el cempazúchitl. De estos compuestos, ya está reportado que el eugenol, el limoneno y el cariofileno presentan efectos negativos en el desarrollo de diversos microorganismos patógenos. Además, se ha documentado el efecto de estos compuestos como promotores del crecimiento en plantas, al ser liberados por microorganismos.

De acuerdo con los resultados, se concluye que las plantas de cempazúchitl y albahaca inducen un efecto directo positivo en la germinación, desarrollo y producción del frijol,

además de una respuesta negativa en el desarrollo de patógenos como *C. lindemuthianum* o en la incidencia de herbívoros del frijol, lo cual posiblemente tiene como factor principal a los compuestos volátiles emitidos por esas plantas. Sin embargo, es importante mencionar que el efecto también es dependiente de las condiciones ambientales, que determinan en muchas ocasiones que tipo de organismos se asociarán con las plantas.

Como siguiente paso, para proyectos posteriores, se propone evaluar diversos compuestos volátiles sintéticos y comprobar su efecto en la germinación, desarrollo y producción de las plantas de frijol. Además, conocer que otros aspectos morfológicos o metabólicos pueden ser modificados por la presencia de especies de plantas vecinas emisoras de compuestos volátiles.

## ABSTRACT.

The aim of this work was to study the relevance of volatile organic compounds (VOCs) in the associative resistance and facilitation, phenomena that occurs between different plant species and means that the presence of representatives of one species positively affects the development of a second species.

I evaluated the physical and chemical characteristics of the soil; the results showed low levels of phosphorus and nitrogen, and a high content of clays. Then I evaluated the development, yield and pest and pathogen incidence (*Colletotrichum lindemuthianum*) in common bean (*Phaseolus vulgaris*) in intercropping with aromatic plants.

The phenomenon was first explored under field conditions: in July-October 2013 I studied the combinations *P. vulgaris*-*P. vulgaris* (bean-bean), *P. vulgaris*-*Ocimum basilicum* (bean-basil), *P. vulgaris*-*Tagetes erecta* (bean-marigold), *P. vulgaris*-*Coriandrum sativum* (bean-coriander) and *P. vulgaris*-*Raphanus sativus* (bean-radish); in February-April from 2014 I studied the combinations bean-bean, bean-basil and bean-marigold.

Intercropping bean with basil or marigold, the foliar area and the number of pods produced per plant increased in comparison with the monoculture or the intercrop with coriander or radish. I also observed a reduced leaf damage caused by pathogens and herbivores as compared to controls.

The putative mechanisms underlying these phenomena were analysed under greenhouse conditions. Here, I determined the germination rates of bean seeds when surrounded by seeds or plantlets of the other two species and found increased germination rates of bean seeds that were associated with basil or marigold plants. The same conditions decreased the conidial germination rate of the fungal bean pathogen, *Colletotrichum lindemuthianum*.

The principal VOCs found were eugenol and trans- $\alpha$ -bergamoteno for basil and limonene, and  $\beta$ -ocimene and cariophyllene for the marigold.

The eugenol, limonene and cariophyllene can have negative effects on the development of microbial pathogens whereas trans- $\alpha$ -bergamotene and  $\beta$ -ocimene are released by plants in response to mechanical damage. Furthermore, these compounds are not exclusively emitted by plants: many microorganisms are capable to emit these volatiles, which in several cases have been reported to promote plant growth.

The next step is to evaluate single volatile organic compounds and corroborate their effects on germination, development and yield, and explore the effects of VOCs produced by neighbour plants on the metabolic and morphological traits of bean plants.



## INTRODUCCIÓN

Los sistemas de producción agrícola industrializados, provenientes de la conocida revolución verde, se caracterizan por su baja complejidad, ya que están enfocados en obtener el máximo aprovechamiento de una sola especie de planta cultivada y en el menor tiempo posible. Esto se logra mediante el implemento de procesos mecanizados y de insumos agroquímicos, que si bien aumentan la producción, también incrementan la incidencia de plagas y patógenos debido a la alta concentración de alimento de fácil acceso (plantas hospederas) que se encuentra en un continuo espacio temporal y la poca variabilidad genética de las plantas, además la ausencia de barreras físicas que impidan el traslado de los organismos dañinos (Vandermeer 1989; Francis 1990; Altieri y Nicholls 2004).

Desde hace varias décadas se han comenzado a poner en funcionamiento una serie de alternativas agroecológicas para sustituir los monocultivos por los policultivos (sistemas agrícolas de mayor complejidad), que en realidad, son opciones de cultivo que dominaban hace miles de años y se caracterizan por la disminución en el uso de agroquímicos y evitando los monocultivos (Gliessman 1998). Podemos decir, con toda seguridad, por ejemplo, que el origen de estos sistemas agroecológicos mexicanos fue a partir de la domesticación del maíz, lo que aconteció hace unos 9000 años, cuando grupos de cazadores-recolectores iniciaron los procesos que llevarían a dicha domesticación (Blake 2006).

Los sistemas agroecológicos son similares a los sistemas naturales ya que su complejidad y estabilidad se basan en su diversidad, que es la base para una gestión de agroecosistemas sostenibles y el diseño de prácticas que mantengan o aumenten la fertilidad, la productividad y la calidad de las producciones agrícolas y regulen las poblaciones de las plagas (Francis 1990). El término diversidad hace referencia al conjunto de plantas, animales y microorganismos que viven e interaccionan en un ecosistema. El aumento de diversidad favorece la heterogeneidad del hábitat, que, a su vez, incrementa las oportunidades de coexistencia y de interacción entre las especies, entre los diferentes niveles tróficos (Gliessman 1998). Este aumento en la diversidad y heterogeneidad del hábitat, generalmente, también lleva asociado una mayor eficiencia en el uso de los recursos, por lo que se puede mencionar que los resultados representan mayores ventajas ecológicas que los altamente simplificados, como los sistemas agrícolas convencionales y, particularmente, los monocultivos (Gliessman 1998; Altieri 1999; Altieri y Nicholls 2004).

El mecanismo tradicionalmente propuesto para la reducción en las enfermedades y las plagas es el efecto “push-pull”, que se refiere a la presencia de plantas con propiedades químicas o visuales capaces de repeler organismos dañinos del cultivo de interés o para atraerlos a cultivos trampa, e incluso atraer y mantener predadores y parasitoides de las plagas del cultivo principal (Hassanali *et al.* 2008).

Existe un proceso conocido como resistencia por asociación puede funcionar como un sistema “push-pull” en el que se hace uso de compuestos semioquímicos para repeler las plagas de los cultivos de interés y atraerlos a cultivos trampa (Mundt 2002; Kaitaniemi *et al.* 2007; Hassanali *et al.* 2008). Un ejemplo de estos semioquímicos son los compuestos orgánicos volátiles, compuestos químicos de bajo peso molecular, producidos por el

metabolismo secundario de algunas plantas, que en ciertos casos pueden afectar de manera benéfica a las plantas cercanas, las cuales son capaces de percibir y responder a los volátiles (plantas receptoras), por ejemplo, resistiendo a las enfermedades y plagas. Tal es el caso de las plantas de frijol lima (*Phaseolus lunatus* L.) que al ser expuestas a diferentes concentraciones del compuesto volátil nonanal, incrementan su resistencia frente a la bacteria fitopatógena *Pseudomonas syringae* (Girón-Calva *et al.* 2012).

Adicionalmente, se sabe que estos compuestos orgánicos volátiles son capaces de actuar de manera directa, por ejemplo inhibiendo la germinación de los conidios y el desarrollo de *Colletotrichum lindemuthianum*, bajo condiciones *in vivo* e *in vitro* (Quintana-Rodriguez *et al.* 2015). Sin embargo, la distancia máxima de acción de los compuestos orgánicos volátiles para desencadenar la resistencia contra patógenos o herbívoros en las plantas de *Phaseolus lunatus* es de 50 cm: de igual manera, la mayoría de las hojas de este frijol se encuentran a esta distancia unas de las otras, por lo que también se propone que el efecto de los compuestos orgánicos volátiles realmente es una auto-señalización (Heil y Adame-Álvarez 2010).

Por último, la presencia y cantidad de estos compuestos volátiles son regidos en gran medida por las condiciones abióticas y bióticas que influyen sobre las plantas, pues se ha demostrado que la emisión de compuestos volátiles emitidos por la planta *Panax ginseng* es afectada por los métodos de cultivo, y que bajo prácticas agrícolas como el cultivo orgánico, pueden incrementar los compuestos volátiles que la caracterizan (Lee *et al.* 2012).

El presente estudio se propuso considerando que los compuestos volátiles podrían utilizarse como una alternativa para la protección de diversos cultivos, esto, por medio de sistemas emisores de los compuestos. Para ello se utilizó al frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.), que tiene su origen biogeográfico en México y además es una de las leguminosas más importantes en Latinoamérica debido a su empleo en la dieta alimenticia de los mexicanos (Vargas-Vazquez *et al.* 2006; Lépiz-Ildefonso *et al.* 2010).

El frijol se produce en todas las regiones agrícolas de México, en diversos sistemas de producción y épocas del año. Sin embargo, debido a las distintas preferencias de consumo, basadas principalmente en las costumbres, tradiciones y, gran parte en la demanda de los centros urbanos, el frijol se cultiva en grandes extensiones, con un reducido número de variedades. Este monocultivo extensivo ha acarreado un riesgo elevado de enfermedades que evolucionan aceleradamente (Vargas-Vazquez *et al.* 2006), y un mayor uso de fungicidas que pueden no solo afectar la salud humana, sino también a las especies que se encuentren en las áreas aledañas a los cultivos.

Entre las diversas enfermedades que afectan al frijol, la antracnosis causada por el hongo *Colletotrichum lindemuthianum* (Campa *et al.* 2009), tiene un gran impacto negativo sobre el rendimiento de esta leguminosa; generalmente lo reduce entre un 20 y 30%, sin embargo, cuando las condiciones ambientales son óptimas para el desarrollo del patógeno, las pérdidas pueden ser del 100% (Zaumeyer y Meiners 1975). Dentro de las principales estrategias de control de esta enfermedad utilizadas en nuestro país, se encuentra el control químico y la producción de nuevas variedades de frijol resistentes al patógeno, además se utiliza la rotación de cultivos (Pastor-Corrales y Tu 1989)

Por otra parte, *P. vulgaris* se ha usado como un modelo de estudio para la investigación de mecanismos de señalización entre plantas (Kost y Heil 2006; Heil y Silva Bueno 2007; Yi *et al.* 2009; Córdova-Campos 2011; Córdova-Campos *et al.* 2012; Quintana-Rodríguez *et al.* 2015).

Con base en lo anterior, se propuso que al asociar cultivos como el frijol (*Phaseolus vulgaris*) con albahaca (*Ocimum basilicum*), cempazúchitl (*Tagetes erecta*), cilantro (*Coriandrum sativum*) o rábano (*Raphanus sativus*) se permiten procesos ecológicos a nivel parcela, como la facilitación. En estos fenómenos, los compuestos orgánicos volátiles participan como mediadores de las interacciones entre las plantas; al ser capaces de transportar las señales. Para avanzar en ese sentido, se evaluó el efecto de las asociaciones antes mencionadas, sobre la resistencia del frijol contra *Colletotrichum lindemuthianum*, y sobre el desarrollo y rendimiento del frijol. Asimismo, se llevó a cabo la identificación química de los compuestos volátiles.



## ANTECEDENTES.

### Agrosistemas

Las asociaciones de cultivos, también conocidas como policultivos o intercultivos, son sistemas en los que se mezclan diferentes especies vegetales (Gliessman 2001). Los policultivos son la base estructural e integrativa de los agroecosistemas; definidos como sitios de producción agrícola en los que se aplican principios ecológicos para su manejo (Gliessman 1998; Altieri y Nicholls 2000).

Se asume que estos sistemas de cultivo presentan ventajas potenciales sobre los monocultivos, por ejemplo mayor estabilidad, productividad, resiliencia (capacidad del sistema para reponerse ante un disturbio) y sustentabilidad ecológica, sin embargo, también se considera que presentan dificultades en su manejo debido a la cantidad de especies interactuantes (Vandermeer 1989).

Debido a que el concepto de agroecosistema se basa en principios ecológicos, es posible hacer una analogía de los componentes agrícolas a los componentes ecosistémicos, esto es: un monocultivo equivale a una población, los policultivos a comunidades y el sistema agrícola con su contexto geográfico equivale al ecosistema (Gliessman 1998). Del mismo modo, en estos sistemas ocurren interacciones como la competencia o la facilitación (Malézieux *et al.* 2009).

La competencia en estos sistemas de policultivo puede ocurrir a través de los sistemas radiculares de las plantas, en donde es recomendable utilizar plantas que exploten los recursos de diferentes capas del suelo (Malézieux *et al.* 2009); también es posible observar competencia en el espacio aéreo, sobre la superficie del suelo, la más común es por la radiación luminosa, por lo cual es mejor utilizar especies o genotipos vegetales que presenten tallos rectos y hojas cortas (Trenbath 1974).

Una cualidad interesante en los sistemas de policultivo es que son capaces de reducir la incidencia de plagas y patógenos, aunque esta respuesta no siempre es constante (Trenbath 1977). Este fenómeno se ha explicado bajo diferentes hipótesis, por ejemplo: se menciona un efecto de dilución en el que se incrementan las plantas no aptas para ciertos organismos (Root 1973). También se ha propuesto un efecto de barrera física a través de la modificación de la estructura, la arquitectura y el microclima, lo cual afecta la dispersión de los organismos (Francis 1990). Una tercera hipótesis es la producción de sustancias químicas con efecto negativo en los patógenos y las plagas (Yeates 1987).

### Competencia y facilitación

Dentro de los ecosistemas las plantas presentan un amplio rango de interacciones, que van desde las negativas, como la competencia, hasta las positivas, como la facilitación (Lambers *et al.* 2008).

La competencia se define como la tendencia de las plantas vecinas para utilizar el mismo recurso, siempre y cuando éste se encuentre como factor limitante (Tilman 1987). Sin

embargo, para definirse como tal es necesario que las plantas reduzcan el crecimiento, fecundidad o adecuación de sus vecinas (Fitter y Hay 2002). Para tener este efecto, las plantas presentan diferentes características de competencia, dependiendo del recurso, por ejemplo, algunas plantas son capaces de reducir la concentración de nutrientes disponibles para sus vecinas, a través de su inmovilización, por ejemplo en estructuras como las hojas (Tilman y Wedin 1991), en el caso del agua, algunas plantas son capaces de dirigir sus raíces a zonas más profundas; en el caso de la luz, las plantas tienden a incrementar su área foliar (Fitter y Hay 2002).

Para que las plantas puedan actuar en presencia de competidores es necesario que estas sean capaces de percibir a las vecinas, esto puede ser, por ejemplo a través de la luz reflejada, por medio de fotorreceptores como el criptocromo (foto receptor de luz azul) y el fitocromo (foto receptor de luz roja) (Crepy y Casal 2015), o a través de estímulos mecánicos, o cambios microclimáticos causados por las vecinas (Lambers *et al.* 2008). Sin embargo, las plantas también son capaces de percibir compuestos químicos emitidos por las plantas vecinas a través de diferentes quimio-receptores (Lambers *et al.* 2008).

Tradicionalmente, los modelos de interacciones entre las plantas han enfatizado los procesos de competencia, asumiendo que las plantas deben de competir por todos los recursos limitantes como el agua, nutrientes, luz, espacio o polinizadores (Goldberg y Landa 1991), sin embargo, existe una gran cantidad de evidencia acerca de las interacciones positivas (Callaway y Pugnaire 2007).

La facilitación se define como el fenómeno en el que una especie mejora la supervivencia, crecimiento o adecuación de otra (Callaway 1997), se presentará mayormente mientras menor sea la competencia (Malézieux *et al.* 2009). Este tipo de interacciones positivas que pueden ocurrir entre las especies de plantas son diversas, podemos tener facilitación indirecta, causada por plantas intermediarias que permiten la actuación de un tercer organismo como herbívoros, polinizadores, hongos micorrízicos (Strauss 1991). En los gremios de defensa vegetal, de Atsatt y O'Dowd (1976), los autores proponen diversos mecanismos de acción, como el hospedar insectos predadores, efectos repelentes de herbívoros (Atsatt y O'Dowd 1976).

Por otra parte, se encuentra la facilitación a través de mecanismos directos, por ejemplo las plantas elevadoras de agua, que acarrean agua de sustratos edáficos más profundos y la van liberando en los estratos superiores, donde otras plantas la pueden aprovechar (Richards y Caldwell 1987); la captación de agua ambiental por medio del dosel y su liberación en las cercanías de los árboles (Hutley *et al.* 1997); el sombreado, que es capaz de reducir la transpiración de las plantas bajo la sombra por medio de la reducción de la diferencia de presión de vapor (Callaway 2007); el ciclaje de nutrientes por medio de su absorción a través de las raíces de los árboles y su posterior liberación en forma de litter (Ovington 1955); la reducción de los efectos adversos del viento por medio del efecto de barrera de las plantas (Callaway 2007); la oxigenación del suelo a través de su liberación por las raíces (Armstrong 1964); la comunicación entre plantas, por medio de compuestos químicos que emiten las plantas cuando están siendo atacadas por plagas o patógenos, y que pueden percibir las plantas vecinas e incrementar sus niveles de defensa (Baldwin y Schultz 1983).

Ambos tipos de interacciones no son invariables, de hecho existe un cambio constante y una compleja combinación entre ambos tipos de interacciones bajo diferentes condiciones

climáticas (Callaway *et al.* 2002) y también en los diferentes estadios sucesionales (Haase *et al.* 1996). De hecho, las especies pueden cambiar de beneficiadas a benefactoras, dependiendo de las condiciones abióticas y de las especies que las rodean (Callaway 1998).

Por ejemplo, se ha observado una mayor intensidad de competencia cuando los suelos presentan elevada fertilidad (Bonser y Reader 1995). Sin embargo, otros estudios no muestran cambios en las interacciones con la modificación de la fertilidad de los suelos (Belcher *et al.* 1995).

Las características edáficas son una de las principales condiciones abióticas que pueden influir en el equilibrio entre la facilitación y la competencia, sin embargo, estas no son homogéneas, por el contrario, presentan una gran heterogeneidad temporal y espacial (Reynolds y Rajaniemi 2007).

El suelo es el medio de soporte de las plantas, determinante físico del crecimiento de las raíces y el principal reservorio de agua y nutrientes, que son regulados para su biodisponibilidad por medio de procesos biofísicoquímicos (Comerford 2004). El suelo proviene de la intemperización de la roca madre, y posteriormente, los organismos depositan residuos denominados “litter”, lo que produce materia orgánica, muchas veces referida como humus. Esta capa de humus conocida como horizonte “O” u Orgánico se encuentra sobre la superficie del suelo, bajo la materia orgánica recién depositada, y es la más importante ecológicamente pues es la más activa biológicamente (Gliessman 1998).

La cantidad de materia orgánica que contienen los suelos influye sobre diversas propiedades y procesos, a pesar de que las plantas no requieren de ésta para su crecimiento o desarrollo (Gregorich *et al.* 1994). Por ejemplo, la materia orgánica puede permitir la disponibilidad de cationes en suelos con poca cantidad de arcillas, puede actuar como reservorio temporal de nitrógeno, fósforo y azufre (Schroth *et al.* 2003). Adicionalmente, la cantidad de materia orgánica puede influir positivamente en la cantidad de agua almacenada y en la formación de agregados (Diels *et al.* 2002).

En adición a los componentes orgánicos, el suelo contiene partículas minerales de diferentes tamaños conocidas como arenas (de 2-0.05 mm de diámetro), limos (de 0.05-0.002 mm) y arcillas (<0.002 mm), y sus proporciones determinan la textura (NOM-021-RECNAT-2000; Muñoz-Iniestra *et al.* 2008; Konrad y Sauerborn 2013). Estos minerales forman conglomerados individuales denominados agregados, lo que proporciona al suelo estructura y porosidad (Grimaldi *et al.* 2003). Adicionalmente, las arcillas están fuertemente relacionadas a la disponibilidad de los nutrientes ya que forman sitios de intercambio de cationes, de donde las plantas pueden liberar  $H^+$  y  $HCO_3^-$  para tomar  $Na^+$ ,  $Ca^{2+}$ ,  $K^+$ ,  $Mg^{2+}$ ,  $Al^{3+}$ , y  $PO_4^{3-}$ ,  $NO_3^-$ ,  $SO_4^{2-}$  respectivamente (Martin y Sauerborn 2013).

### Compuestos orgánicos volátiles y protección vegetal.

El control de enfermedades y plagas por medio de compuestos químicos, se encuentran entre las principales actividades humanas que afectan el ambiente (Gómez-Rodríguez y Zavaleta-Mejía 2001). Existen otras prácticas más “amigables” con el ambiente que presentan alto potencial para proteger los cultivos contra plagas y patógenos, por ejemplo, la resistencia inducida de las plantas (Heil y Walters 2009), al igual que la asociación de diversos cultivos con propiedades antagonistas, lo cual disminuye el riesgo de una pérdida

total de los cultivos al integrar una mayor diversidad biológica y mejorar el uso de los recursos naturales (Trenbath 1993; Mundt 2002).

En los sistemas naturales, la mezcla de especies no relacionadas taxonómicamente reducen la probabilidad de que los herbívoros encuentren a sus plantas hospederas (Feeny 1970). Como muchos herbívoros son atraídos por señales visuales o químicas, en los policultivos, la reducción en la herbivoría puede ocurrir adicionalmente a través de la ausencia o disminución de tales señales, lo que limita la localización de las plantas por los herbívoros (Orians y Björkman 2009). Este fenómeno se conoce como “resistencia por asociación”, que se refiere a la reducción en la herbivoría en plantas asociadas taxonómicamente con otras plantas de diferente especie (Tahvanainen y Root 1972). Esta resistencia por asociación puede funcionar como un sistema “push-pull” en el que se hace uso de compuestos semioquímicos para repeler las plagas de los cultivos de interés y atraerlos a cultivos trampa (Mundt 2002; Kaitaniemi *et al.* 2007; Hassanali *et al.* 2008).

Los compuestos semioquímicos (también llamados infoquímicos) son sustancias liberadas por los organismos que transportan información para una comunicación intra- o inter-específica (Mori 2010). En las plantas, estos compuestos, se liberan por inducción o constitutivamente y, pueden actuar como señales para atraer polinizadores, selección y localización de hospederos, y, además para comunicación entre ellas (Dicke *et al.* 1990; Lambers *et al.* 2008; Mori 2010). Un ejemplo de semioquímicos en las plantas son los compuestos orgánicos volátiles, que pueden mejorar la resistencia de las plantas, aleañas a la emisora, que reciben la señal (Heil y Karban 2010).

Los compuestos volátiles emitidos por las plantas, generalmente son mezclas complejas de muchos compuestos orgánicos en pequeñas cantidades, que por lo general son sustancias altamente lipofílicas de bajo peso molecular (Pichersky 2004). Estos metabolitos son producidos por muchas especies de plantas, pero también por bacterias y hongos, siendo el grupo de los terpenos, los compuestos orgánicos volátiles más representativos (Dudareva *et al.* 2004).

Estos compuestos pueden desempeñar diversas funciones, por ejemplo cuando existen plantas dañadas por un patógeno o herbívoro, las señales químicas emitidas pueden ser recibidas por plantas sanas de la misma, o de otras especies, lo que causa que las receptoras respondan incrementando los niveles de algunos compuestos químicos relacionados con la defensa, a pesar de que en ese momento no presenten la enfermedad o plaga. Además, bajo ciertas circunstancias, estos compuestos pueden tener un efecto inhibitorio en el desarrollo de los microorganismos patógenos (Lambers *et al.* 2008; Heil y Walters 2009; Heil y Adame-Álvarez 2010; Girón-Calva *et al.* 2012).

El efecto ha sido reportado para diversas especies, tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas (Heil y Karban 2010). Algunos ejemplos de especies que presentan este fenómeno son *Acer saccharum*, *Arabidopsis thaliana*, *Gossypium hirsutum*, *Phaseolus lunatus*, *Solanum lycopersicum*, *Vicia faba* y *Zea mays* (Baldwin y Schultz 1983; Farmer y Ryan 1990; Bruin *et al.* 1992; Birkett *et al.* 2000; Engelberth *et al.* 2004; Ton *et al.* 2007; Godard *et al.* 2008)

Algunos estudios en campo con *Alnus glutinosa* y *Nicotiana attenuata* han mostrado una disminución en el daño causado por herbívoros en otras especies de plantas vecinas, alejadas entre 30 cm y 1 m. (Dolch y Tschardtke 2000; Karban *et al.* 2003). Esta misma

distancia se ha encontrado en la inducción de resistencia contra patógenos bacterianos por medio de compuestos volátiles, en plantas de frijol *Phaseolus* sp. (Heil y Adame-Álvarez 2010). Las observaciones indican que estos compuestos son rápidamente diluidos o degradados en el ambiente a concentraciones no funcionales (Girón-Calva *et al.* 2012). La cercanía que se requiere para que estos compuestos tengan efecto genera dudas respecto a su relevancia ecológica debido a la disminución del efecto con la distancia (Dolch y Tschardt 2000; Karban *et al.* 2003). Por tal razón, y al ser evolutivamente contradictorio beneficiar a receptores vecinos no relacionados genéticamente, que pueden llegar a competir con el emisor, se ha expuesto que la función de estos compuestos volátiles es más adecuada para una señalización “propia” en la que se pueden alcanzar las partes de la planta que son espacialmente pero no anatómicamente localizadas cerca del órgano atacado (Heil y Karban 2010).

Los compuestos volátiles emitidos por las plantas, son mezclas complejas de compuestos orgánicos en pequeñas cantidades. Por lo general estos compuestos son sustancias altamente lipofílicas, de bajo peso molecular y elevada presión de vapor (Vaughn 2001; Pichersky 2004; Dudareva y Negre 2005).

La emisión de estos compuestos orgánicos volátiles, es el resultado de un gradiente de presión de vapor que se da, desde los compartimentos celulares, en donde hay relativamente altas concentraciones, hasta el aire que rodea la hoja, donde la concentración de estos compuestos es relativamente baja (Peñuelas y Llusà 2003). La emisión de estos compuestos también está afectada por diversos factores como la temperatura, la luz, la disponibilidad de agua, la humedad, el ozono y por la integridad de los tejidos vegetales. Además, las plantas pueden modificar continuamente los patrones de volátiles que se emiten de sus estructuras o con el transcurso del tiempo (Peñuelas y Dudareva 2001; Dudareva *et al.* 2004; Dudareva y Negre 2005).

### Estudio de los compuestos orgánicos volátiles.

La compleja red de factores, sus interacciones y las diferentes respuestas inducidas por los volátiles, conducen a una amplia variabilidad cuantitativa, cualitativa, espacial y temporal de las emisiones. Éstas a su vez tienen fuerte relevancia en la fisiología de las plantas y su ecología (Peñuelas y Dudareva 2001; Peñuelas y Llusà 2003).

Para el estudio de estos compuestos, la cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas es una de las técnicas más utilizadas, debido a su potencial para el rápido análisis y elevada confiabilidad en una amplia variedad de tipos de muestras (Bhardwaj y Hanley 2014).

Para la colecta de estos compuestos podemos encontrar técnicas diversas, como el circuito cerrado de extracción (closed-loop stripping apparatus (CLSA)) que consiste en un circuito de tubos por donde pasa un flujo de aire que es filtrado por una trampa de carbono, la cual es retirada después de varias horas para que su contenido sea eluido con un solvente orgánico (Donath y Boland 1995). La principal desventaja de este método radica en la posibilidad de presentar un efecto de memoria; debido a fragmentos de carbono desprendidos del filtro y atrapados en las bombas de aire, donde no son eluidos, además representa el uso de elevadas cantidades de solventes (Dickschat 2014).

Adicionalmente, se puede mencionar que para sistemas de muestreo estáticos y cerrados existen diferentes adsorbentes como el ya mencionado carbón activado, carboxenos, silica gel y polímeros como el tenax (Harper 2000).

También se puede utilizar la técnica de cromatografía de gases “headspace” (Dewulf *et al.* 2002) acoplada al sistema de extracción para compuestos volátiles provenientes de muestras biológicas conocido como microextracción en fase sólida (SPME) (Arthur y Pawliszyn 1990; Zhang y Pawliszyn 1993). El método hace uso de fibras adsorbentes, muchas de las cuales están compuestas de poli(dimetilsiloxano) (Dickschat 2014). Estas fibras son expuestas al espacio aéreo de una muestra biológica en recipientes cerrados por diferentes periodos de tiempo hasta que adsorban los compuestos volátiles; las mayores ventajas de la técnica son que no se usan disolventes, resulta ser rápida, barata y no invasiva, in embargo, este método no es adecuado para la cuantificación de los compuestos, únicamente nos puede proporcionar una abundancia relativa (Agelopoulos y Pickett 1998; Flamini *et al.* 2003).

## HIPÓTESIS.

Al asociar cultivos como el frijol (*Phaseolus vulgaris*) con albahaca (*Ocimum basilicum*), cempazúchitl (*Tagetes erecta*), cilantro (*Coriandrum sativum*) o rábano (*Raphanus sativus*) se permiten procesos ecológicos a nivel parcela, como la facilitación. En estos fenómenos, los compuestos orgánicos volátiles participan como mediadores de las interacciones entre las plantas; al ser capaces de transportar las señales.

## OBJETIVOS

### **OBJETIVO GENERAL.**

Inducir la facilitación agroecológica y la resistencia por asociación del frijol asociado a plantas aromáticas, contra patógenos y herbívoros, mediante compuestos orgánicos volátiles, en un sistema de cultivo interespecífico.

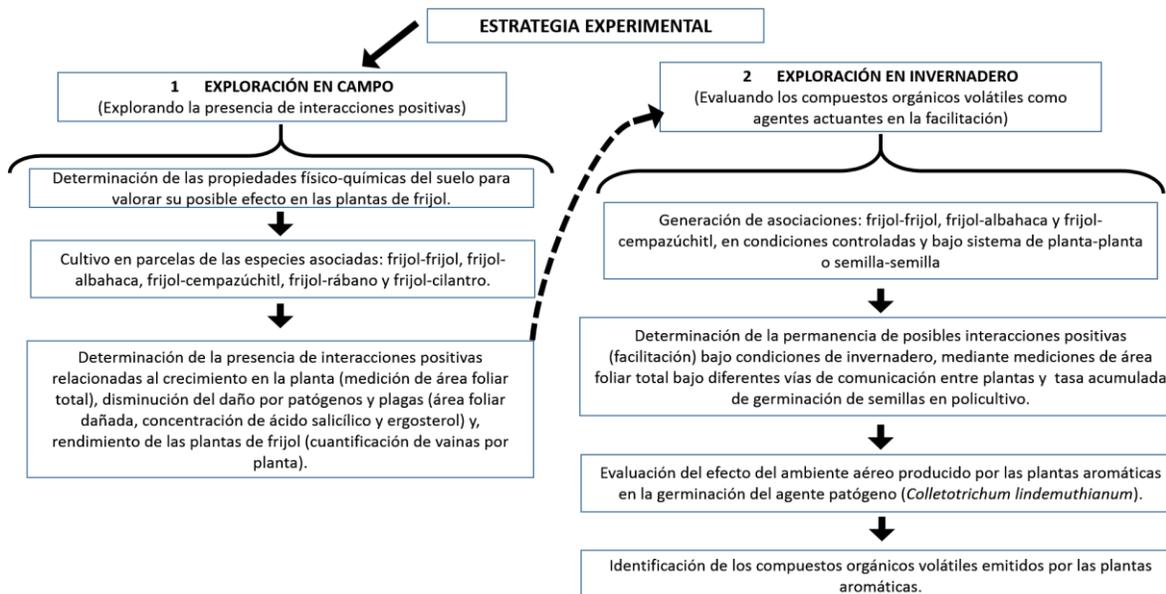
### **Objetivos particulares.**

- Determinar las condiciones fisicoquímicas de suelo de cultivo.
- Evaluar cambios en el desarrollo del frijol, bajo sistemas de policultivo en condiciones naturales y controladas.
- Determinar la presencia de resistencia por asociación del frijol, bajo sistemas de policultivo en condiciones naturales y controladas.
- Determinar los compuestos volátiles emitidos por las especies de plantas usadas en los sistemas de policultivos, bajo condiciones controladas.
- Determinar los compuestos orgánicos volátiles con potencialidad para causar los efectos de facilitación y resistencia por asociación.



# METODOLOGÍA.

## Estrategia experimental.



## Especie en estudio

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L., Fabaceae) tiene su origen biogeográfico en México y es una de las leguminosas de gran importancia en Latinoamérica debido a su empleo en la dieta alimenticia (Vargas-Vazquez *et al.* 2006; Lépez-Ildefonso *et al.* 2010). El frijol se produce en todas las regiones agrícolas de México, en diversos sistemas de producción y épocas del año (Vargas-Vazquez *et al.* 2006).

El frijol es afectado por diversas enfermedades entre las que destaca la antracnosis causada por el hongo hemibiótrofo *Colletotrichum lindemuthianum* (Campa *et al.* 2009). Durante la fase inicial de infección, este hongo causa un daño mínimo en las células hospederas. Después de penetrar la cutícula y la pared celular del hospedero, el patógeno inicia un crecimiento de tipo biotrófico, con hifas primarias intracelulares. Posteriormente se forman hifas estrechas, que inician el crecimiento necrotrófico, que conlleva a la muerte de las células hospederas (Mendgen y Hahn 2002; Tavernier *et al.* 2007).

En este trabajo se empleó *Phaseolus vulgaris* (frijol común), variedad Flor de Junio Marcela, como cultivo principal.

## Especies de plantas aromáticas utilizadas

Para este estudio se utilizaron las siguientes especies para asociarlas con el frijol: *Ocimum basilicum* (albahaca), *Tagetes erecta* (cempazúchitl), *Raphanus sativus* (rábano), *Coriandrum sativum* (cilantro).

El cempazúchitl (*Tagetes erecta*), dicotiledónea de la familia Asteraceae, es una especie anual con tiempo de floración de 2 meses, inflorescencias muy aromáticas en capítulo con 60 a 400 flores de pétalos ligulados amarillos o anaranjados, tallos herbáceos o arbustivos glabros o ligeramente pubescentes y regularmente estriados, raíces fibrosas (Neher 1966). Presenta importancia económica y cultural en México, principalmente porque desde épocas prehispánicas se ha utilizado su flor en rituales y festividades dedicadas a la muerte (Heyden 2002). Además, actualmente, las flores son procesadas a escala industrial para obtener carotenoides (Piccaglia *et al.* 1998). Los extractos crudos se utilizan como ingrediente del alimento de aves de corral para incrementar y promover el color amarillo de la piel y la yema de los huevos (Hencken 1992).

El método de siembra de *T. erecta* suele ser directo o por trasplante, con una distancia entre plantas de 40 cm., el cultivo es poco afectado por plagas y enfermedades, su óptimo desarrollo es en suelos con pH de 6 a 8, en altitudes sobre el nivel del mar, de 8 a 2400 m (Serrato-Cruz 2006).

Esta especie que ha sido estudiada con diversos objetivos antropogénicos, como: la obtención de antioxidantes, pigmentos, saborizantes y resinas para alimentos, como planta medicinal, y en la agricultura por sus efectos como insecticida, nematocida, larvicida, abono verde, controlador de malezas, atrayente y repelente de insectos (Olabiyi y Oyedunmade 2007; Sánchez-Ocampo 2008).

El cilantro (*Coriandrum sativum* L.) es una especie herbácea anual, tallo muy ramificado de 40 a 80 cm de alto, presenta flores perfectas en umbela, el cultivo presenta temperaturas óptimas de crecimiento entre los 20 y 30 °C, en cuanto a los suelos, es recomendable suelos profundos con buen drenaje (Morales 1995). Esta especie se adapta muy bien a altitudes de 1000 a 1300 m y suelos con pH de 5 a 7; su ciclo de vida es de 45 a 50 días (Acuña 1988). El aceite esencial de sus hojas contiene compuestos como el alcanfor, el acetato de ciclohexanol, el limoneno y el alfa-pineno, que presentan efectos antioxidante y antifúngicos (Darughe *et al.* 2012).

El rábano (*Raphanus sativus*) es un cultivo hortícola de rápida maduración (20 a 30 días). Pertenece a la familia Cruciferae, originario de Europa y Asia, crece a altitudes de 190 a 1240 m; el sistema radicular del rábano se caracteriza por una raíz pivotante, las hojas son compuestas, imparipinadas, con presencia de tricomas, inflorescencia racimosa. La germinación de esta especie es óptima a los 25 °C, con fotoperiodo largo; en cuanto a los requerimientos edáficos son, suelos de buena textura, abundante materia orgánica, los suelos arcillosos no son adecuados, tolera un pH entre 6 y 7 (Rojas 1983)

Las hojas y las raíces del rábano (*Raphanus sativus*) han sido usadas en varias partes del mundo como agente anti-cancerígeno antimicrobiano y antiviral. Sus extractos han mostrado efectos contra *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella thyposa*, *Sarcinia lutea*, *Staphylococcus epidermitis* y contra el virus de la influenza. Se ha encontrado que presenta péptidos ricos en cisteína con substancial actividad antifúngica

efectiva a mínimas concentraciones que van de 30 a 60 µg/ml. Las hojas contienen ácido cafeico y ácido ferúlico con propiedades antifúngicas; ácido hydrocinámico, p-hidroxibenzoico con propiedades antimicrobianas (Pérez-Gutiérrez y Lule-Pérez 2004). Adicionalmente se ha encontrado que las plantas de rábano liberan compuestos como los isotiocianatos, que presentan elevada actividad antifúngica (Smolinska y Horbowicz 1999).

La albahaca (*Ocimum basilicum*) pertenece a la familia Labiatae, hierba anual, aromática, glabra o un poco pubescente, de 30 a 50 cm de altura, con centro de origen en Asia (Linares *et al.* 1996). La planta tiene un óptimo desarrollo entre los 15 y 25 °C, requiere de suelos ricos, fertilizados y bien drenados, también se puede cultivar entre los 0 y 1000 m de altitud y se sabe que al aumentar la altitud disminuye el rendimiento de los aceites esenciales, que son linalol, geraniol citral, alcanfor, eugenol y timol (Briseño-Ruiz *et al.* 2013). Es una planta aromática usada como condimento, que ha mostrado un espectro de efectos antimicrobianos, que depende del tipo de extracto (etanólico, metanólico o hexanánico) (Adigüzel *et al.* 2005). Además, es posible estimular a las raíces para exudar diversos compuestos *de novo* (Bais *et al.* 2004).

### Área de trabajo.

La fase experimental del trabajo en campo se realizó en los terrenos de cultivos experimentales ubicados en la zona sur de las instalaciones del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, unidad Irapuato del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-Irapuato, IPN), en el Km. 9.6, Libramiento Norte carretera Irapuato-León, Irapuato, Guanajuato, México.

Los terrenos de cultivo se encuentran en el municipio de Irapuato, Gto. Este municipio se encuentra entre los paralelos 20° 51' y 20° 30' de latitud norte; y los meridianos 101° 08' y 101° 33' longitud oeste, en la provincia del Eje Neovolcánico Mexicano, subprovincia del Bajío Guanajuatense. Las condiciones de campo que prevalecen, de acuerdo al prontuario de información geográfica municipal de los Estados Unidos Mexicanos, son: altitud entre 1600 y 1900 msnm, rango anual de temperatura entre 16 y 22 °C, un rango de precipitación anual entre 600 a 900 mm, clima semicálido subhúmedo con lluvias en verano, suelo predominante tipo vertisol (INEGI 2009).

### Origen del material biológico utilizado.

- ***Phaseolus vulgaris* (frijol común), variedad Flor de Junio Marcela.**  
Las semillas fueron proporcionadas por el laboratorio de ecología de plantas, del Departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV-Irapuato.
- ***Ocimum basilicum* (albahaca), *Tagetes erecta* (cempazúchitl), *Raphanus sativus* (rábano), *Coriandrum sativum* (cilantro).**  
Las semillas fueron adquiridas en “El Semillero de Oro, S.A de C. V.”, quienes reportan que las semillas provienen de plantas originarias del Bajío Mexicano.

- ***Colletotrichum lindemuthianum* (cepa 1088).**

Hongo fitopatógeno con el que se realizaron infecciones a las plantas de frijol. La cepa fue proporcionada por el laboratorio de ecología de plantas, del Departamento de Ingeniería Genética del CINVESTAV-Irapuato. Esta cepa se caracteriza por ser exclusiva de la región Norte-centro de México, y se reconoce que las variedades México 222 y la AB136 son susceptibles a esta cepa, de acuerdo a los cultivares diferenciales (Pastor-Corrales 1991). Adicionalmente se le asigna un nivel de virulencia bajo, de 16.6 (Rodríguez-guerra *et al.* 2006). Este organismo se mantuvo en medio PDA por 3 resiembras y en la cuarta se inoculaba en plantas de frijol para aislarlo nuevamente y así mantuviera su virulencia.

## Diseño experimental.

El experimento consistió en dos ciclos de cultivo exploratorios de asociación bajo condiciones de campo, durante los periodos julio-octubre del 2013 y en febrero-abril del 2014. Adicionalmente se realizaron cultivos subsecuentes en condiciones de invernadero durante los meses de noviembre del 2013 y mayo del 2014.

## Manejo del experimento en condiciones de campo.

Se realizó la colecta de suelo y posteriores análisis físico-químicos, determinación de tiempo de infección de plantas con *Colletotrichum lindemuthianum*, y 2 experimentos de asociación de cultivos en los periodos julio-octubre del 2013 y febrero-abril del 2014.

---

### *Parámetros físico-químicos del suelo*

- En los terrenos de cultivos experimentales, ubicados en la zona sur de las instalaciones del Centro de Investigación y de Estudios Avanzados, unidad Irapuato del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-Irapuato, IPN), se eligieron 16 puntos de muestreo al azar, de donde se tomaron 250 g. de suelo seco, por sitio, entre los 20 y 30 cm de profundidad (NOM-021-RECNAT-2000).
- Se realizó una mezcla de cada 4 muestras para obtener un total de 4 réplicas compuestas (repeticiones)
- Las muestras se mandaron analizar al Laboratorio Central Universitario, del Departamento de Suelos, de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH), a cargo del Ing. Arturo Jiménez López.

### El laboratorio reportó la siguiente metodología de análisis:

- pH: Potenciométrico, relación suelo:agua, 1:2
- Materia orgánica (MO) Walkey Black
- Nitrógeno Total: Arrastre de vapor Kjeldahl
- Fósforo asimilable: Olsen
- Potasio: extraído en acetato de amonio 1N, pH 7, relación 1:20 y determinado por espectrofotometría de emisión de flama.
- Capacidad de Intercambio Catiónico (CIC): Acetato de amonio 1N, pH 7, y determinado por arrastre de vapor.
- Capacidad de campo (CC): Olla de presión a 0.3 Atm.
- Textura: Hidrómetro de Bouyoucus.

---

#### *Inoculación de conidios de C. lindemuthianum*

- Se tomó una caja Petri con *Colletotrichum lindemuthianum*, del patotipo 1088, cultivada en medio papa-dextrosa-agar (PDA), que presentaba conidios abundantes.
  - Se agregaron 5 mL. de agua destilada estéril al interior de la caja Petri.
  - Con una varilla de plástico se raspó hasta que la concentración de conidios en el agua fuera abundante. La suspensión de conidios fue depositada en recipientes de volumen adecuado.
  - De la suspensión se tomó una alícuota y se contaron los conidios en un hematocitómetro
  - La suspensión de conidios se diluyó a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios por ml de agua y se colocó en un aspersor de agua, de uso doméstico.
  - Las plantas de frijol se asperjaron con la suspensión en ambas caras de las hojas, hasta un mojado uniforme.
  - Se esperó a que seca el agua.
  - Con una bolsa plástica transparente se cubrió la planta infectada.
  - La bolsa se retiró al tomar las muestras.
-

---

*Curva de incremento de ácido salicílico*

- Durante julio del 2013, en los terrenos de cultivos experimentales, ubicados en el CINVESTAV-Irapuato se delimitó una parcela de cultivo de 4 m. x 2.5 m., con 3 hileras (surcos) separadas por 80 cm.
- Se realizó siembra directa de las semillas de *P. vulgaris* variedad Flor de Junio Marcela, en las 3 hileras, con una separación entre plantas de 40 cm.
- No se realizó fertilización, ni riego.
- A las 9 semanas posteriores a la germinación se inocularon conidios de *Colletotrichum lindemuthianum*, a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios por ml de agua, en 10 plantas, 10 plantas adicionales permanecieron como controles.
- Se tomaron 20 muestras (10 repeticiones de tratamientos y 10 repeticiones de controles) de 250 mg de hoja a 0, 20, 40, 60 y 180 minutos posteriores a la aplicación de la suspensión de conidios.
- Se determinó la concentración de ácido salicílico por medio de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas de acuerdo a la siguiente técnica (Extracción y cuantificación de ácido salicílico).

---

*Extracción y cuantificación de ácido salicílico*

- De acuerdo a la técnica para extracción y cuantificación de ácido salicílico (Malamy *et al.* 1992), se pesaron 250 mg de tejido molido congelado y se adicionaron 0.750 mL de metanol al 90% y 250 ng de ácido ortoanísico (Sigma-Aldrich USA).
  - Se incubó 12 horas a  $-4^{\circ}\text{C}$  y posteriormente se centrifugaron las muestras durante 15 minutos a 13000 rpm
  - El sobrenadante se reservó y la pastilla se suspendió en 0.750 mL de metanol al 100% para centrifugarla durante 15 minutos a 13000 rpm
  - Los sobrenadantes se combinaron y el metanol se evaporó al vacío.
  - La pastilla resultante se suspendió en 0.5 mL de ácido tricloroacético al 5% con agua destilada, para centrifugarla posteriormente a 6000 rpm por 10 minutos.
  - La fase orgánica (superior) fue separada y secada con nitrógeno.
  - La pastilla se derivatizó adicionando 20  $\mu\text{L}$  de piridina y 80  $\mu\text{L}$
-

---

de BSTFA (N, O-Bis (trimethylsilyl)trifluoroacetamide with trimethylchlorosilane; SIGMA-ALDRICH, Alemania).

- Se dejó incubar 1 hora en campana de extracción.
  - Las muestras se inyectaron directamente a un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (Agilent 7890 series acoplado a un detector de tres ejes, con ionización electrónica selectiva de masas, (Agilent Technologies, Santa Clara CA, USA) con una columna DB-1MS (60m. X 250  $\mu$ m X 0.25  $\mu$ m Agilent Technologies), acoplado a un espectro de masas (MSD 5973) en modo de detección SIM para los iones 73, 135 y 282).
  - La temperatura del horno se programó de 150 °C por 3 minutos, después, un aumento de 4 °C/minuto hasta 260 °C por 25 minutos. La velocidad del flujo de gas helio fue de 1 ml/min. La temperatura del inyector fue de 250 °C.
-

---

*Extracción y  
cuantificación de  
ergosterol.*

- Se pesaron 0.5 g de tejido vegetal fresco.
- Se agregaron 0.5 mL de etanol absoluto a 4 °C.
- La muestra se dejó reposar 3 minutos
- Posteriormente se molió en mortero estéril.
- Se recuperó el triturado y se enjuagó el mortero con 0.5 mL de etanol absoluto para luego mezclar el etanol con el triturado.
- La muestra se centrifugó 5 minutos a 14000 rpm y el el sobrenadante se guardó.
- La pastilla se suspendió en 0.5 mL de etanol absoluto a 4 °C, para después agitarla y centrifugarla 5 minutos a 14000 rpm.
- Los sobrenadantes se juntaron y el volumen se ajustó a 1.5 mL. con etanol absoluto
- El sobrenadante se pasó por filtros SEP-PAK C18 (Waters Associates Inc., Milford MA, USA).
- Las muestras se analizaron por cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC), en un equipo Shimadzu class 10A series, Kyoto, Japón, con dos bombas LC-10AT equipado con el software Class LC-10AT series, versión 5.03 (Shimadzu, Kyoto, Japón), con una columna Zorbax C18 (Agilent technologies, Wilmington, DE, USA).

---

*Área foliar total y  
dañada*

- Este procedimiento se llevó a cabo sin cortar las hojas de las plantas.
  - Se colocaron las hojas de la planta de interés entre una placa circular de acrílico transparente de 20 cm de diámetro y otra placa circular de acrílico blanco, de las mismas dimensiones, pero con una escala de 6 cm.
  - Las hojas así prensadas fueron colocadas en posición para la toma de fotografías con una cámara digital SONY C1904.
  - Las imágenes se procesaron con el programa ImageJ (software libre).
  - Para cada imagen se realizó una transformación de los pixeles de la escala a cm, con ello los valores en pixeles de la imagen de las hojas era trasformado a área.
-

---

*Parámetros de rendimiento.*

- El área foliar se determinó por medio de la técnica descrita anteriormente, con el software ImageJ
- Para la cuantificación de las vainas, se esperó a que más del 70 % de las plantas se encontraran en punto de cosecha (vainas llenas y con color marrón) y se contaron (Escalante y Kohashi 1993).

---

*Cultivos en campo*

- Durante julio del 2013 y abril del 2014, en los terrenos de cultivos experimentales, del CINVESTAV-Irapuato se delimitaron 25 parcelas de 4 m. x 2.5 m., con 3 hileras (surcos) separadas por 80 cm. y un distanciamiento entre parcelas de 2 m. véase Figura 1. las cuales fueron distribuidas completamente al azar en el terreno de cultivo.
- En el periodo julio-octubre del 2013 se realizaron los tratamientos: *P. vulgaris-Ocimum basilicum*, *P. vulgaris-Tagetes erecta*, *P. vulgaris-Raphanus sativus*, *P. vulgaris-Coriandrum sativum* y *P. vulgaris-P. vulgaris* (como control).
- En el periodo febrero-abril del 2014 se repitieron los tratamientos: *P. vulgaris-Ocimum basilicum*, *P. vulgaris-Tagetes erecta* y *P. vulgaris-P. vulgaris*.
- Las semillas de frijol fueron sembradas directamente en las 3 hileras de todas las parcelas. Sin embargo, en la hilera central se colocaron 4 semillas de frijol y 5 semillas de la especie a asociar (distancia entre planta y planta de 40 cm.).
- Cada parcela constituyó una unidad experimental y se distribuyeron completamente al azar en el terreno de cultivo, cada tratamiento presentó 5 repeticiones (5 parcelas).
- No se realizó riego ni fertilización en el periodo Julio-Octubre del 2013, mientras que en el periodo Febrero-Abril del 2014 sólo se aplicó riego 3 veces a la semana.
- En el 2013 se determinó el área foliar y el porcentaje natural de daño foliar por herbívoros y patógenos a la 3, 6, 9 Y 11 semanas posteriores a la germinación y, a las 6 y 11 semanas en el 2014.
- Se realizó la inoculación de las plantas de frijol con la suspensión de conidios de *Colletotrichum lindemuthianum* a una concentración de  $1 \times 10^6$  conidios por ml de agua, en la novena semana posterior a la germinación de las semillas, en ambos ciclos.
- Posteriormente se tomaron muestras de hoja a 0 y 180 minutos posteriores a la inoculación del patógeno, en el periodo Julio-

Octubre del 2013 y, a los 0, 180 minutos y 24 horas en el periodo febrero-Abril del 2014.

- A las 11 semanas posteriores a la germinación de ambos ciclos de cultivo se tomaron muestras foliares compuestas para cuantificar el ergosterol, con un  $n=5$  para el primer ciclo de cultivo y  $n=10$  para el segundo ciclo de cultivo.
- Al final de los ciclos de cultivo se midieron parámetros del rendimiento del frijol, con la técnica de Escalante y Kohashy (2013) mencionada anteriormente.

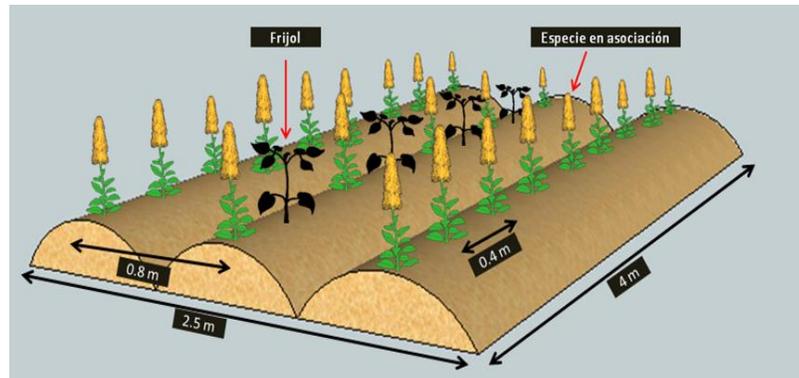


Figura 1 Representación de una parcela (unidad experimental) donde se cultivaron plantas de frijol intercaladas con otras especies de plantas aromáticas. Se utilizó un total de 25 parcelas, 5 repeticiones para cada tratamiento.

#### Manejo del experimento en condiciones de invernadero.

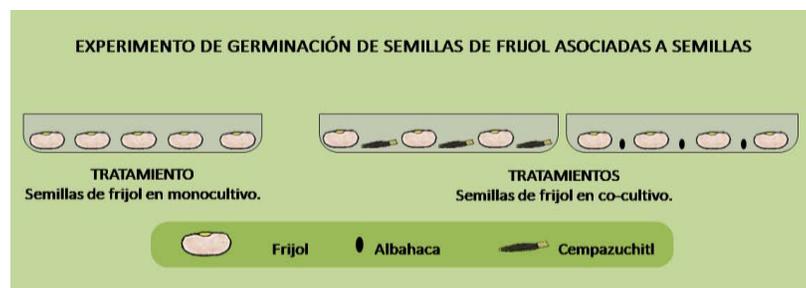
Posteriormente, los cultivos se llevaron a cabo bajo condiciones de invernadero, únicamente con las asociaciones frijol-frijol, frijol-albahaca y frijol-cempazúchitl.

Para indagar si se presentaban efectos en el desarrollo de las plantas de frijol causados por las plantas vecinas, se realizaron dos experimentos: uno para evaluar el porcentaje de germinación de semillas de frijol y otro para la germinación de los conidios de *Colletotrichum lindemuthianum*.

---

*Germinación de semillas de frijol asociadas a semillas.*

- Se realizaron 3 tratamientos: semillas de frijol asociadas a semillas de frijol, semillas de frijol asociadas a albahaca y semillas de frijol asociadas a cempazúchitl véase Figura 2.
- Dentro de cajas plásticas de 9 cm de alto x 15cm de ancho x 23 cm de largo (REYMA, México) se colocaron 50 semillas de frijol y 50 semillas de la especie a asociar, por caja.
- Las semillas se colocaron a 27 °C y se esperó su germinación.
- Al segundo día de iniciado el experimento se contabilizaron las semillas germinadas y se obtuvo su porcentaje, lo mismo para el día 3, 4 y 5.



*Figura 2 Representación de los tres tratamientos del primer experimento de germinación de semillas de frijol, en donde se colocaron semillas de las diferentes especies dentro de cajas plásticas.*

---

*Germinación de semillas de frijol asociadas a plántulas.*

- Se realizaron 4 tratamientos, asociando semillas de frijol-frijol, semillas de frijol-plántulas de frijol (controles), semillas de frijol-plántulas de albahaca y semillas de frijol-plántulas de cempazúchitl véase Figura 3.
- En 10 cajas de plástico de 9cm de alto x 15cm de ancho x 23 cm de largo se colocaron 50 semillas de albahaca, en otras 10 cajas 50 semillas de cempazúchitl y en 10 cajas restantes 50 semillas de frijol.
- Todas las semillas se germinaron a 27 °C.
- A una semana posterior a la germinación de las semillas se colocaron 100 semillas de frijol en cajas vacías y 50 semillas de frijol en cada caja de las que contenían plántulas intercalándolas las plántulas.
- Todas las cajas se colocaron a 27 °C y al segundo día se comenzó el conteo de semillas germinadas de frijol para determinar su porcentaje.

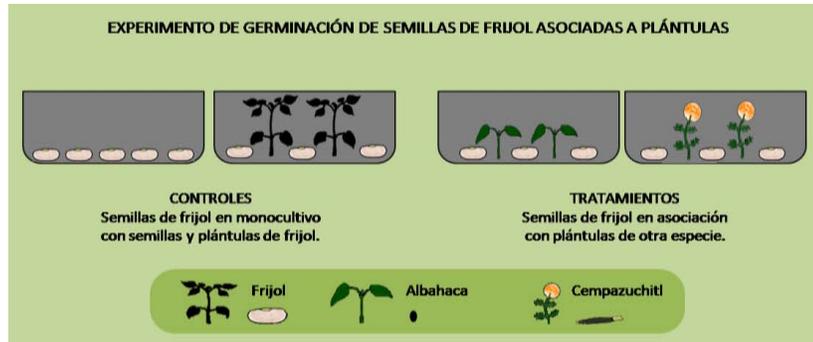


Figura 3 Representación de los dos tratamientos y dos controles del segundo experimento de germinación de semillas de frijol, en donde se colocaron semillas de frijol asociadas a plántulas de la misma o de otras especies, dentro de cajas plásticas.

*Germinación de conidios de C. lindemuthianum.*

- Realizado bajo el diseño del experimento anterior, véase Figura 3.
- Dos días posteriores a la agregación del segundo lote de semillas se colocaron 2 recipientes plásticos de 1.5 cm. de alto por 4 cm de diámetro con una capa de agar a la cual se le agregaron 100  $\mu$ L. de una suspensión de conidios a una concentración de  $1 \times 10^6$  por ml.
- Después de 12 y 24 hrs. se tomaron muestras del agar de 1  $\text{cm}^2$ .
- El agar se colocó en portaobjetos y a cada muestra se le agregó una gota de azul de lactofenol al 100 % (MERCK, USA).
- Las muestras se observaron en el microscopio para realizar el conteo de conidios germinados y determinar su porcentaje.

*Vías de percepción de compuestos volátiles.*

- En este experimento se utilizaron cajas de plástico grandes (macetas) de 9 de alto x 15cm de ancho x 23 cm de largo y cajas chicas de 11cm x 11cm x 7 cm (REYMA, México).
- Se realizó un diseño de dos factores, el primer factor fue la asociación- frijol-frijol, frijol-albahaca y frijol-cempazúchitl, el segundo factor fue la vía de interacción: total, aérea, subterránea o ninguna, véase Figura 4.
- Para lograr una señalización completa se colocaron 2 semillas en una maceta y se cubrieron con otra caja completa.

- Para la señalización subterránea se colocaron 2 semillas en una maceta y se cubrieron con dos cajas chicas.
- La señalización aérea se realizó colocando semillas individuales en cajas chicas y cubriendo los pares con una caja grande.
- Por último, las plantas control, sin señalización se colocaron en cajas chicas individuales, que se cubrieron con cajas chicas.
- Se tomaron fotografías foliares del frijol a 1, 2, y 3 semanas posteriores a la germinación para determinar el área foliar total por planta.

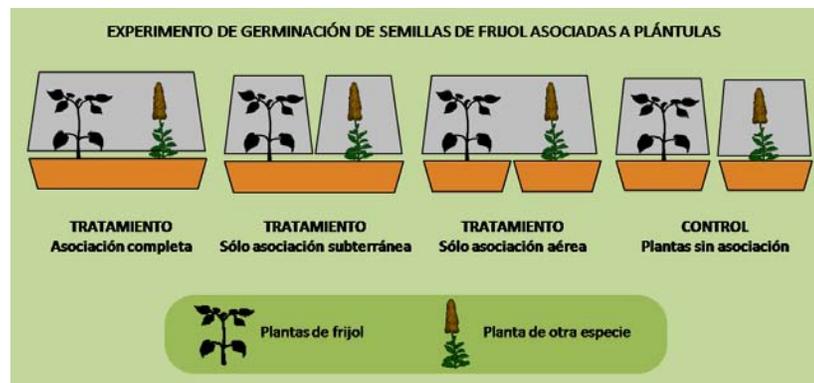


Figura 4 Representación de los cuatro tratamientos del tercer experimento en invernadero para evaluar el efecto de las vías de señalización (aérea o subterránea) en el desarrollo de las plantas de frijol.

---

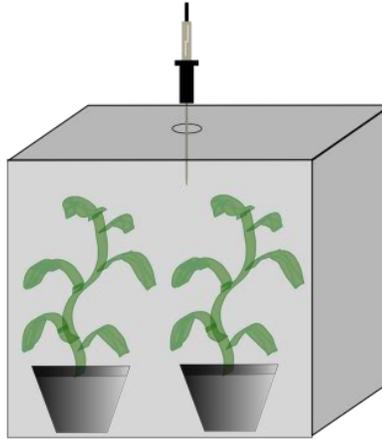
*Determinación del tiempo de exposición de las fibras SPME.*

- Se colocó 1 fibra (50/30  $\mu\text{m}$ , DVB/CAR/PDSM; Supelco, Bellefonte, PA, USA) de carboxen/polidimetilsiloxano/carbowax, usadas en las pruebas de “headspace” para microextracción en fase sólida (SPME), dentro de una caja de acrílico (de 50 cm de alto por 40 cm de largo, por 20 cm de ancho), que contenía 2 plantas de frijol, o 2 de albahaca o 2 de cempazúchitl.
- El experimento se realizó con 5 repeticiones.
- Las fibras se expusieron al ambiente interior por 1, 2, 3, 4 y 24 horas.
- Las fibras se desorbieron en un cromatógrafo de gases acoplado a espectrómetro de masas (GC-MS) (Agilent Technologies Gas Chromatograph 7890A) con una columna J&W DB-5MS UI: USD611826H al 5% de fenil-metilpolisiloxano de 20 m x 180  $\mu\text{m}$  x 0.36  $\mu\text{m}$ . La temperatura del horno se programó de 60 °C a 80°C a 5°C/min., posteriormente de 80°C a 210°C a 8°C/min. donde se mantuvo retenida por 26.25 minutos. La velocidad del flujo de gas helio fue de 1.6 ml/min. La temperatura del inyector fue de 180 °C.
- La identificación de los compuestos fue realizada por comparación con el espectro de masas de la biblioteca Nist<sup>®</sup> 0.5.

---

*Determinación de los compuestos orgánicos volátiles*

- Se colocaron 2 plantas en cada caja de acrílico en las combinaciones: frijol-frijol, frijol-albahaca, albahaca-albahaca, frijol-cempazúchitl y cempazúchitl-cempazúchitl, véase Figura 5.
  - Las fibras de microextracción en fase sólida se expusieron al ambiente interior por 3hrs
  - Se procedió al análisis por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas, bajo el método descrito con anterioridad para fibras SPME.
  - Los compuestos obtenidos en el cromatograma fueron determinado por comparación con la biblioteca Nist<sup>®</sup> 0.5.
-



*Figura 5 Representación del experimento realizado para tomar muestras de compuestos orgánicos volátiles.*

---

*Determinación de los compuestos volátiles representativos.*

- Se superpusieron todos los cromatogramas de cada tratamiento.
- Se delimitó un umbral mínimo de 200,000 unidades de área bajo la curva, sobre la cual se buscaron los 2 o 3 picos más altos para cada especie, que se presentaran en las 5 repeticiones.
- Se realizó lo mismo con cada tratamiento
- Los compuestos resultantes, con mayor abundancia y más constantemente encontrados en los perfiles de cada especie, se asignaron como “compuestos volátiles representativos.”

## RESULTADOS.

### RESULTADOS DE LA BÚSQUEDA DE PROCESOS DE FACILITACIÓN EN CAMPO.

#### Características edáficas

Los valores obtenidos del análisis del suelo se muestran en la Tabla 1.

Tabla 1 Tabla de los parámetros físico-químicos encontrados en las muestras del suelo donde se realizaron los experimentos en campo.

| Parámetro            | Resultado | Parámetro  | Resultado |
|----------------------|-----------|--|-----------|
| pH                   | 7.99      | Capacidad de Intercambio catiónico (Cmol (+)/Kg) | 48.97     |
| % Materia Orgánica   | 1.95      |  |           |
| % Nitrógeno Total    | 0.09      | % de Porosidad                                   | 47.47     |
| P asimilable (mg/Kg) | 14.18     | % de Capacidad de campo                          | 50.46     |
| K asimilable (mg/Kg) | 824.00    | Textura  | Arcillosa |

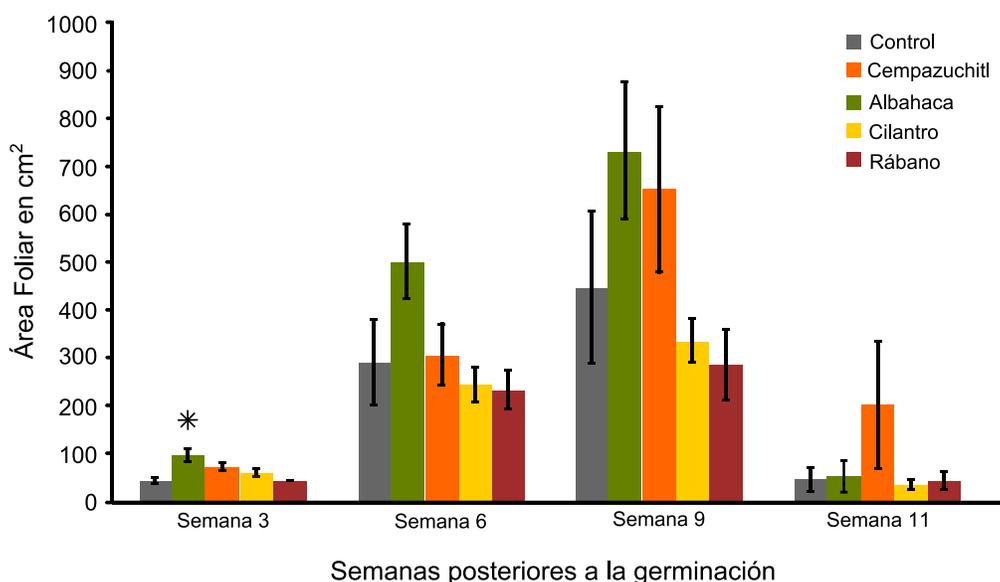


Figura 6 Área foliar de plantas del frijol cultivadas en combinación con diferentes especies, durante el periodo julio-Octubre del 2013. (Media +/- EE, n= 19, 9, 5 y 5 respectivamente para cada semana). Diferencias estadísticamente significativas representadas con (\*), Tukey:  $p < 0.05$ .

## Área foliar en campo

Durante la primera repetición (periodo del 2013) se observó un incremento significativo del área foliar ( $P < 0.05$ , de acuerdo a la prueba *pos hoc* de Tukey,  $n=19$ ) de las plantas de frijol asociadas a albahaca, en la semana 3 posterior a su germinación, mientras que a semanas posteriores solo se mantuvo esa tendencia, véase Figura 6. Este patrón también se encontró en el segundo ciclo de cultivo (periodo del 2014) bajo los tratamientos de frijol con albahaca o cempazúchitl, a 6 y 11 semanas posteriores a la inoculación, véase Figura 7.

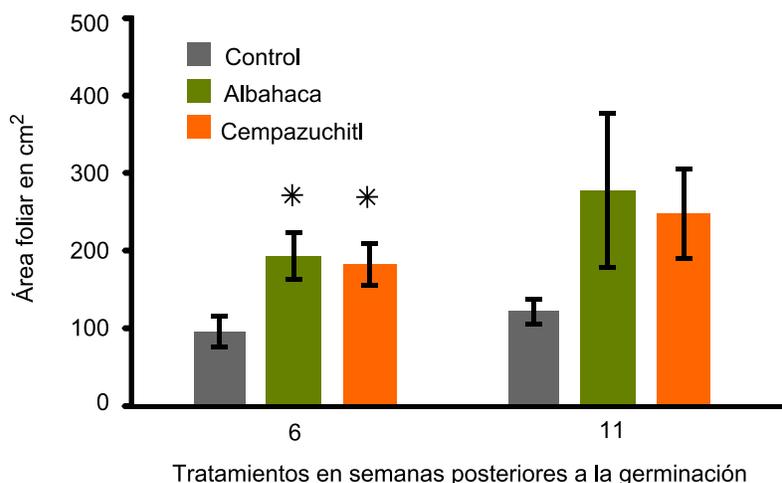


Figura 7 Área foliar de plantas de frijol del periodo febrero-abril del 2014 (Media +/- EE,  $n = 12$  y  $6$  respectivamente para cada semana, diferencias estadísticamente significativas (\*) con el control de cada semana, de acuerdo a prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ).

## Daño foliar en campo

El daño foliar por patógenos, en plantas de frijol asociadas a cempazúchitl y albahaca, no presentó diferencias estadísticamente significativas, sin embargo, los promedios de los controles estuvieron por debajo de los pertenecientes al grupo control, en el primer ciclo de cultivo, véase Figura 8. En el segundo ciclo de cultivo, en la semana 6 posterior a la germinación, los frijoles asociados a albahaca mostraron daño por agentes patógenos, y tampoco fue significativamente menor el daño por herbivoría ( $P < 0.05$ , de acuerdo a la prueba *pos hoc* de Tukey,  $n=12$ ), sin embargo, en la semana 11, los frijoles en monocultivo y los asociados a las plantas de albahaca no presentaron diferencias significativas, mientras que los frijoles asociados a cempazúchitl mostraron un mayor daño significativo por herbívoros ( $P < 0.05$ , de acuerdo a la prueba *pos hoc* de Tukey,  $n=6$ ), véase Figura 9.

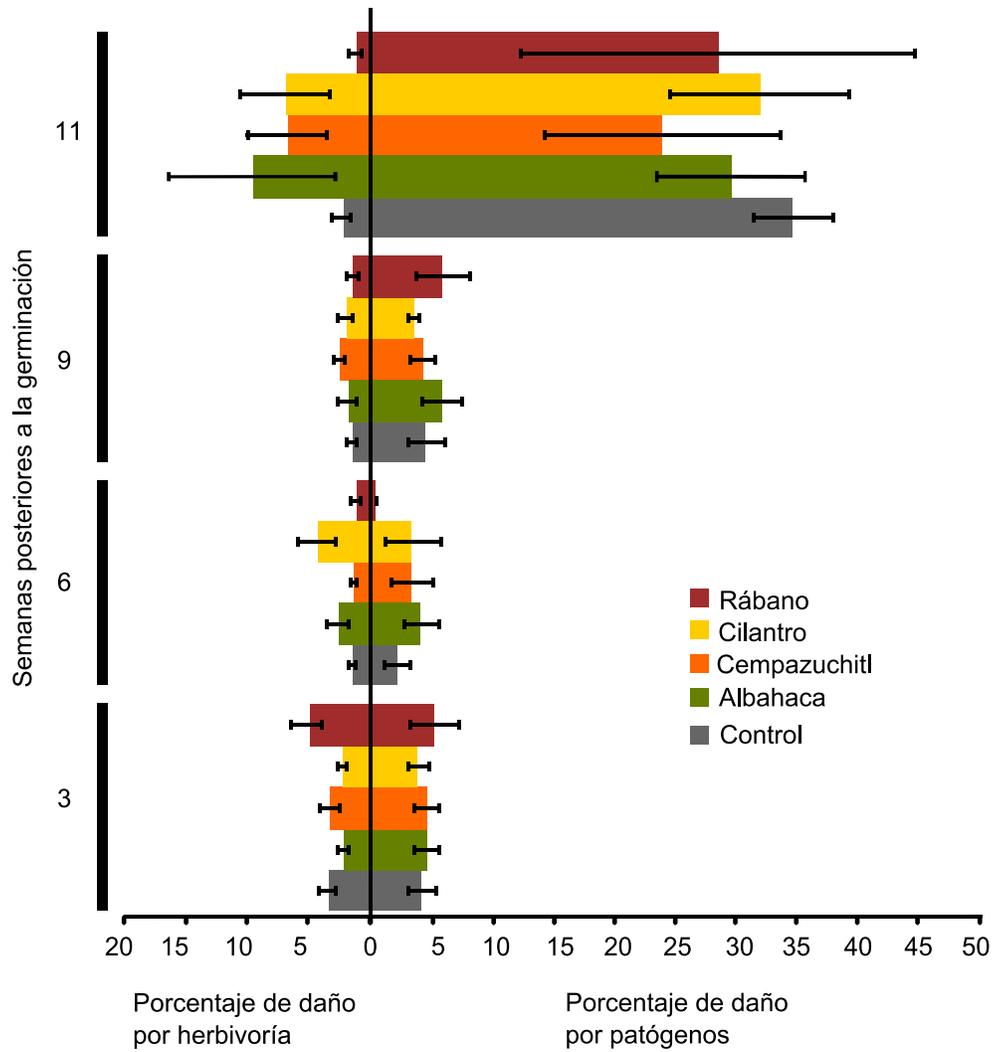


Figura 8 Daño por herbívoros y patógenos del el periodo Julio-Octubre del 2013 (Media +/- EE, n= 19, 9, 5 y 5 respectivamente para cada semana).

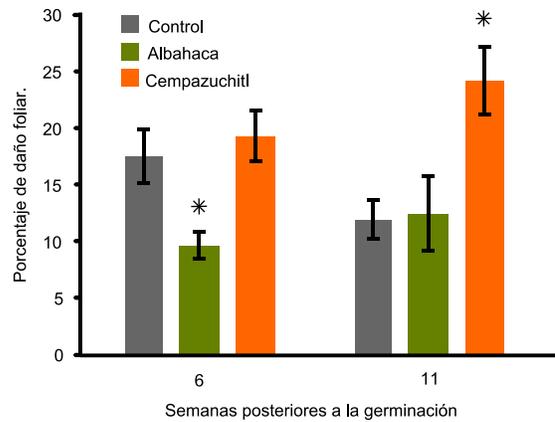


Figura 9 Daño por herbivoría del periodo Febrero-Abril del 2014. (Media +/- EE, n= 12 y 6 respectivamente para cada semana, diferencias estadísticamente significativas (\*) con el control de cada semana, de acuerdo a Tukey (P< 0.05).

Una gráfica de dispersión del daño foliar de la semana 6 del periodo febrero-abril del 2014 muestra que, cuando se asociaron las plantas de frijol con las de albahaca, el daño por herbivoría fue significativamente menor ( $P < 0.05$ , de acuerdo a la prueba *pos hoc* de Tukey,  $n=12$ ) y presentaron áreas foliares significativamente mayores que el grupo control ( $P < 0.05$ , de acuerdo a la prueba *pos hoc* de Tukey,  $n=12$ ). En cambio, las plantas de frijol asociadas a cempazúchitl no tenían diferencias significativas de daño foliar, en comparación con el grupo control, pero si se observó una tendencia de mayor porcentaje de daño cuando sus áreas foliares eran menores (plantas más pequeñas), sin embargo, el área foliar mostró diferencias ( $P < 0.05$ , de acuerdo a la prueba *pos hoc* de Tukey,  $n=12$ ) con el grupo control, de monocultivo de frijol, véase Figura 10.

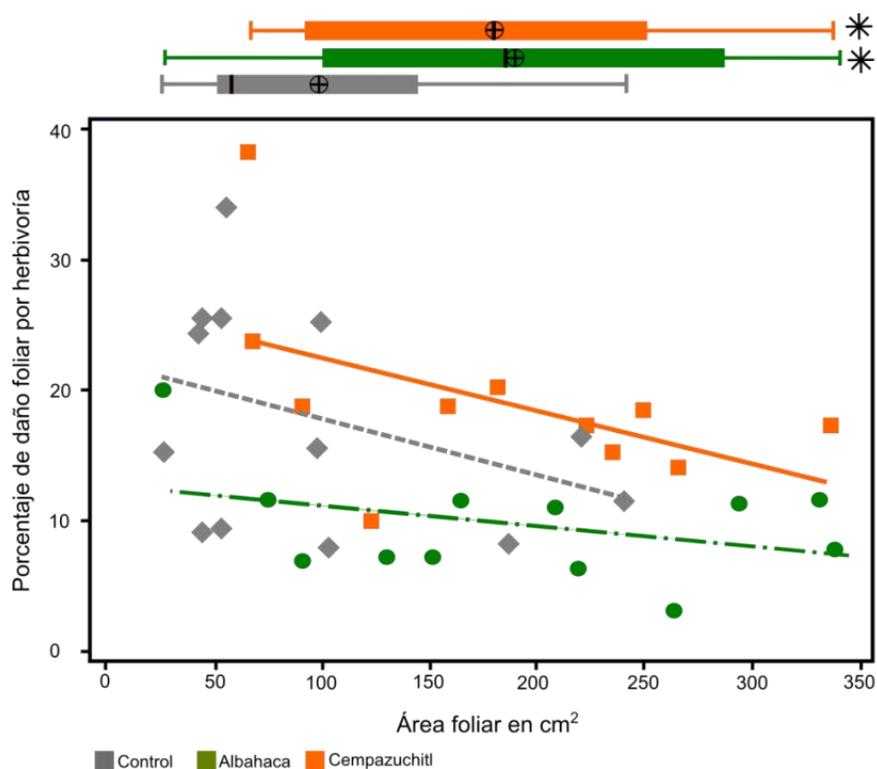


Figura 10 Relación daño foliar/área foliar total a 6 semanas posteriores a la germinación de las plantas de frijol, durante el periodo de cultivo Febrero-Abril del 2014 (Media  $\pm$  EE,  $n=13$ , frijol; 12, albahaca y 10, cempazúchitl, diferencias estadísticamente significativas (\*) con el control de cada variable, de acuerdo a Tukey ( $p < 0.05$ ).

### Ácido salicílico en campo

Al determinar las concentraciones de ácido salicílico a diferentes tiempos posteriores a la inoculación de *Colletotrichum lindemuthianum* se encontró un incremento gradual del metabolito a partir de la inoculación del patógeno. Sin embargo, éste incremento fue distinguible de un estado basal a 3 horas posteriores de la inoculación, véase Figura 11.

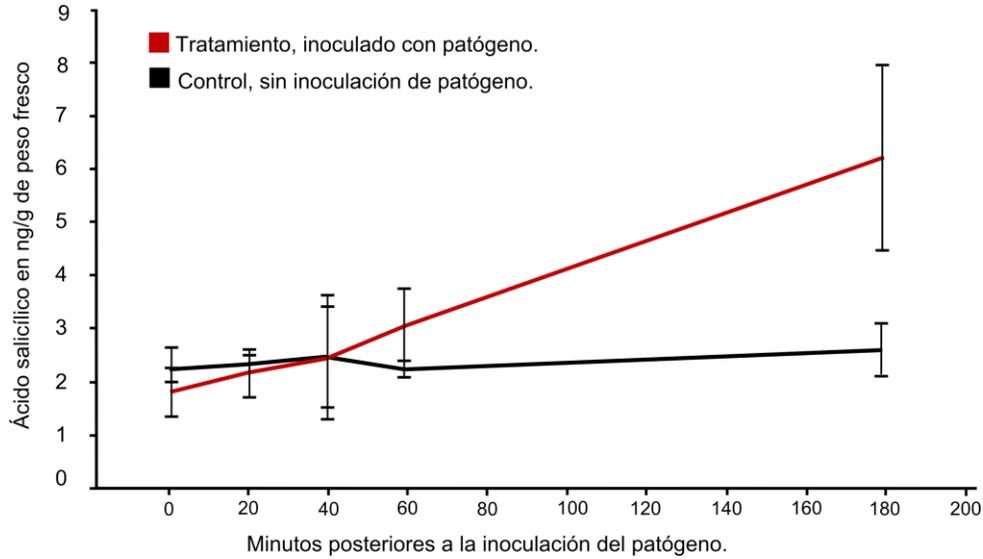


Figura 11 Incremento de la concentración de ácido salicílico libre en plantas de frijol variedad Flor de junio Marcela, a diferentes tiempos posteriores a la inoculación de conidios de *Colletotrichum lindemuthianum*.

Los análisis posteriores de ácido salicílico, durante el periodo julio-octubre del 2013, mostraron una elevada variabilidad, aunada a un ligero aumento en el promedio de las concentraciones del metabolito, a 3 horas posteriores de la inoculación, véase Figura 12.

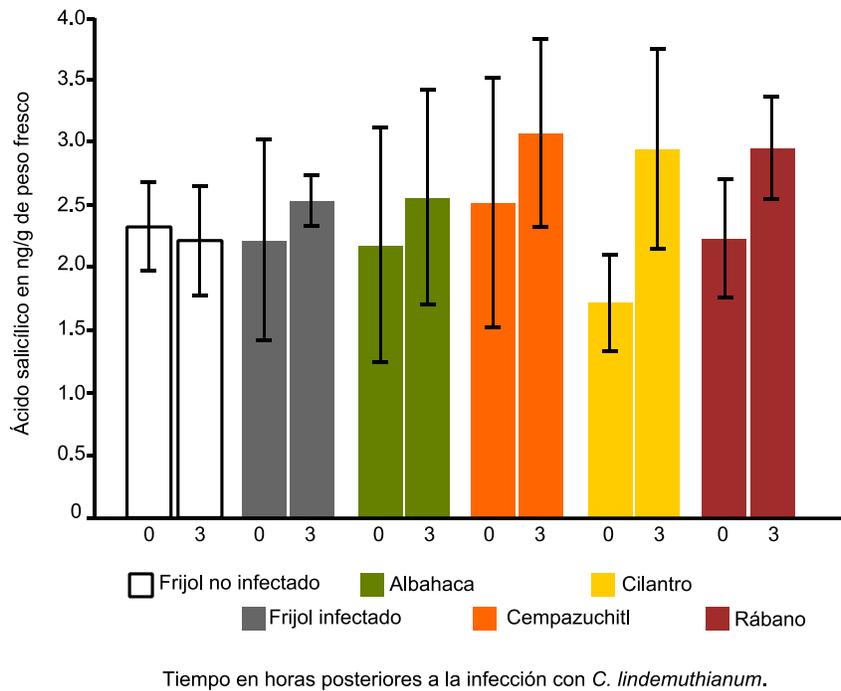


Figura 12 Incremento del ácido salicílico libre en tejido foliar de frijol inoculado con conidios de *Colletotrichum lindemuthianum*, en el periodo julio-octubre del 2013 (Media +/- EE, n=5).

En el periodo febrero-abril del 2014 se observó una tendencia a incrementar las concentraciones de ácido salicílico, en las asociaciones frijol-frijol y frijol-cempazúchitl, mientras que en el tratamiento con albahaca no se presentó este aumento en las concentraciones del compuesto. Adicionalmente, es posible observar que el comportamiento de las concentraciones de ácido salicílico para el tratamiento con frijol y cempazúchitl es diferente a sus respectivos controles, sin inoculación, representados con la línea negra, véase Figura 13

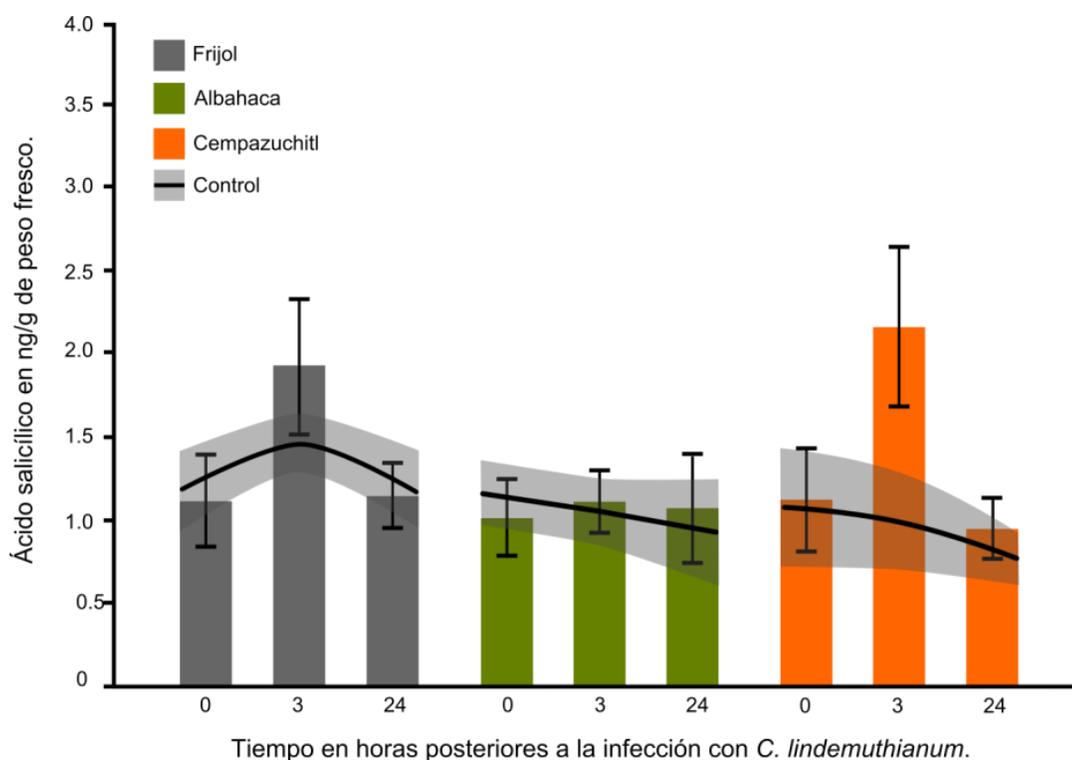


Figura 13 Incremento del ácido salicílico libre en tejido foliar de frijol inoculado con conidios de *Colletotrichum lindemuthianum*, en el periodo febrero-abril del 2014. (Media  $\pm$  EE, n=5). La línea negra representa grupos control extra, sin inoculación de patógeno y con una secuencia de muestreo igual a los tratamientos; el sombreado representa el error estándar de esos grupos control.

### Ergosterol en campo

En el periodo julio-octubre del 2013, las concentraciones de ergosterol presentaron una tendencia a menor concentración en el monocultivo de frijol, relativa a los tratamientos de asociación de especies, esto, a pesar del mayor daño por hongos patógenos naturales que presentó el monocultivo, véase Figura 14.

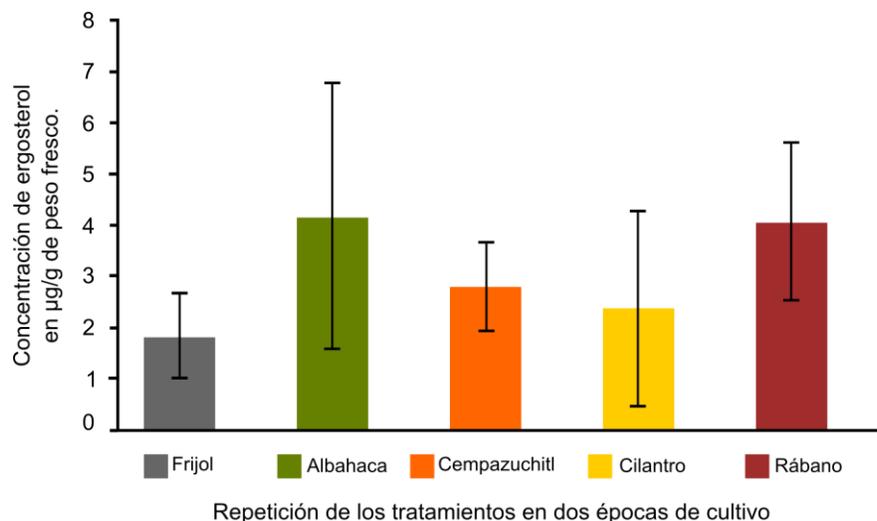


Figura 14 Concentración de ergosterol en tejido foliar de plantas de frijol pos-inoculación de *Colletotrichum lindemuthianum*. Periodo julio-octubre del 2013 (Media +/- EE, n=5).

En el periodo febrero-abril del 2014, el fenómeno se invirtió; el tratamiento control presentó los mayores niveles de ergosterol, con diferencias significativas ( $P < 0.05$ , de acuerdo a la prueba *pos hoc* de Tukey,  $n=10$ ), comparado con los tratamientos de albahaca y cempazúchitl. Sin embargo, no se observó daño causado por patógenos en ningún tratamiento, véase Figura 15.

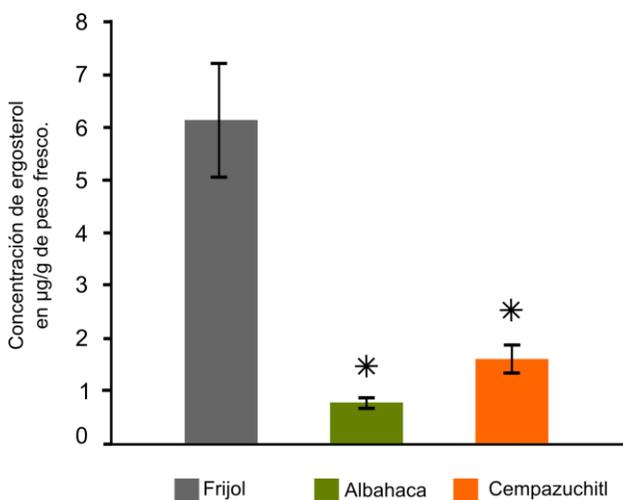


Figura 15 Concentraciones de ergosterol en tejido foliar de plantas de frijol posinfectados por *Colletotrichum lindemuthianum*. Periodo febrero-abril del 2014 (Media +/- EE,  $n=10$ , diferencias estadísticamente significativas (\*) con el control, de acuerdo a Tukey ( $p < 0.05$ )).

## Rendimiento de cosecha en campo

La producción de los frijoles, evaluada en el número de vainas normales por planta, presentó promedios menores en el número de vainas para el monocultivo, en ambos ciclos de cultivo; julio-octubre del 2013 y febrero-abril del 2014, que la observada en las combinaciones de esta especie con albahaca o con cempazúchitl, véase Figura 16.

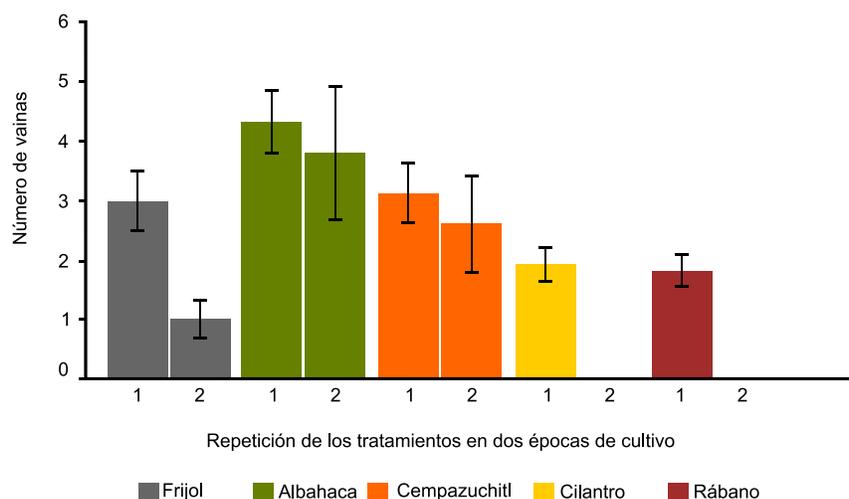


Figura 16 Producción de vainas por planta de frijol. Las barras con el número 1 se refieren al periodo julio-octubre del 2013 (Media +/- EE, n= 11, 15, 18, 15, 12 respectivamente para cada tratamiento). Las barras con el número 2 corresponden al periodo febrero-abril del 2014 (Media +/- EE, n= 10 para todos los tratamientos).

## RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LOS COMPUESTOS VOLÁTILES EN SU PAPEL DENTRO DE LOS PROCESOS DE FACILITACIÓN.

### Efectos de la asociación de especies en la germinación de semillas y conidios, bajo condiciones de invernadero

Se presentó un mayor porcentaje acumulado de germinación ( $P < 0.05$ , de acuerdo a la prueba *pos hoc* de Tukey,  $n=4$ ) en el monocultivo de semillas de frijol, a las 72 horas de iniciada la germinación, en el experimento de asociación de semillas-semillas, véase Figura 17.

En el experimento de combinación de semillas con plántulas, se observó una tendencia a mayor porcentaje acumulado de germinación de las semillas de frijol asociadas a plántulas de albahaca y cempazúchitl, a las 72 horas de iniciada la germinación, véase Figura 18.

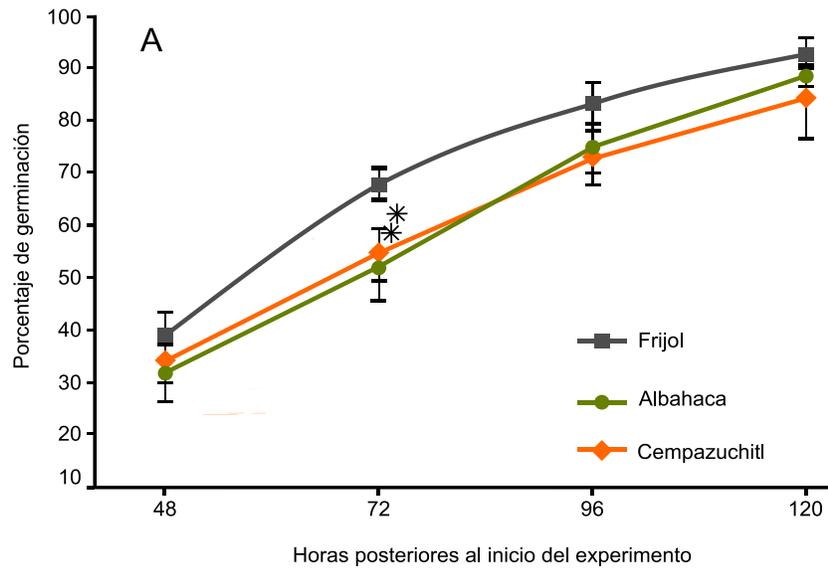


Figura 17 Porcentaje acumulado de germinación de semillas de frijol asociadas a semillas de frijol, de albahaca o de cempazúchitl. (Media +/- EE, n= 4). Diferencias estadísticamente significativas (\*) con el control de la misma hora, de acuerdo a Tukey ( $p < 0.05$ ).

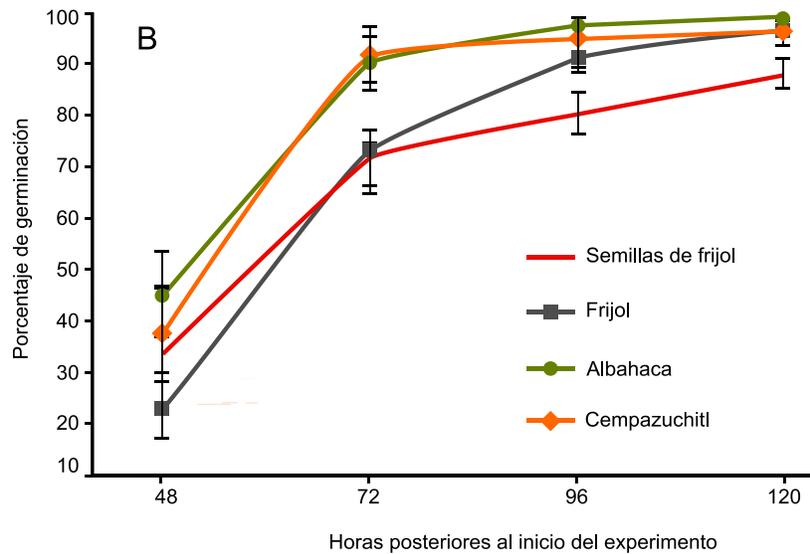


Figura 18 Porcentaje acumulado de germinación de semillas de frijol asociadas a plántulas de frijol, de albahaca o de cempazúchitl, y un control de semillas de frijol asociadas a semillas de frijol (Media +/- EE, n= 10).

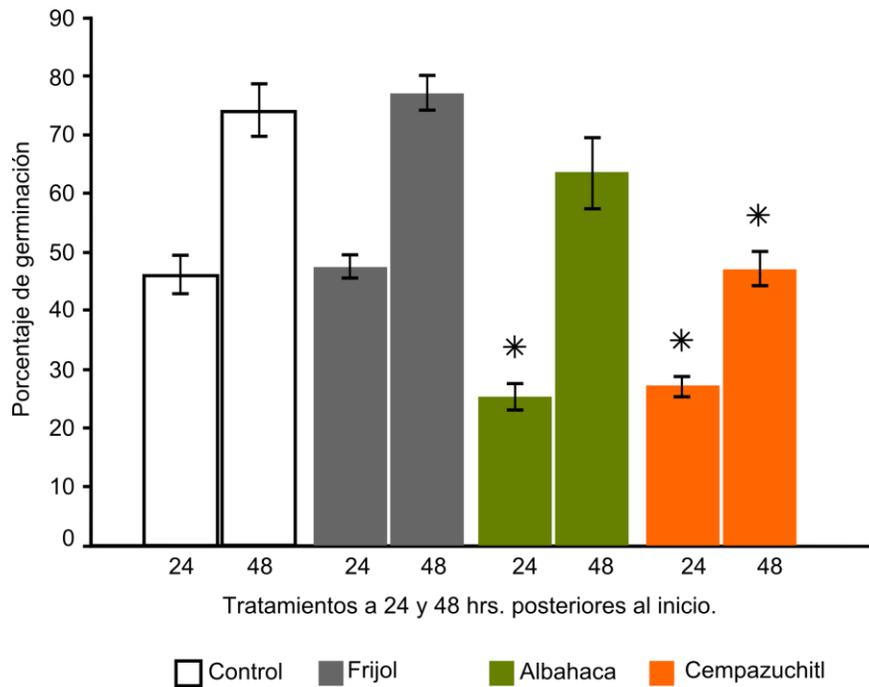


Figura 19 Porcentaje de germinación de conidios a las 24 y 48 de exponerlos en un ambiente aéreo de plantas. (Media +/- EE, n= 4, diferencias estadísticamente significativas (\*) con el control, de acuerdo a Tukey,  $p < 0.05$ ).

La germinación de conidios pertenecientes a *Colletotrichum lindemuthianum*, en presencia de plántulas de cempazúchitl, fue significativamente menor que en el grupo control, a 24 y 48 horas de exposición, mientras que con albahaca sólo fue significativo a 24 horas ( $P < 0.05$ , de acuerdo a la prueba *pos hoc* de Tukey,  $n=4$ ), véase Figura 19 Porcentaje de germinación de conidios a las 24 y 48 de exponerlos en un ambiente aéreo de plantas. (Media +/- EE,  $n= 4$ , diferencias estadísticamente significativas (\*) con el control, de acuerdo a Tukey,  $p < 0.05$ ).

#### Área foliar en invernadero

Se observó un incremento significativo en el área foliar total de plantas de frijol asociadas a plantas de albahaca, después de 4 semanas de su germinación y crecimiento en macetas separadas, en condiciones de invernadero ( $P < 0.05$ , de acuerdo a la prueba *pos hoc* de Tukey,  $n=6$ ), véase Figura 20.

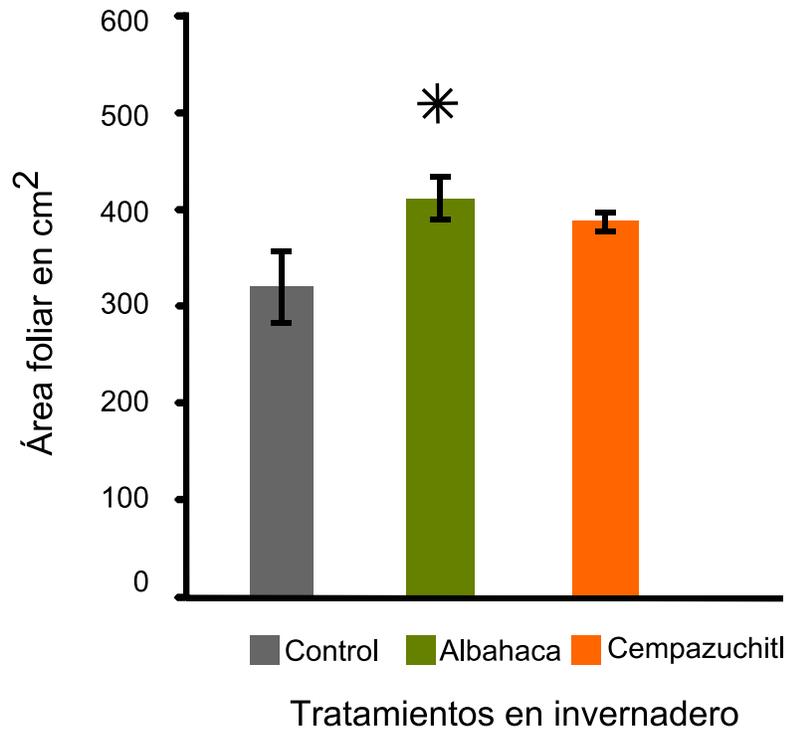


Figura 20 Área foliar de plantas de frijol 4 semanas posteriores a su germinación, en invernadero. (Media +/- EE, n= 6, diferencias estadísticamente significativas (\*) con el control, de acuerdo a Tukey,  $p < 0.05$ ).

Al encerrar las plantas en cajas plásticas, separando sus vías de comunicación-señalización, se encontró que, bajo una comunicación aérea las plantas de frijol asociadas a frijol y las asociadas a albahaca tendieron a mantener áreas foliares totales similares, mientras que las asociadas a cempazúchitl presentaron un promedio de área foliar menor, véase Figura 21 (A). Bajo un sistema de comunicación subterránea las plantas de frijol asociadas a albahaca mantuvieron un promedio cercano a 140 cm<sup>2</sup>, mientras que el resto de los tratamientos presentaron menor área foliar, véase Figura 21 (B). En un diseño de comunicación completa las plantas de frijol asociadas a albahaca alcanzaron un promedio de área foliar cercano a los 160 cm<sup>2</sup>, y los restantes tratamientos presentaron promedios de área foliar menores, véase Figura 21 (C). Los tres gráficos muestran también que en circunstancias de señalización aérea, las plantas de frijol obtuvieron los mayores promedios de área foliar, véase Figura 21.

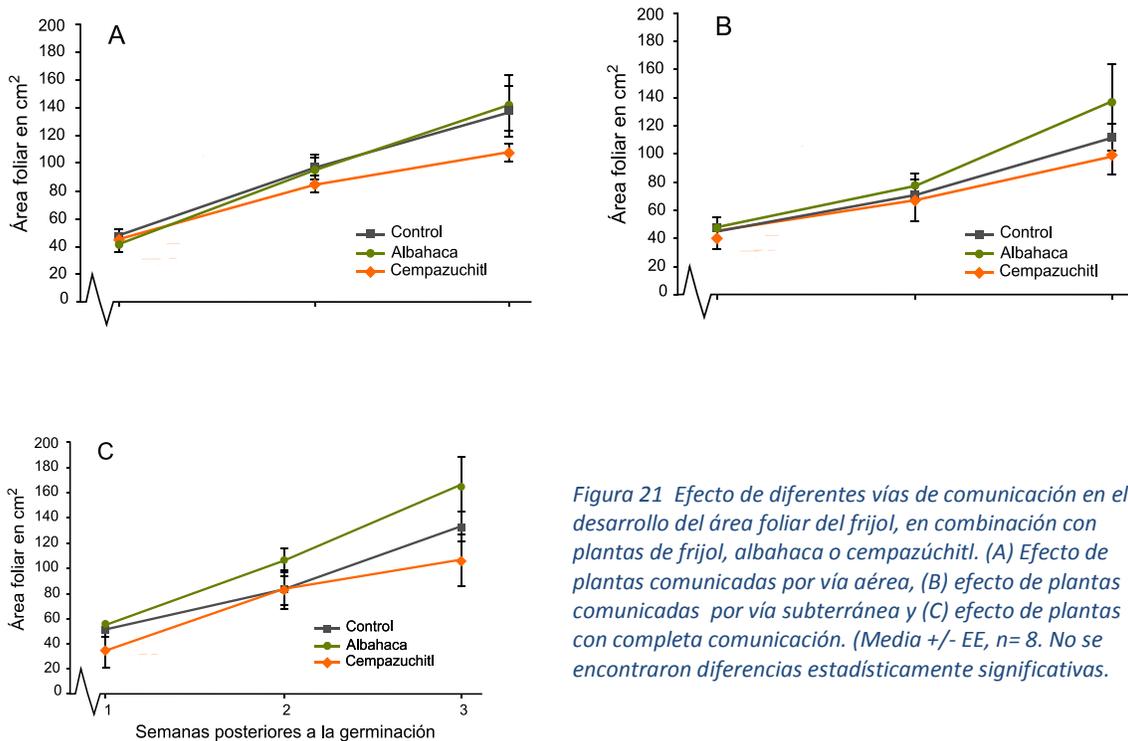


Figura 21 Efecto de diferentes vías de comunicación en el desarrollo del área foliar del frijol, en combinación con plantas de frijol, albahaca o cempazúchitl. (A) Efecto de plantas comunicadas por vía aérea, (B) efecto de plantas comunicadas por vía subterránea y (C) efecto de plantas con completa comunicación. (Media +/- EE, n= 8. No se encontraron diferencias estadísticamente significativas.

### Determinación de compuestos orgánicos volátiles

En los experimentos de estandarización del tiempo de exposición de las fibras SPME, se encontró que a tiempos prolongados de exposición (4 a 24 horas), los cromatogramas resultantes presentaban picos indefinidos y las bases de los mismos muy por encima del origen del eje de la abundancia (eje de las ordenadas al origen), véase Figura 22. En cambio, a tiempos cortos de exposición, de 2 a 3 horas, los cromatogramas resultantes presentaron picos definidos con su base a nivel del 0 del eje de las ordenadas a origen, véase Figura 23.

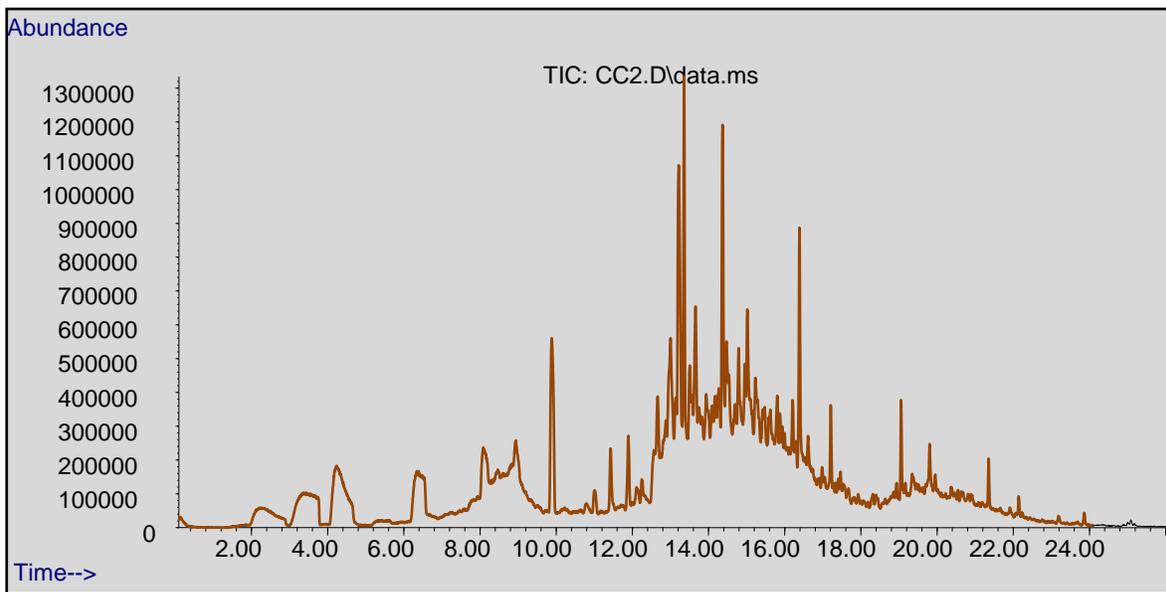


Figura 22 Cromatograma de los compuestos volátiles emitidos por las plantas de cempazúchitl con un tiempo de exposición de las fibras para microextracción en fase sólida de 12 horas.

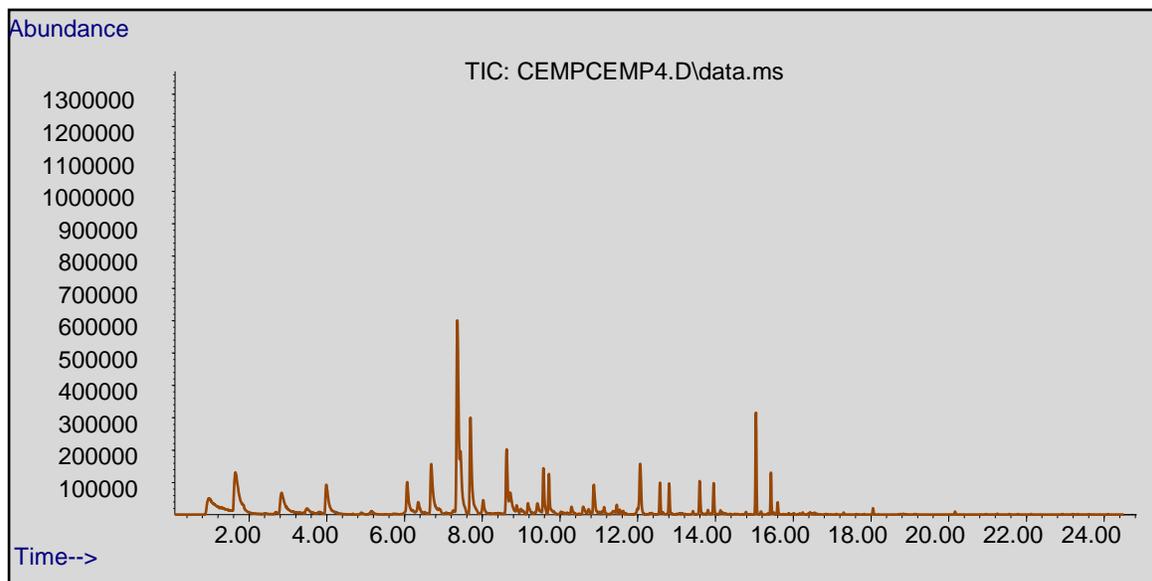


Figura 23 Cromatograma de los compuestos volátiles emitidos por plantas de cempazúchitl, con un tiempo de exposición de las fibras para microextracción en fase sólida de 2 horas.

Los perfiles de compuestos volátiles obtenidos para cada especie (frijol, albahaca y cempazúchitl) se muestran en la Tabla 2.

| Frijol ( <i>Phaseolus vulgaris</i> ) |   |     |                    | Albahaca ( <i>Ocimum basilicum</i> ) |   |     |                    | Cempazúchitl ( <i>Tagetes erecta</i> ) |  |      |                    |
|--------------------------------------|---|-----|--------------------|--------------------------------------|---|-----|--------------------|--|--|------|--------------------|
| T. de r.                             | Compuestos volátiles  | hit | Área bajo la curva | T. de r.                             | Compuestos volátiles  | hit | Área bajo la curva | T. de r.                               | Compuestos volátiles   | hit  | Área bajo la curva |
|                                      |   |     |                    | 3.555                                | Oxime-, methoxy-phenyl-   | 87  | 1,425,333.00       |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    | 6.34                                 | 2-ethenyl-1,1-dimethyl-3-methylene-cyclohexane  | 16  | 1,381,652.00       |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    | 5.362                                | $\beta$ -Pinene   | 10  | 2,989,446.00       |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    | 5.362                                | $\beta$ -Myrcene  | 9.7 | 905,542.00         |  |  |      |                    |
| 6.138                                | (Z)-3-Hexen-1-ol acetate  | 17  | 5,181,349.00       |                                      |   |     |                    | 5.702                                  | (E)-3-Hexen-1-ol, acetate  | 33.8 | 15,747,875.00      |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 6.369                                  | D-Limonene   | 19.8 | 8,627,137.00       |
|                                      |   |     |                    | 6.453                                | Eucalyptol  | 66  | 1,917,944.00       |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 6.483                                  | $\alpha$ -Pinene   | 7.97 | 5,450,807.00       |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 6.742                                  | 3,7-dimethyl-1,3,6-Octatriene (ocimeno)  | 16.1 | 8,784,502.00       |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 7.679                                  | 1-methyl-4-(1-methylethylidene)-cyclohexene  | 19.5 | 4,484,608.00       |
| 8.269                                | 2-ethenyl-1,1-dimethyl-3-methylene-cyclohexane  | 69  | 5,442,412.00       |                                      |   |     |                    |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    | 8.28                                 | 2-ethenyl-1,1-dimethyl-3-methylene-cyclohexane  | 71  | 119,383,276.0      | 8.275                                  | 2-ethenyl-1,1-dimethyl-3-methylene-cyclohexane   | 72.4 | 3,526,827.00       |
|                                      |   |     |                    | 8.4                                  | 3,7-dimethyl-1,6-Octadien-3-ol  | 67  | 1,700,260.0        |  |  |      |                    |
| 9.00                                 | Cyclohexanol, 5-methyl-2-(1-methylethyl)-, acetate, (1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,5 $\beta$ ) | 74  | 23,840,806.00      |                                      |   |     |                    |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    | 10.04                                | $\alpha$ , $\alpha$ 4-trimethyl-3-Cyclohexene-1-methanol  | 50  | 242,924.00         |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 11.19                                  | 2-Cyclohexen-1-one, 3-methyl-6-(1-methylethyl)-  | 56.4 | 3,459,451.00       |
|                                      |   |     |                    | 11.55                                | 2,6,11-trimethyl-Dodecane   |     |                    | 11.55                                  | 2,6,11-trimethyl-dodecane  | 11.8 | 7,502,248.00       |
| 10.59                                | Decanal   | 38  | 723,583.00         |                                      |   |     |                    |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 11.75                                  | 3,7-dimethyl-, 2-aminobenzoate-1,6-Octadien-3-ol   | 10.8 | 1,761,897.00       |
|                                      |   |     |                    | 11.76                                | Bornyl acetate  | 26  | 2,181,800.00       |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 12.18                                  | 2-butyl-1-Octanol  |      | 1,160,194.00       |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 12.57                                  | 2-methyl-3-(1-methylethenyl)-, acetate, (1 $\alpha$ ,2 $\alpha$ ,3 $\alpha$ )-cyclohexanol                                     | 8.8  | 5,698,920.00       |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 12.72                                  | 2,6,11-trimethyl-dodecane  | 21.4 | 5,043,613.00       |
| 12.74                                | E-9-Methyl-8-tridecen-2-ol acetate  |     | 785,079.00         |                                      |   |     |                    |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    | 12.95                                | Eugenol   | 45  | 4,198,899.00       |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 13.33                                  | 1,2,4-Metheno-1H-indene, octahydro-1,7a-dimethyl-5-(1-methylethyl)-  | 11   | 2,010,524.00       |
|                                      |   |     |                    | 13.43                                | $\alpha$ -Cubebene  | 7.3 | 105,218,689        |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 13.43                                  | Copaene  | 9.9  | 684,617.00         |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 13.57                                  | 2-ethylidene-6-methyl-3,5-Heptadienal  |      | 441,329.00         |
|                                      |   |     |                    | 13.64                                | 1-ethenyl-1-methyl-2,4-bis(1-methylethenyl)-, [1S-(1 $\alpha$ ,2 $\beta$ ,4 $\beta$ )]- cyclohexane               | 11  | 1,616,545.00       |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 14.19                                  | Caryophyllene  | 8.91 | 8,863,442.00       |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 14.28                                  | 1H-3a,7-Methanoazulene, octahydro-3,8,8-trimethyl-6-methylene  | 29.4 | 666,416.00         |
|                                      |   |     |                    | 14.37                                | trans- $\alpha$ -Bergamotene  | 13  | 9,744,676.00       |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    | 14.42                                | Azulene, 1,2,3,4,5,6,7,8-octahydro-1,4-dimethyl-7-(1-methylethenyl)-, [1S-(1 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,7 $\alpha$ )]- | 18  | 368,614.00         |  |  |      |                    |
| 14.71                                | [3.1.1]heptane, 6-methyl-2-methylene-6-(4-methyl-3-pentenyl)- Bicyclo                   |     | 133,388.00         |                                      |   |     |                    |  |  |      |                    |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 14.8                                   | 1H-Cyclopropa[naphthalene, 1a,2,3,3a,4,5,6,7b-octahydro-1,1,3a,7-tetramethyl-, [1aR-(1a $\alpha$ ,3a $\alpha$ ,7b $\alpha$ )]- |      | 2,460,494.00       |
|                                      |   |     |                    |                                      |   |     |                    | 15.13                                  | 2,6,10,15-tetramethyl-heptadecane  |      | 1,895,668.00       |

|       |                                   |  |            |              |       |  |                   |
|-------|-----------------------------------|--|------------|--------------|-------|--|-------------------|
|       |                                   |  |            |              | 15.18 | Bicyclo[3.1.1]hept-2-ene, 2,6-dimethyl-6-(4-methyl-3-pentenyl)-  | 2,236,257.00      |
|       | 15.2                              | 1,6,10-Dodecatriene, 7,11-dimethyl-3-methylene-, (Z)-  | 19         | 4,017,253.00 |       |  |                   |
|       |                                   |  |            |              | 15.21 | 2,6,10,15-tetramethylheptadecane   | 225,088.00        |
|       | 15.32                             | Naphthalene, decahydro-4a-methyl-1-methylene-7-(1-methylethenyl)-, [4aR-(4a $\alpha$ ,7 $\alpha$ ,8a $\beta$ )]-       | 6.9        | 749,570.00   |       |  |                   |
|       | 15.42                             | 3,7,7-trimethyl-11-methylene-, (-)-spiro[5.5]undec-2-ene   |            | 3,538,626.00 |       |  |                   |
|       |                                   |  |            |              | 15.65 | 2-hexyl-1-decanol  | 4.77 3,715,392.00 |
|       | 15.68                             | 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-7-methyl-4-methylene-1-(1-methylethyl)-, (1 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,8 $\alpha$ )-naphthalene | 31         | 6,057,390.00 |       |  |                   |
|       |                                   |  |            |              | 15.92 | 2,6,11-trimethyldodecane   | 5.92 6,408,252.00 |
|       |                                   |  |            |              | 15.98 | 2,6,10-trimethyltetradecane  | 491,690.00        |
|       |                                   |  |            |              | 16.07 | 2,6,11,15-tetramethylhexadecane  | 9.59 2,415,095.00 |
|       | 15.73                             | 1,2,3,5,6,8a-hexahydro-4,7-dimethyl-1-(1-methylethyl)-, (1S-cis)-naphthalene   | 29         | 3,727,860.00 |       |  |                   |
|       | 15.79                             | 4,4,11,11-tetramethyl-7-tetracyclo[6.2.1.0(3.8)0(3.9)]undecanol  |            | 4,438,910.00 |       |  |                   |
|       |                                   |  |            |              | 16.22 | 2,6,10,15-tetramethylheptadecane   | 4.9 2,988,876.00  |
|       |                                   |  |            |              | 16.25 | Naphthalene, 1,2,3,4,4a,5,6,8a-octahydro-4a,8-dimethyl-2-(1-methylethenyl)-, [2R-(2 $\alpha$ ,4 $\alpha$ ,8a $\beta$ )]- | 820,721.00        |
| 16.26 | 2,5-bis(1,1-dimethylethyl)-phenol | 23   | 343,646.00 |              |       |  |                   |
|       | 17.61                             | tau.-Cadinol   | 28         | 1,580,582.00 |       |  |                   |

Tabla 2 Perfiles de compuestos volátiles emitidos por las plantas de frijol, albahaca y cempazúchitl durante un tiempo de 3 horas de exposición de las fibras de microextracción en fase sólida.

Los compuestos representativos emitidos por las plantas de albahaca fueron el eugenol y el trans- $\alpha$ -bergamoteno. El D-limoneno, el  $\beta$ -ocimeno y el cariofileno fueron los representativos para las plantas de cempazúchitl, véase Figura 24.

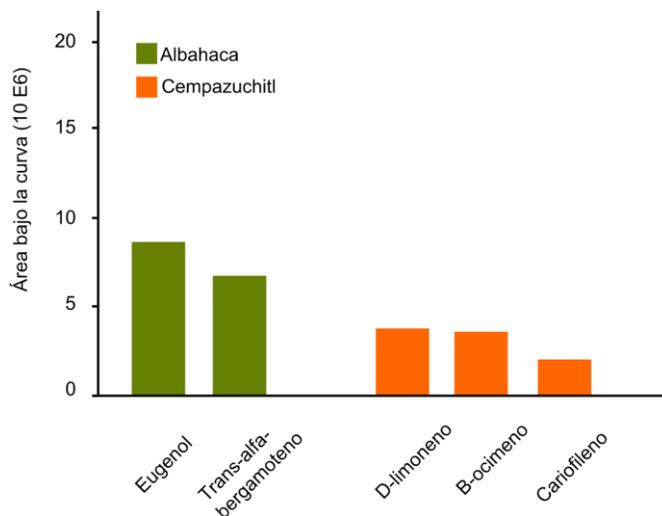


Figura 24 Compuestos volátiles representativos de la albahaca y del cempazúchitl con sus respectivas áreas bajo la curva, determinadas en los cromatogramas

## DISCUSIÓN.

### Características físico-químicas del suelo.

De acuerdo a los criterios de fertilidad de suelos, para los principales macro-elementos, la concentración de nitrógeno total de 0.09 % se considera medianamente pobre (Muñoz-Iniestra *et al.* 2008), por lo que puede repercutir negativamente en la producción del frijol, debido a que se ha demostrado que los actuales cultivares de importancia agrícola presentan bajos potenciales de fijación del elemento (Isoi y Yoshida 1991), de hecho, la adición de pequeñas cantidades de nitrógeno incrementan el número de granos y peso seco, en comparación con plantas de frijol no fertilizadas (Daba y Haile 2002).

El fósforo asimilable a una concentración de 14.18 mg/Kg también se considera bajo para el óptimo desarrollo de la mayoría de los cultivos de importancia agrícola (NOM-021-RECNAT-2000). Además, puede disminuir, aún más, la capacidad de fijar nitrógeno (De Groot *et al.* 2003; Attar *et al.* 2012).

Sin embargo, los 824 mg/Kg de potasio asimilable se catalogan en una concentración rica en potasio (Vázquez y Bautista 1993), por lo que su abundancia es adecuada para el desarrollo de las plantas, de hecho, valores bajos de este macronutriente no serían posibles con la elevada concentración de arcillas (partículas del suelo con diámetros menores a 0.002 mm) que posee el suelo y su gran capacidad de intercambiar cationes (Aguado-Lara *et al.* 2002).

La simple presencia de los nutrientes no es suficiente para catalogar la calidad de un suelo, existen otras cualidades que interfieren o coadyuvan en el desarrollo de las plantas, por ejemplo: el pH de este suelo se considera medianamente alcalino (NOM-021-RECNAT-2000), lo que podría afectar la cantidad de nutrientes mencionados, pues la mayoría presentan su mayor disponibilidad para las plantas entre un pH de 5.5 y 7 (Martin y Sauerborn 2013). Por otra parte, la cantidad de materia orgánica (1.95 %) considerada como pobre (NOM-021-RECNAT-2000) es indicadora de una baja estructura edáfica (formación de agregados), lo que impide un adecuado flujo de aire y agua (y por consiguiente de nutrientes) (Golchin *et al.* 1995; Albiach *et al.* 2001).

La clase textural arcillosa (NOM-021-RECNAT-2000) se encuentra relacionada con la retención y transporte de compuestos químicos (Bautista-Cruz *et al.* 2004), determinados por la capacidad de intercambio catiónico (cationes intercambiables adsorbidos por un suelo), que en este caso es muy elevada (NOM-021-RECNAT-2000) debido a la numerosidad de las arcillas, que por su tamaño representan una gran superficie de contacto de carga negativa en donde los cationes pueden ser atraídos, y actuar como cationes asimilables para las plantas (Blaya y García 2003).

La textura arcillosa también determina la retención y transporte de agua (Bautista-Cruz *et al.* 2004), medida, en este caso como la capacidad de campo (cantidad de agua retenida, después de un riego excesivo), la cual por ser tan elevada permite la formación de costras en la superficie del suelo, lo que acarrea una elevada tasa de erosión por escorrentía y,

además, la retención de agua o anegamiento (Navarro-Bravo *et al.* 2000) y aireación defectuosa de las raíces (Blaya y García 2003).

### Efecto en el incremento de área foliar.

La tendencia a incrementar el área foliar total de las plantas de frijol asociadas a albahaca o cempazúchitl, a expensas de las condiciones del suelo y la incidencia de patógenos, se puede interpretar como facilitación, definida como el fenómeno en el que una especie mejora la supervivencia, crecimiento o adecuación de otra (Callaway 1997). Al respecto existen diversos reportes en ecosistemas o agroecosistemas, de hecho, con anterioridad, a este efecto de facilitación enfocado a la incidencia de plagas o enfermedades, se le conocía como gremios de defensa de las plantas (Atsatt y O'Dowd 1976). Como ejemplos podemos mencionar que en las estepas de la Patagonia Argentina, la vegetación crece en parches debido a efectos de facilitación con mayor intensidad que los de competencia (Aguiar y Sala 1994), en el Valle de Hudson, Nueva York, se descubrió que existe un equilibrio entre los procesos de facilitación y competencia de las especies vegetales, dependiente de las condiciones ambientales (Bertness y Shumway 1993; Berkowitz *et al.* 1995). También se ha reportado un incremento en la altura y producción de plantas de chícharo y rábano a asociarlas a lechuga (Camacho-Coronel 2011).

Este efecto de facilitación puede ser más intenso en condiciones ambientales estresantes (Callaway *et al.* 2002). Donde se restringe la adquisición de nutrientes por condiciones físicas, los organismos no compiten puesto que esto significa recursos no asignados al crecimiento (Bertness y Shumway 1993; Greenlee y Callaway 1996; Callaway 1997). Además es muy probable que este fenómeno tenga cierta cualidad de especie-especificidad, puesto que solo ocurre bajo ciertas combinaciones de plantas (Callaway 1997).

Desafortunadamente muchos experimentos no explican el mecanismo activo de la facilitación. La literatura menciona que puede ser causada por la modificación de la luz, temperatura, agua, nutrientes, oxigenación, tipo de sustrato, protección contra herbívoros, polinización, concentración de propágulos de hongos, desarrollo de micorrizas o diversidad de microbios del suelo, sólo por mencionar algunos (Callaway 1995). Sin embargo es difícil que muchas de ellas sean capaces de presentar especie-especificidad.

Una explicación es la percepción de la radiación lumínica, ya que los individuos de *Arabidopsis* pueden percibir si sus plantas vecinas son genéticamente cercanas o no y, así llevar a cabo procesos de facilitación o competencia (Crepny y Casal 2015). Adicionalmente, son bien conocidos los efectos del sombreado en las plantas, como el incremento en la elongación de los tallos (Casal 2013), o el aumento del área foliar, reportado en plantas de *Lycopersicon esculentum* asociadas con *Tagetes erecta* (Gómez-rodríguez *et al.* 2007). Sin embargo, estos cambios morfológicos que permiten mayor adecuación en condiciones de sombreado, conducen a una reducción en la producción (Yang *et al.* 2014), lo cual es contrario a lo encontrado en este trabajo, puesto que las plantas de frijol asociadas a albahaca o cempazúchitl mostraron mayor producción de vainas que las del monocultivo.

Alternativamente es posible que estén actuando los compuestos volátiles emitidos por las plantas, pues aunque no hay reportes de tal facilitación, se sabe que algunos de ellos y

muchos otros son emitidos por diversos microorganismos y presentan efectos directos en el crecimiento de las plantas que los perciben (Kai *et al.* 2009).

Por ejemplo, los volátiles emitidos por cepas de *Bacillus subtilis* y *Bacillus amyloliquefaciens*, se han identificado como promotores del crecimiento y de la inducción de la resistencia sistémica de las plantas que los perciben (Ryu *et al.* 2003); incluso se ha encontrado que la emisión de volátiles por *Alternaria alternata* promueven fuertemente la acumulación de almidón en hojas en plantas monocotiledóneas y dicotiledóneas (Li *et al.* 2011).

El  $\beta$ -cariofileno, encontrado como uno de los compuestos volátiles representativos de *Tagetes erecta*, se ha reportado también como un compuesto emitido por *Talaromyces wortmanii* FS2, que mejora el crecimiento de plántulas de *Brassica campestris* L. var. *perviridis* y su resistencia contra *Colletotrichum higginsianum* (Yamagiwa *et al.* 2011).

### Disminución en el daño foliar

Durante el primer ciclo de cultivo (año 2013) se pudo observar una tendencia visual de la media a menor daño causado por patógenos naturales. Al evaluar el proceso de infección a nivel bioquímico encontramos una concentración mayor de ergosterol en los tratamientos de asociación, a pesar de su tendencia a menor daño natural y nulo daño causado por *Colletotrichum lindemuthianum*. Durante el segundo ciclo de cultivo (año 2014) no se observó ningún daño evidente de hojas causado por patógenos naturales o el inoculado, pero las concentraciones de ergosterol fueron mayores en el sistema de monocultivo que en el de asociación.

A pesar de que el ergosterol se ha propuesto como un buen índice para cuantificar la biomasa fúngica en raíces micorrizadas, follaje, suelo, y muestras acuáticas (Castro y Freitas 2000; Asran y Buchenauer 2003; Mohd As'wad *et al.* 2011), existen especies de hongos patógenos en las que la cantidad del metabolito se puede correlacionar con el daño y otras que no (Asran y Buchenauer 2003; Mohd As'wad *et al.* 2011). Por lo que en este caso, parece el hongo patógeno natural (posiblemente *Uromyces phaseoli*) no se puede correlacionar de manera adecuada, mientras que el patógeno inoculado (*Colletotrichum lindemuthianum*) al no presentar síntomas visibles en la planta, no se puede determinar si es o no correlacionable. Adicionalmente, cabe aclarar que la cuantificación de ergosterol indicó la biomasa del total de hongos y no de alguno en específico.

Al determinar las concentraciones de ácido salicílico, durante el primer ciclo de cultivo (año 2013) se observó una tendencia en todos los tratamientos a aumentar los niveles del metabolito, sin embargo, todas las plantas presentaban daño causado por patógenos naturales (presumiblemente *Uromyces phaseoli*) lo cual pudo interferir con los resultados, de hecho, está reportado que en plantas de frijoles susceptibles a esta enfermedad, se aumentan las concentraciones de ácido jasmónico (Cavallo y Raggi 2002) con lo cual pueden ocurrir interacciones negativas con la ruta ácido salicílico (Koornneef y Pieterse 2008).

En el segundo ciclo de cultivo (año 2014) sólo se observó una tendencia a incrementar los niveles de ácido salicílico en los tratamientos con cempazúchitl y el monocultivo de frijol; en el tratamiento con albahaca, donde se reportó menor daño, no se observó variación en la concentración del metabolito. Sin embargo, se sabe que las plantas resistentes a patógenos presentan una mayor concentración de ácido salicílico endógeno que las no resistentes (Meuwly *et al.* 1995). Por lo que es extraño que las plantas de frijol asociadas a albahaca, que presentaron menor daño causado por patógenos, no mostraran incrementos comparables a los otros tratamientos.

Esta falta de incremento en los niveles de ácido salicílico podría deberse que el tiempo de muestreo no fue suficiente para alcanzar el punto máximo de concentración de ácido salicílico. Por ejemplo, algunas especies como el trigo, la elevación de las concentraciones de ácido salicílico ocurren a los tres días de una inoculación con patógenos (Pál *et al.* 2011). Sin embargo, no es el caso para este experimento, puesto que a las 24 h. posteriores a la inoculación, los niveles de ácido salicílico disminuyen nuevamente a un estado basal. Además, está reportado que algunos glucanos de la pared celular de uredosporas en germinación, de la especie *Uromyces phaseoli*, actúan como elicitores en la respuesta defensiva de las plantas (Humme *et al.* 1981).

Esta variabilidad observada en la respuesta de los policultivos a los agentes patógenos entre ambos ciclos de cultivo no es extraña, de hecho, se ha demostrado que la respuesta y los efectos pueden ser dependientes de las condiciones ambientales, por ejemplo, las hojas en senescencia y las desprendidas de la especie *Spartina marítima* presentan mayor incidencia de hongos en los meses de invierno, que en otras épocas. (Castro y Freitas 2000). Además, parece que el efecto es dependiente de la composición del policultivo, referido a las especies interactuantes y a las condiciones ambientales (Trenbath 1993).

Independientemente de la variabilidad en la incidencia de patógenos en los sistemas de policultivo, la disminución que se ha observado se explica, de manera más común, por la dependencia, de este tipo de organismos para su dispersión, al viento o algunos insectos, puesto que presentan dificultades para encontrar hospederos adecuados en sistemas de varias especies vegetales (Trenbath 1977). En otras ocasiones, el efecto se ha atribuido modificaciones micro-ambientales, por ejemplo sombreado, que afectan el desarrollo del hospedero o del patógeno para producir una infección (Potts 1990).

Recientemente se ha observado que los compuestos volátiles son una alternativa real al control de plagas, por ejemplo, sea observado un incremento en las concentraciones de aceites esenciales con función defensiva en *Mentha piperita*, al ser expuesta a los compuestos volátiles de *Pseudomonas fluorescens*, *Bacillus subtilis*, y *Aspergillus brasiliensis* (Santoro *et al.* 2011), o más recientemente, el hallazgo de compuestos volátiles emitidos por plantas de frijol, como el limoneno, linalool, metil salicilato y metil jasmonato, que pueden reducir la tasa de germinación de conidios pertenecientes a *Colletotrichum lindemuthianum* (Quintana-Rodriguez *et al.* 2015). También se ha observado que la planta de cempazúchitl presenta un efecto alelopático debido a la liberación de compuestos aromáticos como los tiofenos (Morallo y Decena 1984).

En los sistemas donde se observa menor incidencia de plagas, se ha propuesto que es debido a una disminución en la concentración de recursos, principalmente alimenticios, causada por la mezcla de especies (Root 1973), lo cual podría conducir a una mayor

incidencia de herbívoros generalistas, en lugar de los especialistas (Risch *et al.* 1983). Sin embargo, no sólo los recursos alimenticios pueden estar actuando, existen especies como el ajo o el jitomate que a través de sus compuestos volátiles proveen de un camuflaje olfatorio a otras especies (Perrin y Phillips 1978) u otros que pueden tener un efecto repelente (Atsatt y O'Dowd 1976), lo cual reduciría la probabilidad de las plantas para ser encontradas por los herbívoros (Concepto de “apparency”) (Feeny 1970).

Adicionalmente se compararon los compuestos volátiles representativos de la albahaca y el cempazúchitl con la literatura. Se encontró que cada compuesto puede presentar diversos efectos fisiológicos o ecológicos, por ejemplo, de los compuestos emitidos por las plantas de albahaca, el eugenol es un compuesto fenólico, usado comúnmente como agente saborizante o de fragancia, presente en el aceite de clavo, canela, albahaca y nuez moscada (Wang *et al.* 2010). Tiene un amplio potencial como compuesto anestésico, antioxidante (Ou *et al.* 2006), antifúngico contra *Saccharomyces cerevisiae* (Darvishi *et al.* 2013) y contra hongos saprófitos de madera, inhibe el crecimiento de *E. coli*, *Listeria monocytogenes* y *Lactobasillus sakei* (Wang *et al.* 2010), también actúa contra el desarrollo de *Candida* spp, donde se menciona que interfiere con las fases iniciales de la formación del biofilm de estos organismos (De Paula *et al.* 2014). Se ha propuesto que este compuesto actúa acumulándose en la membrana plasmática de los microorganismos, alterando la unión de los lípidos y por lo tanto la permeabilidad, lo que conduce a la desestabilización y posterior ruptura de la membrana (Wang *et al.* 2010).

El (E)- $\alpha$ -bergamoteno se encuentra presente en mezclas de volátiles capaces de atraer parasitoides o predadores, por ejemplo, el parasitoides *Cotesia marginiventris* es atraído hacia herbívoros lepidópteros (Schnee *et al.* 2006), la mortalidad de huevos de *Manduca sexta* aumenta por una mayor incidencia de depredadores generalistas, en plantas de *Nicotiana attenuata* tratadas con una mezcla sintética de (Z)-3-hexenol, linalool, y cis- $\alpha$ -bergamoteno (Kessler y Baldwin 2001). Una mezcla compleja de diversos volátiles que incluyen el  $\alpha$ -trans-bergamoteno, también es capaz de atraer a las hembras de la avispa *Cotesia marginiventris* que ovipositan en el interior de larvas herbívoras de *Spodoptera exigua* (Tumlinson *et al.* 1993).

En el caso del cempazúchitl, se encontró que el limoneno es un componente principal de muchos aceites esenciales, principalmente de cítricos, que presenta propiedades antifúngicas bacteriostáticas y bacteriosidas (Espina *et al.* 2013). Sin embargo, elevadas concentraciones de limoneno pueden causar la atracción de plagas y patógenos, lo que podría acarrear efectos adversos en la salud de las plantas (Rodríguez *et al.* 2011). Se considera que este compuesto, al igual que el eugenol, se acumula en la membrana plasmática de los microorganismos y causa su desintegración y pérdida de la fuerza motriz (Espina *et al.* 2013).

El (E)- $\beta$ -ocimeno, monoterpeneo acíclico, de los principales compuestos volátiles liberados por las plantas en respuesta a daño por herbivoría, puede atraer predadores naturales de ácaros y funcionar como señal al sobre regular las vías del ácido jasmónico y del salicílico en plantas no infestadas de frijol lima y el aumento de algunos genes de defensa/estrés en *Arabidopsis* (Arimura *et al.* 2004; Muroi *et al.* 2011).

El (E)- $\beta$ -cariofileno, sesquiterpeno emitido por muchas plantas después de daño por herbívoros, puede ser una importante señal de atracción de plagas del maíz (Köllner *et al.* 2008), o como atractor de nematodos entomopatógenos en maíz (Rasmann *et al.* 2005).

## CONCLUSIONES.

- Las condiciones edáficas no eran óptimas para el desarrollo del frijol, principalmente por la textura que impedía un buen drenaje de agua y asimilación de nutrientes.
- Se presenta una variabilidad en la incidencia de plagas y patógenos, causada por las condiciones ambientales.
- Al asociar plantas de frijol con albahaca o cempazúchitl se presenta una promoción de la tasa de germinación y crecimiento del frijol, además una mayor producción bajo condiciones de campo y menor daño por fitopatógenos.
- Se presenta una disminución en la tasa germinativa de conidios pertenecientes a *Colletotrichum lindemuthianum*, al exponerlos a ambientes con plantas de albahaca o de cempazúchitl
- Se ha reportado en la literatura que compuestos como el eugenol, trans- $\alpha$ -bergamoteno, producidos por las plantas de albahaca; D-limoneno,  $\beta$ -ocimeno y cariofileno, producidos por plantas de cempazúchitl, son capaces de interferir negativamente en el desarrollo de diferentes microorganismos.

## LITERATURA

- Acuña, R. J. (1988). **Guía para la producción de hortalizas de hoja para la industria. Perejil (*Petroselinum hortense Hoffm*) y cilantro (*Coriandrum sativum L*)**. Colombia.
- Adigüzel, A., M. Güllüce, H. Ögütçü, F. Sahin y I. Karaman (2005). "**Antimicrobial Effects of *Ocimum basilicum* ( Labiatae ) Extract.**" *Turk J Biol* **29**: 155-160.
- Agelopoulos, N. G. y J. A. Pickett (1998). "**Headspace analysis in chemical ecology: effects of different sampling methods on ratios of volatile compounds present in headspace samples**" *J. Chem. Ecol.* **24**: 1161-1172.
- Aguado-Lara, G., J. D. Etchevers-Barra, C. Hidalgo-Moreno, A. Galvis-Spínola y A. Aguirre-Gómez (2002). "**Dinámica del potasio en suelos agrícolas.**" *Agrociencia* **36**: 11-21.

- Aguiar, M. R. y O. E. Sala (1994). "**Competition, facilitation, seed distribution and the origin of patches in a Patagonian steppe.**" *Oikos* **70**: 26-34.
- Albiach, R., R. Canet, F. Pomares y F. Ingelmo (2001). "**Organic matter components and aggregate stability after the application of different amendments to a horticultural soil.**" *Bioresource Technology* **76**(2): 125-129.
- Altieri, M. (1999). "**The ecological role of biodiversity in agroecosystems.**" *Agriculture Ecosystems and Environment* **74**: 19-31.
- Altieri, M. y C. Nicholls (2004). "**Una base agroecológica para el diseño de sistemas diversificados de cultivo en el Trópico.**" *Manejo Integrado de Plagas y Agroecología* **73**: 8-20.
- Altieri, M. y C. I. Nicholls (2000). *Agroecología. Teoría y práctica para una agricultura sustentable.* México, Programa de las naciones unidas para el medio ambiente (PNUMA), Red de Formación Ambiental para América Latina y el Caribe.: 257.
- Arimura, G.-i., R. Ozawa, S. Kugimiya, J. Takabayashi y J. Bohlmann (2004). "**Herbivore-Induced Defense Response in a Model Legume. Two-Spotted Spider Mites Induce Emission of (E)- $\beta$ -Ocimene and Transcript Accumulation of (E)- $\beta$ -Ocimene Synthase in Lotus japonicus.**" *Plant physiology* **135**(4): 1976-1983.
- Armstrong, W. (1964). "**Oxygen Diffusion from the Roots of Some British Bog Plants.**" *Nature* **204**(4960): 801-802.
- Arthur, C. L. y J. Pawliszyn (1990). "**Solid phase microextraction with thermal desorption using fused silica optical fibers.**" *Analytical Chemistry* **62**(19): 2145-2148.
- Asran, M. R. y H. Buchenauer (2003). "**Pathogenicity of Fusarium graminearum isolates on maize (Zea mays L.) cultivars and relation with deoxynivalenol and ergosterol contents.**" *Journal of Plant Diseases and Protection* **110**(3): 209-219.
- Atsatt, P. R. y D. J. O'Dowd (1976). "**Plant Defense Guilds Many plants are functionally interdependent with respect to their herbivores.**" *Science* **193**(4247): 24-29.
- Attar, H. A., D. Blavet, E. M. Selim, M. T. Abdelhamid y J. J. Drevon (2012). "**Relationship between phosphorus status and nitrogen fixation by common beans (Phaseolus vulgaris L.) under drip irrigation.**" *International Journal of Environmental Science and Technology* **9**(1): 1-13.
- Bais, H. P., S.-W. Park, T. L. Weir, R. M. Callaway y J. M. Vivanco (2004). "**How plants communicate using the underground information superhighway.**" *Trends in plant science* **9**(1): 26-32.
- Baldwin, I. T. y J. C. Schultz (1983). "**Rapid changes in tree leaf chemistry induced by damage: evidence for communication between plants.**" *Science* **221**: 277-279.
- Bautista-Cruz, A., J. Etchevers-Barra, R. F. del-Castillo y C. Gutiérrez (2004). "**La calidad del suelo y sus indicadores.**" *Ecosistemas* **13**(2): 90-97.
- Belcher, J. W., P. A. Keddy y L. Twolan-Strutt (1995). "**Root and shoot competition intensity along a soil depth gradient.**" *Journal of Ecology* **83**: 673-682.
- Berkowitz, A. R., C. D. Canham y V. R. Kelly (1995). "**Competition vs Facilitation of tree seedling growth and survival in early successional communities.**" *Ecology* **76**(4): 1156-1168.
- Bertness, M. D. y S. W. Shumway (1993). "**Competition and facilitation in marsh plants.**" *The American Naturalist* **142**(4): 718-724.
- Bhardwaj, C. y L. Hanley (2014). "**Ion sources for mass spectrometric identification and imaging of molecular species.**" *Nat. Prod. Rep* **31**: 756-767.
- Birkett, M., C. Campbell, K. Chamberlain, E. Guerrieri, A. Hick, J. Martin, M. Matthes, J. Napier, J. Pettersson, J. Pickett y e. al. (2000). "**New roles for cis-jasmone as an insect semiochemical and in plant defense.**" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **97**: 9329-9334.
- Blake, M. (2006). Dating the Initial Spread of Zea mays. *Histories of Maize. Multidisciplinary Approaches to the Prehistory, Linguistics, Biogeography, Domestication, and Evolution of Maize.* J. E. Staller, R. H. Tykot and B. F. Benz, Elsevier, Academic Press: 55-72.

- Blaya, S. N. y G. N. García (2003). Química agrícola. El suelo y los elementos químicos esenciales para la vida vegetal. España, Mundi-Prensa: 438.
- Bonser, S. P. y R. J. Reader (1995). "**Plant competition and herbivory in relation to vegetation biomass.**" *Ecology* **76**: 2176-2183.
- Briseño-Ruiz, S. E., M. AguilarGarcía y J. A. Villegas-Espinoza (2013). **El cultivo de la albahaca**. La Paz, Baja California Sur, México, Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste S. C.
- Bruin, J., M. Dicke y M. W. Sabelis (1992). "**Plants are better protected against spider-mites after exposure to volatiles from infested conspecifics.**" *Experientia* **48**(5): 525-529.
- Callaway, R. (2007). **Direct Mechanisms for Facilitation**. Positive Interactions and Interdependence in Plant Communities, Springer Netherlands: 15-116.
- Callaway, R. M. (1995). "**Positive Interactions among Plants.**" *The Botanical Review* **61**(4): 306.
- Callaway, R. M. (1997). "**Positive interactions in plant communities and the individualistic-continuum concept.**" *Oecologia* **112**(2): 143-149.
- Callaway, R. M. (1998). "**Are positive interactions among plants species-specific?**" *Oikos* **82**: 202-207.
- Callaway, R. M., R. W. Brooker, P. Choler, Z. Kikvidze, F. I. Pugnaire, B. Newingham y E. T. Aschehoug (2002). "**Positive interactions among alpine plants increase with stress.**" *417*(June): 844-848.
- Callaway, R. M. y F. I. Pugnaire (2007). Facilitation in Plant Communities. Functional Plant Ecology. F. I. Pugnaire and F. Valladares. USA, CRC Press: 435-455.
- Camacho-Coronel, X. (2011). **Cultivo biointensivo de hortalizas en un suelo de tepetate en San Miguel Hila, Municipio de Nicolás Romero, Edo. De México**. Licenciatura, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Campa, A., R. Giraldez y J. Ferreira (2009). "**Genetic dissection of the resistance to nine anthracnose races in the common bean differential cultivars MDRK and TU.**" *Theoretical and Applied Genetics* **119**: 1-11.
- Casal, J. J. (2013). "**Photoreceptor signaling networks in plant responses to shade.**" *Annu. Rev. Plant Biol.* **64**: 403-427.
- Castro, P. y H. Freitas (2000). "**Fungal biomass and decomposition in Spartina maritima leaves in the Mondego salt marsh (Portugal).**" *Hydrobiologia* **428**(1): 171-177.
- Cavallo, V. y V. Raggi (2002). "**Jasmonic acid acumulation in bean hypersensitively resistant to Uromyces phaseoli.**" *Journal of plant pathology* **84**(2): 77-82.
- Comerford, N. B. (2004). Soil Factors Affecting Nutrient Bioavailability. Nutrient acquisition by plants H. BassiriRad. **181**: 1-14.
- Córdova-Campos, O. (2011). **Inducción de defensa directa e indirecta en plantas de frijol (Phaseolus vulgaris L. y Phaseolus coccineus L.) y su relación con la domesticación**. Maestría, Centro de Investigación y de Estudios Avanzados del Instituto Politécnico Nacional (CINVESTAV-IPN).
- Córdova-Campos, O., R. Adame-Álvarez, J. Acosta-Gallegos y M. Heil (2012). "**Domestication affected the basal and induced disease resistance in common bean (Phaseolus vulgaris).**" *European Journal of Plant Pathology* **134**(2): 367-379.
- Crepy, M. A. y J. J. Casal (2015). "**Photoreceptor-mediated kin recognition in plants.**" *New Phytologist* **205**: 329.
- Daba, S. y M. Haile (2002). "**Effects of rhizobial inoculant and nitrogen fertilizer on yield and nodulation of common bean under intercropped conditions.**" *Journal of Plant Nutrition* **25**(7): 1443-1455.

- Darughe, F., M. Barzegar y M. Sahari (2012). "**Antioxidant and antifungal activity of Coriander (*Coriandrum sativum* L.) essential oil in cake.**" *International Food Research Journal* **19**(3): 1253-1260.
- Darvishi, E., M. Omid, A. A. Bushehri, A. Golshani y S. M. L (2013). "**Thymol antifungal mode of action involves telomerase inhibition.**" *Med Mycol* **51**(8): 826-834.
- De Groot, C. C., L. F. M. Marcelis, R. van den Boogaard, W. Kaiser y H. Lambers (2003). "**Interaction of nitrogen and phosphorus nutrition in determining growth.**" *Plant and Soil* **248**(1-2): 257-268.
- De Paula, S. B., T. F. Bartelli, V. D. Raimo, J. P. Santos, A. T. Morey, M. A. Bosini, C. V. Nakamura, L. M. Yamauchi y S. F. Yamada-Ogatta (2014). "**Effect of Eugenol on Cell Surface Hydrophobicity, Adhesion, and Biofilm of *Candida tropicalis* and *Candida dubliniensis* Isolated from Oral Cavity of HIV-Infected Patients.**" *Hindawi* **2014**: 1-8.
- Dewulf, J., H. Van-Langenhove y G. Wittman (2002). "**Analysis of volatile organic compounds using gas chromatography**" *Trends Anal. Chem.* **21**: 637-646.
- Dicke, M., M. W. Sabelis, J. Takabayashi, J. Bruin y M. A. Posthumus (1990). "**Plant strategies of manipulating predator-prey interactions through allelochemicals: prospects for application in pest control.**" *J. Chem. Ecol.* **11**: 3091-3115.
- Dickschat, J. S. (2014). "**Capturing volatile natural products by mass spectrometry.**" *Nat. Prod. Rep* **31**: 838-861.
- Diels, J., K. Aihou, E. N. O. Iwuofor, R. Merckx, O. Lyasse, N. Sanginga, B. Vanlauwe y J. Deckers (2002). "**Options for soil organic carbon maintenance under intensive cropping in the West-African savanna.**" *Integrated Nutrient Management in Sub-Saharan Africa: from Concept to Practice.* B. Vanlauwe, J. Diels, N. Sanginga and R. Merckx. Wallingford, UK, CAB International: 299-312.
- Dolch, R. y T. Tschardt (2000). "**Defoliation of alders (*Alnus glutinosa*) affects herbivory by leaf beetles on undamaged neighbours.**" *Oecologia* **125**: 504-511.
- Donath, J. y W. Boland (1995). "**Biosynthesis of acyclic homoterpenes: enzyme selectivity and absolute configuration of the nerolidol precursor**" *Phytochemistry* **39**(4): 785-790.
- Dudareva, N. y F. Negre (2005). "**Practical applications of research into the regulation of plant volatile emission.**" *Current opinion in plant biology* **8**(1): 113-118.
- Dudareva, N., E. Pichersky y J. Gershenzon (2004). "**Biochemistry of plant volatiles.**" *Plant. Physiol.* **135**: 1893-1902.
- Engelberth, J., H. T. Alborn, E. A. Schmelz y J. H. Tumlinson (2004). "**Airborne signals prime plants against insect herbivore attack.**" **101**(6): 1781-1785.
- Escalante, E. y S. J. Kohashi (1993). *El rendimiento y crecimiento del frijol. Manual para toma de datos.* C. d. Posgraduados. México, Colegio de Posgraduados.
- Espina, L., T. K. Gelaw, S. de Lamo-Castellví, R. Pagán y D. García-Gonzalo (2013). "**Mechanism of Bacterial Inactivation by (+)-Limonene and Its Potential Use in Food Preservation Combined Processes.**" *PLoS One* **8**(2): e56769.
- Farmer, E. E. y C. A. Ryan (1990). "**Interplant communication: airborne methyl jasmonate induces synthesis of proteinase inhibitors in plant leaves.**" *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A* **87**: 7713-7716.
- Feeny, P. (1970). "**Seasonal changes in oak leaf tannins and nutrients as a cause of spring feeding by winter moth caterpillars.**" *Ecology* **51**: 565-581.
- Fitter, A. y R. Hay (2002). *Environmental physiology of plants*, ACADEMIC PRESS.
- Flamini, G., P. L. Cioni y I. Morelli (2003). "**Use of solid-phase microextraction as a sampling technique in the determination of volatiles emitted by flower parts and pollen.**" *J. Chromatogr. A.* **998**: 229-233.

- Francis, C. A. (1990). **Potential of multiple cropping systems**. Agroecology and Small Farm Development. M. A. Altieri and H. S.B. Boca Raton, Florida, CRC Press: 137-150.
- Girón-Calva, P. S., J. Molina-Torres y M. Heil (2012). "**Volatile Dose and Exposure Time Impact Perception in Neighboring Plants**." J Chem Ecol **38**: 226–228.
- Gliessman, S. R. (1998). Agroecology. Ecological processes in sustainable agriculture E. Engles. EUA, Sleeping Bear Press.
- Gliessman, S. R. (2001). **Agroecosystem sustainability: developing practical strategies**. USA, CRC Press.
- Godard, K., R. White y J. Bohlmann (2008). "**Monoterpene-induced molecular responses in Arabidopsis thaliana**." Phytochemistry **69**: 1838–1849.
- Golchin, A., O. Clarke, J. M. Oades y J. O. Skjemstad (1995). "**The effects of cultivation on the composition of organic matter and structural stability of soils**." Austr. J. Soil Res. **33**: 975-993.
- Goldberg, D. E. y K. Landa (1991). "**Competitive effect and response: hierarchies and correlated traits in the early stages of competition**." Journal of Ecology **79**(1013-1030).
- Gómez-Rodríguez, O. y E. Zavaleta-Mejía (2001). "**La asociación de cultivos una estrategia más para el manejo de enfermedades, en particular con Tagetes spp.**" Revista Mexicana de Fitopatología **19**(1): 94-99.
- Gómez-rodríguez, O., E. Zavaleta-mejía, V. A. González-hernández, M. Livera-muñoz y E. Cárdenas-soriano (2007). "**Physiological and morphological adaptations in tomato intercropped with tagetes erecta and amaranthus hypochondriacus**" Revista Fitotecnia Mexicana **30**(4): 421-428.
- Greenlee, J. T. y R. M. Callaway (1996). "**Abiotic stress and the relative importance of interference and facilitation in montane bunchgrass communities in western montana**." The American Naturalist **148**(2): 386-396.
- Gregorich, E. G., M. R. Carter, D. A. Angers, C. M. Monreal y B. H. Ellert (1994). "**Towards a minimum data set to assess soil organic matter quality in agricultural soils**." Canadian Journal of Soil Science **74**: 367-377.
- Grimaldi, M., G. Schroth, W. G. Teixeira y B. Huwe (2003). **Soil structure**. Trees, crops and soil fertility G. Schroth and F. L. Sinclair. Wallingford, UK, CABI publishing: 191-208.
- Haase, P., F. I. Pugnaire, S. C. Clark y L. D. Incoll (1996). "**Spatial patterns in a two-tiered semi-arid shrubland in southeastern Spain**." Journal of Vegetation Science **7**: 527-534.
- Harper, M. (2000). "**Sorbent trapping of volatile organic compounds from air**." J. Chromatogr. A. (885): 129-151.
- Hassanali, A., H. Herren, Z. R. Khan, J. A. Pickett y C. M. Woodcock (2008). "**Integrated pest management: the push–pull approach for controlling insect pests and weeds of cereals, and its potential for other agricultural systems including animal husbandry**." Phil. Trans. R. Soc. B **363**: 611-621.
- Heil, M. y R. M. Adame-Álvarez (2010). "**Short signalling distances make plant communication a soliloquy**." Biology letters **6**(6): 843-845.
- Heil, M. y R. Karban (2010). "**Explaining evolution of plant communication by airborne signals**." Trends in Ecology and Evolution **25**(3): 137-144.
- Heil, M. y J. C. Silva Bueno (2007). "**Within-plant signaling by volatiles leads to induction and priming of an indirect plant defense in nature**." Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America **104**(13): 5467-5472.
- Heil, M. y D. R. Walters (2009). Ecological Consequences of Plant Defence Signalling. Plant Innate immunity. L. C. V. LOON. Burlington, Academic Press. **51**: 667-716.

- Hencken, H. (1992). "**Chemical and physiological behavior of feed carotenoids and their effects on pigmentation.**" Poultry Sciences **71**: 711-717.
- Heyden, D. (2002). "**Jardines botánicos prehispánicos.**" Revista Arqueología Mexicana **10**(57): 8-29.
- Humme, Hoppe y Heitefuss (1981). "**Glucans from cell walls of uredospore germ tubes of the bean rust fungus (*Uromyces phaseoli*) as a elicitors of phytoalexin accumulation in *Phaseolus vulgaris*.**"
- Hutley, L. B., D. Doley, D. J. Yates y A. Boonsaner (1997). "**Water Balance of an Australian Subtropical Rainforest at Altitude: the Ecological and Physiological Significance of Intercepted Cloud and Fog.**" Australian Journal of Botany **45**(2): 311-329.
- INEGI (2009). Irapuato, Guanajuato, Clave geoestadística 11017. I. N. d. G. y. e. (INEGI). México, INEGI: 1-9.
- Isoi, T. y S. Yoshida (1991). "**Low nitrogen fixation of common bean (*Phaseolus vulgaris* L.)**" Soil Sci. **37**: 559-563.
- Kai, M., M. Hausteine, F. Molina, A. Petri, B. Scholz y B. Piechulla (2009). "**Bacterial volatiles and their action potential.**" Appl. Microbiol. Biotechnol. **81**: 1001-1012.
- Kaitaniemi, P., J. Riihimäki, J. Koricheva y H. Vehviläinen (2007). "**Experimental Evidence for Associational Resistance against the European Pine Sawfly in Mixed Tree Stands.**" Silva Fennica **41**(2): 269-268.
- Karban, R., J. Maron, G. W. Felton, G. Ervin y H. Eichenseer (2003). "**Herbivore damage to sagebrush induces resistance in wild tobacco: evidence for eavesdropping between plants.**" Oikos **100**: 325-332.
- Kessler, A. y I. T. Baldwin (2001). "**Defensive Function of Herbivore-Induced Plant Volatile Emissions in Nature.**" Science **291**(5511): 2141-2144.
- Köllner, T. G., M. Held, C. Lenk, I. Hiltbold, T. C. J. Turlings, J. Gershenzon y J. Degenhardt (2008). "**A Maize (*E*)- $\beta$ -Caryophyllene Synthase Implicated in Indirect Defense Responses against Herbivores Is Not Expressed in Most American Maize Varieties.**" The Plant cell **20**(2): 482-494.
- Konrad, M. y J. Sauerborn (2013). Agroecology. M. Konrad and J. Sauerborn, Springer 338.
- Koornneef, A. y C. M. J. Pieterse (2008). "**Cross talk in defense signaling.**" Plant Physiology **146**: 839-844.
- Kost, C. y M. Heil (2006). "**Herbivore-induced plant volatiles induce an indirect defence in neighbouring plants.**" 619-628.
- Lambers, H., F. S. I. Chapin y T. L. Pons (2008). Plant Physiological Ecology, Springer: 623.
- Lee, K.-S., G.-H. Kim, H.-H. Kim, Y.-I. Chang y G.-H. Lee (2012). "**Volatile compounds of *Panax ginseng* C.A. Meyer cultured with different cultivation methods.**" Journal of food science **77**(7): C805-810.
- Lépiz-Ildefonso, R., J. J. López-Alcocer, J. J. Sánchez-González, F. Santacruz-Ruvalcaba, R. Nuño-Romero y E. Rodríguez-Guzmán (2010). "**Características morfológicas de formas cultivadas silvestres e intermedias de frijol común de hábito trepador.**" Revista Fitotecnia Mexicana **33**(1): 21-28.
- Li, J., I. Ezquer, A. Bahaji, M. Montero, M. Ovecka, E. Baroja-Fernández, F. J. Muñoz, Á. Mérida, G. Almagro, M. Hidalgo, M. T. Sesma y J. Pozueta-Romero (2011). "**Microbial Volatile-Induced Accumulation of Exceptionally High Levels of Starch in *Arabidopsis* Leaves Is a Process Involving NTRC and Starch Synthase Classes III and IV.**" Mol Plant Microbe Interact **24**(10): 165-178.
- Linares, E., B. Flores y R. Bye (1996). **Selección de plantas medicinales de México.** México, Editorial Limusa.

- Malamy, J., J. Hennig y D. F. Klessig (1992). "**Temperature-dependent Induction of salicylic acid and its conjugates during the resistance response to tobacco mosaic virus infection.**" *The Plant cell* **4**: 359-366.
- Malézieux, E., Y. Crozat, C. Dupraz, M. Laurans, D. Makowski, H. Ozier-Lafontaine, B. Rapidel, S. de Tourdonnet y M. Valantin-Morison (2009). **Mixing Plant Species in Cropping Systems: Concepts, Tools and Models: A Review.** Sustainable Agriculture. E. Lichtfouse, M. Navarrete, P. Debaeke, S. Véronique and C. Alberola, Springer Netherlands: 329-353.
- Martin, K. y J. Sauerborn (2013). *Agroecology.* K. Martin and J. Sauerborn, Springer: 338.
- Mendgen, K. y M. Hahn (2002). "**Plant infection and the establishment of fungal biotrophy.**" *TRENDS in Plant Science* **7**: 1-5.
- Meuwly, P., W. Molders, A. Buchala y J.-P. MCTraux (1995). "**Local and Systemic Biosynthesis of Salicylic Acid in Infected Cucumber Plants.**" *Plant Physiol* **109**: 1107-1101 1114.
- Mohd As'wad, a. W., M. Sariah, R. R. M. Paterson, M. a. Zainal Abidin y N. Lima (2011). "**Ergosterol analyses of oil palm seedlings and plants infected with Ganoderma.**" *Crop Protection* **30**(11): 1438-1442.
- Morales, J. P. (1995). Cultivo de cilantro, cilantro ancho y perejil *Cultivos*. I. F. Fundación de Desarrollo Agropecuario. República dominicana, Fundación de Desarrollo Agropecuario, INC (FDA): 30.
- Morallo, R. B. y A. Decena (1984). "**The activity, isolation and purification of the insecticidal principles from Tagetes.**" *Biol. Abstr.* **7**: 81-87.
- Mori, K. (2010). **Pheromones in chemical communication.** The chemistry and Biology of volatiles. A. Hermann. Great Britain, WILEY: 402.
- Mundt, C. C. (2002). "**Use of multiline cultivars and cultivar mixures for disease management.**" *Annual Review of Phytopathology* **40**: 381-410.
- Muñoz-Iniestra, D. J., A. Mendoza-Cantú, F. López-Galindo, A. Soler-Aburto y M. M. Hernández-Moreno (2008). **Edafología, Manual de métodos de análisis de suelos.** México, Universidad Nacional Autónoma de México.
- Muroi, A., A. Ramadan, M. Nishihara, M. Yamamoto, R. Ozawa, J. Takabayashi y G.-i. Arimura (2011). "**The Composite Effect of Transgenic Plant Volatiles for Acquired Immunity to Herbivory Caused by Inter-Plant Communications.**" *PLoS One* **6**(10): e24594.
- Navarro-Bravo, A., B. Figueroa-Sandoval, V. M. Ordaz-Chaparro y F. V. González-Cossio (2000). "**Efecto de la labranza sobre la estructura del suelo, la germinación y el desarrollo del maíz y frijol.**" *Terra Latinoamericana* **18**(1): 61-69.
- Neher, R. T. (1966). **Monography of the Genus Tagetes (compositae).** Ph.. D., Indiana University. NOM-021-RECNAT-2000 Norma oficial Mexicana NOM-021-SEMARNAT-2000, que establece las especificaciones de fertilidad, sanidad, salinidad y clasificación de los suelos, estudio, muestreo y análisis. S. d. M. A. y. R. Naturales. México, Diario Oficial: 85.
- Olabiyyi, T. I. y E. E. A. Oyedunmade (2007). "**Marigold ( Tagetes erecta L .) as interplant with cowpea for the control of nematode pests.**" **8**(1978): 1075-1078.
- Orians, C. M. y C. Björkman (2009). "**Associational resistance to a tropical leaf-miner: does neighbour identity matter?**" *Journal of Tropical Ecology* **25**(05): 551-551.
- Ou, H. C., F. P. Chou, T. M. Lin, C. H. Yang y W. H. Sheu (2006). "**Protective effects of eugenol against oxidized LDL-induced cytotoxicity and adhesion molecule expression in endothelial cells.**" *Food Chem Toxicol.* **44**(9): 1485-1495.
- Ovington, J. D. (1955). "**Studies of the Development of Woodland Conditions Under Different Trees: III. The Ground Flora.**" *Journal of Ecology* **43**(1): 1-21.

- Pál, M., V. Kovács, G. Vida, G. Szalai y T. Janda (2011). "**Changes in salicylic acid and polyamine contents following powdery mildew infection of near-isogenic Thatcher-based wheat lines carrying different Lr genes.**" *Acta Biologica Szegediensis* **55**(1): 139-141.
- Pastor-Corrales, M. A. (1991). "**Estandarización de cultivares diferenciales y designación de razas de *Colletotrichum lindemuthianum***" *Phytopathology* **81**: 694.
- Pastor-Corrales, M. A. y J. C. Tu (1989). **Anthracnose in Bean Production Problems in the Tropics.** Cali, Colombia, CIAT.
- Peñuelas, J. y N. Dudareva (2001). "**The complexity of factors driving volatile organics compound emissions by plants.**" *Biol. plantarum* **44**: 481-487.
- Peñuelas, J. y J. Llusià (2003). "**BVOCs: Plant defence against climate warming?**" *trends Plant. Sci.* **8**: 105-108.
- Pérez-Gutiérrez, M. R. y R. Lule-Pérez (2004). "**Raphanus sativus ( Radish ): Their Chemistry and Biology.**" *TheScientificWorldJOURNAL* **4**(16): 811-837.
- Perrin, R. M. y M. L. Phillips (1978). "**Some effects of mixed cropping on the population dynamics of insect pests.**" *Entomol. Exp. Appl.* **24**: 585-593.
- Piccaglia, R., M. Marotti y S. Grandi (1998). "**Lutein and lutein ester content in different types of *Tagetes patula* and *T. erecta*.**" *Industrial Crops and Products* **8**: 45-51.
- Pichersky, E. (2004). "**Plant scents.**" *Am. Sci.* **92**: 514-521.
- Potts, M. J. (1990). "**Influence of intercropping in warm climates on pests and diseases of potato with special reference to their control.**" *Field Crops Res.* **25**: 133-144.
- Quintana-Rodríguez, E., A. T. Morales-Vargas, J. Molina-Torres, R. M. Ádame-Alvarez, J. A. Acosta-Gallegos y M. Heil (2015). "**Plant volatiles cause direct, induced and associational resistance in common bean to the fungal pathogen *Colletotrichum lindemuthianum*.**" *Journal of Ecology* **103**(1): 250-260.
- Rasmann, S., T. G. Kollner, J. Degenhardt, I. Hiltbold, S. Toepfer, U. Kuhlmann, J. J. Gershenzon y T. C. J. Turlings (2005). "**Recruitment of entomopathogenic nematodes by insect-damaged maize roots.**" *Nature* **434**: 732-737.
- Reynolds, H. L. y T. K. Rajaniemi (2007). *Plant Interactions: Competition. Functional Plant Ecology.* F. I. Pugnaire and F. Valladares. USA, CRC Press: 457-480.
- Richards, J. H. y M. M. Caldwell (1987). "**Hydraulic lift: Substantial nocturnal water transport between soil layers by *Artemisia tridentata* roots.**" *Oecologia* **73**(4): 486-489.
- Risch, S. J., D. Andow y M. A. Altieri (1983). "**Agroecosystem diversity and pest control: data, tentative conclusions, and new research directions.**" *Environ. Entomol.* **12**(3): 625-629.
- Rodríguez-guerra, R., J. A. Acosta-Gallegos, M. M. González-Chavira y J. Simpson (2006). "**Patotipos de *Colletotrichum lindemuthianum* y su implicación en la generación de cultivares resistentes de frijol.**" *Agricultura Técnica en México* **32**(1): 101-114.
- Rodríguez, A., V. S. Andrés, M. Cervera, A. Redondo, B. Alquézar, T. Shimada, J. Gadea, M. Rodrigo, L. Zacarías, L. Palou, M. M. López, P. Castañera y L. Peña (2011). "**The monoterpene limonene in orange peels attracts pests and microorganisms.**" *Plant signaling & behavior* **6**(11): 1820-1823.
- Rojas, R. T. (1983). **Cultivo del rábano.** México, Universidad Autónoma de Chapingo.
- Root, R. B. (1973). "**Organization of a plant-arthropod association in simple and diverse habitats: the fauna of collards (*Brassica oleracea* ).**" *Ecol. Monogr.* **43**: 94-125.
- Ryu, C. M., M. A. Farag, C. H. Hu, M. S. Reddy, H. X. Wei, P. W. Pare y J. W. Kloepper (2003). "**Bacterial volatiles promote growth in *Arabidopsis*.**" *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**: 4927-4932.
- Sánchez-Ocampo, P. M. (2008). **Efecto de la época de trasplante sobre la acumulación de luteína en las inflorescencias de cempaxuchil.** Maestría, Instituto Politécnico Nacional (IPN).

- Santoro, M. V., J. Zygodlo, W. Giordano y E. Banchio (2011). "**Volatile organic compounds from rhizobacteria increase biosynthesis of essential oils and growth parameters in peppermint (*Mentha piperita*)**." *Plant Physiology and Biochemistry* **49**: 1177-1182.
- Schnee, C., T. G. Köllner, M. Held, T. C. J. Turlings, J. Gershenzon y J. Degenhardt (2006). "**The products of a single maize sesquiterpene synthase form a volatile defense signal that attracts natural enemies of maize herbivores**." *PNAS* **103**(4): 1129-1134.
- Schroth, G., B. Vanlauwe y J. Lehmann (2003). **Soil organic matter** Trees, crops and soil fertility G. Schroth and F. L. Sinclair. Wallingford, UK, CABI publishing: 77-91.
- Serrato-Cruz, M. A. (2006). **Gráfico para la Descripción Varietal de Cempasúchil (*Tagetes L.*)**. México, Servicio Nacional de Inspección y Certificación de Semillas (SNICS-SAGARPA) y la Universidad Autónoma Chapingo (UACH).
- Smolinska, U. y M. Horbowicz (1999). "**Fungicidal activity of volatiles from selected cruciferous plants against resting propagules of soil-borne fungal pathogens**." *J. Phytopathology*(147): 119-124.
- Strauss, S. Y. (1991). "**Indirect effects in community ecology: Their definition, study and importance**." *Trends in Ecology & Evolution* **6**(7): 206-210.
- Tahvanainen, J. O. y R. B. Root (1972). "**The influence of vegetational diversity on the population ecology of a specialized herbivore, *Phyllotreta cruciferae* (Coleoptera: Chrysomelidae)**." *Oecologia* **10**: 321-346.
- Tavernier, V., S. Cadiou, K. Pageau, R. Laugé, M. Reisdorf-Cren, T. Langin y C. Masclaux-Daubresse (2007). "**The plant nitrogen mobilization promoted by *Colletotrichum lindemuthianum* in *Phaseolus* leaves depends on fungus pathogenicity**." *Journal of Experimental Botany* **58**(12): 3351–3360.
- Tilman, D. (1987). "**On the meaning of competition and the mechanisms of competitive superiority**." *Functional Ecology* **1**(304-315).
- Ton, J., M. D'Allesandro, V. Jourdie, G. Jakab, D. Karlen, M. Held, B. Mauch-Mani y T. Turlings (2007). "**Priming by airborne signals boosts direct and indirect resistance in maize**." *Plant J* **49**: 16–26.
- Trenbath, B. R. (1974). "**Biomass productivity of mixtures**." *Advances in agronomy* **26**: 177-209.
- Trenbath, B. R. (1977). "**Interactions among diverse hosts and diverse parasites**." *Ann. N.Y. Acad. Sci. Am.* **287**: 124-150.
- Trenbath, B. R. (1993). "**Intercropping for the management of pests and diseases**." *Field Crops Res.* **34**: 381-405.
- Tumlinson, J. H., W. J. Lewis y L. E. M. Vet (1993). "**How parasitic wasps find their hosts?**" *Sci. Am.* **268**: 46-52.
- Vandermeer, J. H. (1989). **The Ecology of Intercropping**, Cambridge University Press.
- Vargas-Vazquez, M. L. P., J. S. Muruaga-Martínez, J. A. Acosta-Gallegos, R. Navarrete-Maya, P. Pérez-Herrera, G. Esquivel-Esquivel, M. B. G. Irizar-Garza y J. M. Hernández-Casillas (2006). Colección núcleo de *Phaseolus vulgaris* L. del INIFAP. A. y. P. I. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Centro de Investigación Regional del Centro, Campo Experimental Valle de México. México, INIFAP.
- Vaughn, S. F. (2001). **Plant volatiles**. *Encyclopedia of life sciences* J. W. Sons, WILEY.
- Vázquez, A. A. y N. Bautista (1993). **Guía para interpretar el análisis químico del suelo y agua**. México, Universidad Autónoma Chapingo.
- Wang, C., J. Zhang, H. Chen, Y. Fan y Z. Shi (2010). "**Antifungal activity of eugenol against *Botrytis cinerea***." *Tropical Plant Pathology* **35**(3).

- Yamagiwa, Y., Y. Inagaki, Y. Ichinose, K. Toyoda, M. Hyakumachi y T. Shiraishi (2011). "**Talaromyces wortmannii FS2 emits  $\beta$ -caryophyllene, which promotes plant growth and induces resistnace.**" J. Gen. Plant. Pathol. **77**: 336–341.
- Yang, F., S. Huang, R. Gao, W. Liu, T. Yong, X. Wang, X. Wu y W. Yang (2014). "**Growth of soybean seedlings in relay strip intercropping systems inrelation to light quantity and red:far-red ratio.**" Field Crops Research **155**: 245–253.
- Yeates, G. W. (1987). "**How plants affect nematodes.**" Adv. Ecol. Res. **17**: 61-113.
- Yi, H.-S., M. Heil, R. M. Adame-Alvarez, D. J. Ballhorn y C.-M. Ryu (2009). "**Airborne induction and priming of plant defenses against a bacterial pathogen.**" Plant physiology **151**(4): 2152-2161.
- Zaumeyer, W. J. y J. P. Meiners (1975). "**Disease resistance in beans.**" Annual Review of Phytopathology **13**: 313-334.
- Zhang, Z. y J. Pawliszyn (1993). "**Headspace solid-phase microextraction.**" Analytical Chemistry **65**(14): 1843-1852.