



UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN NICOLÁS DE HIDALGO



PROGRAMA INSTITUCIONAL DE MAestrÍA EN
CIENCIAS BIOLÓGICAS

FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA

ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA

TESIS

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DEL ACEITE ESENCIAL DE TRES ESPECIES DE
Tagetes SOBRE *Neopestalotiopsis* sp., HONGO CAUSANTE DE LA
MANCHA FOLIAR Y PUDRICIÓN EN FRESA

Presenta:

Q. F. B. JANET KARINA HERNÁNDEZ RAMÓN

Para obtener el grado de
MAESTRO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS

Director de Tesis
D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Morelia, Michoacán; Mayo 2023

Esta investigación se realizó en el Laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), bajo la dirección del Dr. Rafael Salgado Garciglia.

Proyecto financiado por la Coordinación de la Investigación Científica de la UMSNH.



INSTITUTO DE INVESTIGACIONES
QUÍMICO-BIOLÓGICAS
UMSNH



LAB. DE
BIOTECNOLOGIA
VEGETAL

DEDICATORIA

Este trabajo quiero dedicarlo a:

A mis padres

Por el apoyo, las palabras de aliento y el amor. No existen palabras para poder expresar el agradecimiento que les tengo, por haberme hecho una mujer fuerte y perseverante.

A mis amigos

Ricardo Soria Herrera

Querido amigo del alma, el universo nos reunió y las adversidades nos hizo fuertes, gracias por tanto y que la vida nos permita seguir viviendo nuevas aventuras.

Karla Dominguez González

Amiga mía, por todo tu amor, orientación y palabras de aliento, gracias por siempre creer en mí.

A mis guías académicos

D.C. Rafael Salgado Garciglia, D.C. María Guadalupe Zavala Parámo, Héctor Eduardo Martínez Flores, este trabajo no se hubiera realizado sin ustedes, gracias por creer en mí y apoyarme en esta hermosa experiencia.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en especial al PIMB, por haberme brindado la oportunidad de realizar este posgrado.

Muy especialmente al D.C. Rafael Salgado Garciglia, por haber creído en mi y apoyarme en todos los proyectos, gracias por todas sus enseñanzas, por compartir su pasión y amor a las plantas y por todas esas horas de pláticas tan amenas, gracias por guiarme en el camino de la investigación, le quiero mucho.

A mi comité sinodal por la guía y enseñanzas dadas en cada uno de los seminarios, por estar presentes y atentos de los avances de este proyecto. Gracias, D.C. Patricia Ríos Chávez, D.C. María Guadalupe Zavala Páramo, D.C. Francisco Alfredo Saavedra Molina y D.C. Héctor Eduardo Martínez Flores

A los que con su ayuda aportaron a este trabajo D.C. Karla Gabriela Domínguez González, D.C. Gregg Evans, Ing. Melvin García Nazariega, Ing. Cageme Argote, Ing. Horacio Mora, M.C. María Irene Morelos Martínez, M.C. Karla Morelia Díaz Tapia D. C. Alejandra Hernández García.

A mis compañeros del laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en especial a M.C. Kathia Rodríguez Valdovinos y a la Biol. Yolanda Aguilar Mejía que con sus consejos y apoyo en la realización de este trabajo se desarrolló en un ambiente ameno y profesional.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE CUADROS	i
ÍNDICE DE FIGURAS	ii
RESUMEN	iii
ABSTRACT	iv
1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	4
2.1. Plantas con actividad antifúngica	4
2.2. Aceites esenciales de plantas con actividad antifúngica	6
2.2.1. Métodos de extracción de aceites esenciales	9
2.2.2. Métodos de análisis para identificación y cuantificación de compuestos 11	
2.3. Aceites esenciales de <i>Tagetes</i> spp.	12
2.3.1. Actividad antifúngica de <i>Tagetes</i> spp.	14
2.3.2. Mecanismos de acción de aceites esenciales de <i>Tagetes</i> spp	15
2.3.3. Ensayos antifúngicos	16
2.4. Enfermedades fungosas en fresa	16
2.4.1. <i>Neopestalotiopsis</i> spp. en fresa	18
2.5. Plantas en estudio (<i>Tagetes</i> spp)	20
2.5.1. <i>Tagetes lucida</i> Cavanilles. Icon. [Cavanilles] 3(2): 33, t. 264	21
2.5.2. <i>Tagetes lunulata</i> Ortega. Nov. Rar. Pl. Descr. Dec. 44. (1797)	21
2.5.3. <i>Tagetes micrantha</i> Cavanilles. Icon. [Cavanilles] 4(1): 31, t. 352 (1797)	22
3. JUSTIFICACIÓN	23
4. HIPÓTESIS	24
5. OBJETIVOS	25
5.1. Objetivo general	25
5.1.1. Objetivos específicos	25
6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL	26
7. RESULTADOS	27

7.1. CAPÍTULO 1. Aislamiento y caracterización del hongo fitopatígeno <i>Neopestalotiopsis</i> sp. de plantas de fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>) Cv. Albión	27
Resumen	27
Introducción	28
Materiales y métodos	29
Aislamiento del hongo fitopatígeno <i>Neopestalotiopsis</i> sp.	29
Extracción de ADN genómico, amplificación y secuenciación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de <i>Neopestalotiopsis</i> sp.	30
Pruebas <i>in vitro</i> de patogenicidad	32
Resultados y discusión	32
Aislamiento del hongo fitopatígeno <i>Neopestalotiopsis</i> sp.	32
Extracción de ADN genómico, amplificación y secuenciación por PCR de <i>Neopestalotiopsis</i> sp.	35
Pruebas <i>in vitro</i> de patogenicidad	36
Conclusión	38
Referencias	38
7.2. CAPÍTULO 2. ...Efecto antifúngico sobre <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> y perfil químico de los aceites esenciales de tres especies de <i>Tagetes</i> (<i>T. lucida</i> , <i>T. lunulata</i> y <i>T. micrantha</i>)	40
Resumen	40
Introducción	41
Materiales y métodos	42
Recolecta de material vegetal	42
Especímenes de herbario	42
Obtención por hidrodestilación de aceites esenciales	43
Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM) ...	44
Determinación de la actividad antifúngica <i>in vitro</i>	44
Resultados y discusión	45
Rendimiento de los aceites esenciales	45
Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los aceites esenciales de <i>Tagetes</i> spp	46
Identificación y contenido de compuestos volátiles de aceites esenciales de <i>Tagetes</i> spp	49

Conclusiones.....	53
Referencias	54
7.3. CAPÍTULO 3. Efecto antifúngico del aceite esencial de <i>Tagetes micrantha</i> en plantas de fresa infectadas con <i>Neopestalotiopsis clavispora</i>.	57
Resumen.....	57
Introducción.....	58
Materiales y Métodos	59
Obtención de esporas.....	59
Determinación de la actividad antifúngica en plántulas de fresa	60
Resultados y discusión.....	61
Conclusiones.....	63
Referencias	63
8. DISCUSIÓN GENERAL.....	65
8.1. Identificación del aislado de <i>Neopestalotiopsis</i>	65
8.2. Efecto antifúngico del aceite esencial de <i>Tagetes</i> spp. sobre <i>N. clavispora</i>	66
8.2.1. Efecto antifúngico del aceite esencial de <i>T. micrantha</i> sobre <i>N. clavispora</i>	67
8.3. Efecto fungicida del aceite esencial de <i>T. micrantha</i> en plantas de fresa inoculadas con <i>N. clavispora</i>	69
9. CONCLUSIONES GENERALES	70
10. LITERATURA GENERAL CITADA	71

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. . Ejemplos de compuestos terpénicos de aceites esenciales de plantas con actividad antifúngica.....	7
Cuadro 2. Compuestos terpénicos y fenilpropanoides de aceites esenciales de algunas especies de <i>Tagetes</i>	13
Cuadro 3. Ejemplos de terpenos y fenilpropanoides con actividad antifúngica de aceites esenciales de <i>Tagetes</i> spp.	14
Cuadro 4. Condiciones térmicas de PCR para cebadores ITS, para la caracterización del hongo aislado de fresa.	31
Cuadro 5. Resultado del análisis BLAST de las secuencias de nucleótidos obtenidos por PCR en NCBI GenBank.	36
Cuadro 6. Rendimiento de los aceites esenciales de tres especies de <i>Tagetes</i> (<i>T. micrantha</i> , <i>T. lucida</i> y <i>T. lunulata</i>) obtenidos por hidrodestilación.....	45
Cuadro 7. Principales compuestos identificados del aceite esencial de tres especies de <i>Tagetes</i> (<i>T. micrantha</i> , <i>T. lucida</i> y <i>T. lunulata</i>).	51
Cuadro 8. Resultados de la actividad antifúngica del aceite esencial de <i>T. micrantha</i> en plantúlas de fresa (<i>Fragaria x ananassa</i> Cv. Aromas) infectadas con <i>N. clavispora</i>	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Identificación de <i>Neopestalotiopsis</i> spp.....	20
Figura 2. Plantas en estudio en etapa de floración.....	22
Figura 3. Producción de planta de fresa.	29
Figura 4. Identificación fúngica.	33
Figura 5. Cepa tipo de <i>Neopestalotiopsis</i> spp..	34
Figura 6. Electroferogramas..	35
Figura 7. Pruebas de patogenicidad de <i>Neopestalotiopsis clavispora</i> en plántulas y coronas de fresa	38
Figura 8. Ejemplares de plantas de <i>Tagetes</i>	42
Figura 9. Obtención de aceites esenciales.	43
Figura 10. Inhibición del aceite esencial <i>Tagetes micrantha</i> sobre <i>N. clavispora</i>	47
Figura 11 Inhibición del aceite esencial <i>Tagetes lucida</i> sobre <i>N. clavispora</i>	47
Figura 12. Inhibición del aceite esencial <i>Tagetes lunulata</i> sobre <i>N. clavispora</i>	48
Figura 13. Cromatogramas de los aceites esenciales de tres especies de <i>Tagetes</i> .50	
Figura 14. Obtención de esporas para ensayo en plantas de fresa.....	60
Figura 15. Determinación de la actividad antifúngica en plantas de fresa inoculadas con esporas de <i>N. clavispora</i>	62

RESUMEN

La actividad antifúngica del aceite esencial de tres especies de *Tagetes* (*T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*) fue evaluada sobre *Neopestalotiopsis* sp. hongo causal de pudrición parda de la corona interna y la raíz en plantas de fresa, por lo que, en una primera fase de la investigación, se realizó el aislamiento, identificación y caracterización molecular de este hongo fitopatógeno. De segmentos de raíz y corona de plantas de fresa (*Fragaria x ananassa*) Cv. Albión previamente desinfectados, se obtuvieron 40 aislados preliminares en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) de los cuales uno de ellos mostró una coincidencia morfológica típica macro y microscópicamente del género *Neopestalotiopsis*, ya que presentó micelio de color blanco algodonoso con crecimiento ondulatorio, con un color amarillo claro al reverso de la colonia, presentando conidomas con tres apéndices apicales hialinos, de color negro sobre el micelio y conteniendo macroconidios con cinco celdas donde la basal y la apical son hialinas y las tres celdas medias de diferentes tonos de café. La identificación se realizó mediante la amplificación y secuenciación de dos regiones genéticas ITS (ITS1, ITS4) y mediante el análisis BLAST se obtuvo una identidad del 100 % con *N. clavispora* en el NCBI GenBank. La patogenicidad fue comprobada con la inoculación de esporas (1×10^3 esporas/mL) en el centro de la corona en plantas completas en plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Cv. Aromas) *in vitro*, ya que se presentaron los síntomas de la enfermedad como manchas en los bordes de las hojas de color café-óxido y principios de necrosis en la corona y raíces. Para la determinación del efecto antifúngico del aceite esencial de las tres especies de *Tagetes* en estudio, estos se obtuvieron mediante hidrodestilación en un equipo tipo Clevenger, a partir de la parte aérea (tallos, hojas y flores). La actividad antifúngica se realizó por el método de difusión en pozos en cajas Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA), vertiendo 50 μ L en cada pozo de cada aceite esencial, resuspendidos en dimetilsulfóxido (DMSO, 1%) a una concentración de 10 mg/mL, utilizando discos de micelio de 0.5 cm de diámetro *N. clavispora*. Como control positivo se empleó el fungicida comercial Captan® (2.0 mg/mL) y como control negativo la solución vehículo DMSO 1%. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición, determinando el crecimiento micelial (mm) a los 8 días del cultivo, a 28 ± 2 °C, con los que se determinó la concentración inhibitoria media (CL₅₀) y total (CL₁₀₀), para seleccionar el aceite esencial con mayor actividad antifúngica. Se realizó un análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) para la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles de cada aceite esencial. El aceite esencial de *T. micrantha* tuvo el mayor efecto antifúngico sobre *N. clavispora*, presentando los valores más bajos de CL₅₀ (0.061 μ g/mL) y de CL₁₀₀ (0.135 μ g/mL). En cada aceite esencial se observó un perfil diferente de compuestos volátiles, observando al estragol y anetol como los mayoritarios del de *T. micrantha*, que representan el 89.1 % del total del aceite, lo que sugiere sean los responsables del mayor efecto antifúngico sobre *N. clavispora*. El efecto antifúngico de este aceite se evaluó en plantas de fresa (*F. x ananassa* Cv. Aromas) cultivadas bajo condiciones asépticas, manteniéndolas en condiciones de laboratorio (25 ± 2 °C), realizando la inoculación con 10 μ L de esporas (1×10^3 esporas/mL) de *N. clavispora* y la aplicación del aceite esencial por aspersión (60 μ L de la CL₁₀₀), preparado con DMSO 1%. Se empleó como control positivo el fungicida comercial Captan® (2.0 g/L) y como control negativo la solución vehículo DMSO 1%, aplicados también por aspersión. A los ocho días se observaron los síntomas causados por el hongo, confirmando el efecto antifúngico del aceite esencial de *T. micrantha* mediante la determinación de un índice de severidad de cero (IS=0), similar a lo observado con la aplicación del fungicida comercial. La enfermedad estuvo presente en las plantas tratadas con DMSO 1%, mostrando crecimiento de micelio y síntomas de la enfermedad (IS=4). Con estos resultados se demostró el efecto antifúngico del aceite esencial de *T. micrantha* en ensayos *in vivo*, utilizando plantas de fresa inoculadas con esporas de *N. clavispora*.

Palabras clave: Aceites esenciales, antifúngicos, compuestos volátiles, *Neopestalotiopsis*, *Tagetes*.

ABSTRACT

The antifungal activity of the essential oil of three species of *Tagetes* (*T. lucida*, *T. lunulata* and *T. micrantha*) was evaluated on *Neopestalotiopsis* sp., causal fungus of brown rot of the inner crown and root in strawberry plants, so, in a first phase of the investigation, the isolation, identification and molecular characterization of this phytopathogenic fungus was carried out. From root and crown segments of strawberry plants (*Fragaria x ananassa*) Cv. Albion previously disinfected, 40 preliminary isolates were obtained in Potato Dextrose Agar (PDA) medium of which one of them showed a morphological coincidence typical macro and microscopically of the genus *Neopestalotiopsis*, since it presented cottony white mycelium with wave growth, with a light yellow color on the reverse side of the colony, presenting conidiomas with three hyaline apical appendages, black on the mycelium and containing macroconidia with five cells where the basal and apical are hyaline and the three middle cells of different brown tones. Identification was performed by amplification and sequencing of two ITS genetic regions (ITS1, ITS4) and BLAST analysis obtained a 100% identity with *N. clavispora* in the NCBI GenBank. The pathogenicity was verified with the inoculation of spores (1×10^3 spores/mL) in the center of the crown in whole plants in strawberry plants (*Fragaria x ananassa* Cv. Aromas) *in vitro*, since the symptoms of the disease were presented as spots on the edges of the leaves of brown-oxide color and principles of necrosis in the crown and roots. For the determination of the antifungal effect of the essential oil of the three species of *Tagetes* under study, these were obtained by hydrodistillation in a Clevenger type equipment, from the aerial part (stems, leaves and flowers). The antifungal activity was carried out by the method of diffusion in wells in Petri dishes with potato-dextrose-agar (PDA) medium, adding 50 μ L into each well of each essential oil, resuspended in dimethyl sulfoxide (DMSO, 1%) at a concentration of 10 mg/mL, using mycelium discs of 0.5 cm diameter *N. clavispora*. The commercial fungicide Captan® (2.0 mg/mL) was used as a positive control and the DMSO 1% vehicle solution was used as a negative control. The results were reported as a percentage of inhibition, determining the mycelial growth (mm) at 8 days of culture, at 28 ± 2 °C, with which the mean inhibitory concentration (LC₅₀) and total (LC₁₀₀) was determined, to select the essential oil with greater antifungal activity. A gas chromatography analysis coupled to mass spectrometry (GC-ME) was performed for the identification and quantification of the volatile compounds of each essential oil. The essential oil of *T. micrantha* had the greatest antifungal effect on *N. clavispora*, presenting the lowest values of LC₅₀ (0.061 μ g/mL) and CL₁₀₀ (0.135 μ g/mL). In each essential oil a different profile of volatile compounds was observed, observing estragole and anethole as the major compounds of *T. micrantha*, which represent 89.1% of the total oil, which suggests they are responsible for the greater antifungal effect on *N. clavispora*. The antifungal effect of this oil was evaluated in strawberry plants (*F. x ananassa* Cv. Aromas) grown under aseptic conditions, keeping them in laboratory conditions (25 ± 2 °C), inoculating with 10 μ L of spores (1×10^3 spores/mL) of *N. clavispora* and applying essential oil by spraying (60 μ L of LC₁₀₀), prepared with DMSO 1%. The commercial fungicide Captan® (2.0 g / L) was used as a positive control and the DMSO 1% vehicle solution was used as a negative control, also applied by spraying. eight days, the symptoms caused by the fungus were observed, confirming the antifungal effect of *T. micrantha* essential oil by determining a severity index of zero (IS=0), similar to that observed with the application of the commercial fungicide. The disease was present in plants treated with DMSO 1%, showing mycelium growth and disease symptoms (IS=4). With these results, the antifungal effect of *T. micrantha* essential oil was demonstrated in *in vivo* assays, using strawberry plants inoculated with *N. clavispora* spores.

Keywords: Antifungals, essential oils, *Neopestalotiopsis*, *Tagetes*, volatile compounds.

1. INTRODUCCIÓN

La investigación sobre métodos alternativos en el manejo de plagas y enfermedades se incrementó en los últimos años, debido a los continuos problemas asociados con el uso de productos convencionales que incluyen el desarrollo de resistencia en los microorganismos objetivo de control, generación de plagas secundarias, resurgencia de plagas y la aparición de enfermedades emergentes (Ortega 2001; Choi *et al.*, 2003). Esta problemática impulsa la generación de estrategias alternativas, como es el uso de plantas con actividad antifúngica, que permitan proteger los cultivos y por ende obtener mayor rendimiento y calidad en la producción, sin poner en riesgo la salud del hombre y su entorno (Rodríguez, 2000).

Las plantas han desarrollado diversas estrategias de defensa contra heridas y ataques por insectos o microorganismos patógenos produciendo una gran variedad de metabolitos secundarios bioactivos, los cuales son compuestos químicos volátiles derivados del metabolismo primario, se producen en pequeñas cantidades y no son propias de todas las plantas, difieren estos compuestos entre géneros, familias e incluso entre especies (Rojas *et al.*, 2015). Estos metabolitos secundarios cumplen múltiples funciones no vitales en las plantas, interviniendo en las interacciones ecológicas entre la planta y su ambiente, muchos de ellos actúan como herbicidas, larvicidas, repelentes, atrayentes, bactericidas, insecticidas y fungicidas (Rojas *et al.*, 2015; Guillén-Andrade *et al.*, 2019). Dentro de este tipo de compuestos, los más comunes son los del tipo fenólico (ácidos fenólicos, cumarinas, flavonoides, lignina y taninos), glicósidos (saponinas, glicósidos cardiacos, glicósidos cianogénicos y glucosinolatos), alcaloides y los terpenos (entre los que se encuentran hormonas, pigmentos y volátiles que componen los aceites esenciales) (Ávalos-García y Pérez-Urria Carril, 2009).

Los aceites esenciales son producidos por una gran cantidad de plantas aromáticas, muchas de ellas con propiedades medicinales, y están constituidos con un alto contenido de terpenos volátiles, los que han demostrado tener diversos tipos de actividad biológica, entre ellas, propiedades antifúngicas, ya que éstos tienen un efecto directo sobre la inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos y son considerados de baja toxicidad, ya que presentan una persistencia corta en el ambiente. Por lo anterior, son considerados como candidatos excelentes para ser empleados en la agricultura orgánica, importantes para el abastecimiento de la demanda creciente de alimentos inocuos (Omar y Kordali, 2019). Los terpenos son

reconocidos como un constituyente GRAS (generalmente reconocido como seguro, por las siglas en inglés) en los alimentos, de acuerdo a lo establecido por la Administración de Alimentos y Fármacos de Estados Unidos de Norteamérica (Food and Drug Administration, FDA), por lo que una de sus aplicaciones ha sido como ingrediente activo para prevenir el desarrollo de algunas enfermedades fúngicas. Los terpenos son considerados con una alta actividad antifúngica debido a las características hidrófobas de los componentes químicos de su composición y a sus características lipofílicas, lo que permite la interacción entre sus constituyentes con los lípidos de la membrana celular de los hongos patógenos, afectando la permeabilidad celular y provocando cambios en la estructura celular (Centeno-Briceño y Carrera-Jaspe, 2013; Ciriminna, 2014).

Diversos y numerosos estudios indican que los aceites esenciales de plantas, en particular sus constituyentes los terpenos, poseen actividad inhibitoria sobre el crecimiento de micelio y germinación de esporas de hongos fitopatógenos (Scalvenzi *et al.*, 2016). Uno de los mecanismos de esta actividad, es la acción de los terpenos sobre la membrana celular, interactuando con las enzimas y las proteínas de la membrana, produciendo así un flujo de protones hacia el espacio extracelular que induce cambios en las células y finalmente su muerte (Centeno-Briceño y Carrera-Jaspe, 2013).

Dentro de las familias de plantas que producen y acumulan aceites esenciales, con compuestos bioactivos como los terpenos, está la familia Asteraceae, una de las que mayor número de especies presenta (32,913 especies repartidas en unos 1911 géneros), considerada una de las familias con flores de mayor riqueza y diversidad biológica. La familia se caracteriza por presentar las flores dispuestas en una inflorescencia compuesta denominada capítulo, la cual se halla rodeada de una o más filas de brácteas (involucro) (The Plant List. Web). Aunque diversos géneros de esta familia han mostrado que sus aceites esenciales y compuestos terpénicos tienen actividad antifúngica, solo por mencionar algunos, especies del género *Caucasalia* demostraron una efectividad inhibitoria contra *Mycobacterium smegmatis*, *Candida albicans* y *Saccharomyces cerevisiae* los cuales son de importancia clínica y alimentaria (Yayli *et al.*, 2018); Navarro-Rocha *et al.* (2017) realizaron ensayos antifúngicos con *Artemisia absinthium* contra cuatro especies de hongos de importancia agrícola (*Fusarium moniliforme*, *Fusarium solani*, *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea*), obteniendo una elevada actividad antifúngica, siendo *B. cinerea* la especie más sensible. Entre los principales componentes de sus aceites

esenciales están (-)-(Z)-Epoxiocimeno (43%), (-)-cis-Crisantenol (11.9%) y Crisantenil acetato (6.6%).

En particular, el aceite esencial de algunas especies del género *Tagetes*, ha sido ampliamente estudiado a nivel biológico y químico, demostrando una alta actividad fungicida contra hongos fitopatógenos (Salehi *et al.*, 2018). En México, habitan hasta 26 especies de *Tagetes* de las cuales *T. filifolia* (anisillo), *T. micrantha* (anís de campo), *T. lucida* (pericón o Santa María) y *T. lunulata* (cinco llagas), habitan en el estado de Michoacán (Villarreal, 2003; Villaseñor, 2018). En nuestro grupo de trabajo, se ha estudiado el efecto fungicida del aceite esencial de *T. lucida*, del que se ha demostrado su actividad sobre diversos hongos como *Botrytis cinerea*, hongo causal del moho gris en plantas y frutos de fresa y zarzamora (Céspedes *et al.*, 2006; Fulgencio-Negrete, 2013; Cázarez-Chávez, 2017).

Debido a que recientemente, ha surgido una enfermedad fúngica emergente, que afecta particularmente al cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*), una de las principales frutillas que se cultivan en México y en el estado de Michoacán, la cual se asocia con pudrición de la raíz, pudrición de la corona y mancha foliar (Rebollar *et al.*, 2020), se han realizado investigaciones para demostrar la especie fúngica causal. Los estudios recientes han demostrado que el hongo causal es una especie de *Neopestalotiopsis*, aún no identificada plenamente, aunque con base en los resultados de análisis morfológicos y filogenéticos, se identificó la especie como *Neopestalotiopsis clavispora*. La enfermedad se ha documentado mayormente en la etapa del trasplante en viveros, observando pudrición parda de la corona interna y la raíz, causando retraso en el desarrollo, falta de crecimiento y enraizamiento deficiente (Park *et al.*, 2019).

Al tratarse de una enfermedad nueva, se desconocen los fungicidas eficaces para su control, presentándose como potencial alternativo, el uso de antifúngicos de origen vegetal, particularmente derivados del aceite esencial de especies de *Tagetes*. Por lo que el objetivo de la presente investigación fue determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de tres especies de *Tagetes* (*T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*) sobre el hongo *Neopestalotiopsis* sp., causante de la mancha foliar y pudrición de raíz y corona en fresa.

2. ANTECEDENTES

2.1. Plantas con actividad antifúngica

Los hongos fitopatógenos son la causa de las principales enfermedades de los sistemas agrícolas, el deterioro de los suelos por el uso constante de agroquímicos sintéticos ha causado una disminución de la rizósfera natural y por este motivo se han agravado las enfermedades causadas por hongos (Gan y Wickings, 2017).

Actualmente se han investigado y desarrollado bioinsumos como bioinsecticidas, bioherbicidas, bioacaricidas, bionematicidas y biofungicidas, que son alternativas que incluyen estimulantes de la defensa en las plantas, técnicas de control biológico y derivados de productos naturales obtenidos a partir de plantas (Isman y Grieneisen, 2014; Ordanza-Beneitez, 2017). Para un manejo integral de plagas y enfermedades empleando estos bioinsumos se debe tomar en cuenta el agroecosistema y sus limitantes. En las últimas décadas, los estudios se han centrado sobre la formulación de productos naturales con algún tipo de actividad biológica sobre hongos fitopatógenos con una eficacia y una acción cada vez mayor y más rápida, lo que está generando que estas prácticas sean más eficaces en un amplio rango de condiciones ambientales, de especies de plagas y de sistemas de cultivos (Gakuya *et al.*, 2013; Falcón-Rodríguez *et al.*, 2015). Debido a esto, se ha demostrado la eficiencia de los productos naturales de diversas especies vegetales obtenidos como extractos, fracciones, decocciones o metabolitos secundarios aislados (Leahy *et al.*, 2014).

El uso de extractos vegetales es una estrategia de control de enfermedades causadas por hongos, principalmente al contenido de diferentes componentes, como los metabolitos secundarios, los que se dividen en varios grupos basados en sus estructuras químicas, siendo los terpenoides, glucósidos y glucosinolatos, alcaloides y compuestos fenólicos, los más ampliamente encontrados y estudiados (Buchanan *et al.*, 2015). El elevado contenido de metabolitos con actividad antimicrobiana que las plantas presentan, las convierte en fuentes potenciales de compuestos que podrían ser empleados en su defensa, tanto por su actividad antimicrobiana, como por la inducción de resistencia (Ojito-Ramos y Portal, 2017).

Por ejemplo, los glucósidos cianogénicos son β -glucósidos de α -hidroxinitrilos (cianohidrininas), que se caracterizan por su capacidad de liberar cianuro de hidrógeno (HCN) cuando son hidrolizados por β -glucosidasas. Este proceso (cianogénesis) típicamente ocurre cuando el tejido de la planta que contiene glucósidos cianogénicos está dañado, lo cual suele ocurrir cuando es atacado por animales o insectos (Buchanan *et al.*, 2015).

Los compuestos azufrados como el glutatión (GSH), las fitoalexinas y tioninas, también tienen una directa o indirecta relación con los mecanismos de defensa de las plantas contra patógenos microbianos. Los compuestos nitrogenados en los que se incluyen a los alcaloides, glucósidos y aminoácidos no proteicos que se sintetizan a partir de aminoácidos comunes, se postula que se intercalan en el ADN, debido a su papel en la defensa contra los herbívoros y toxicidad sobre microorganismos (Saravanakumar *et al.*, 2015; Mesa *et al.*, 2019).

Compuestos de tipo fenólico como las cumarinas, ligninas, flavonoides y taninos están presentes en el sistema de defensa de las plantas mediante la modificación de tejidos o pared celular proporcionando dureza o rigidez a éstos, tienen capacidad de actuar como repelentes, como inhibidores de actividad enzimática por oxidación, algunas implicadas en procesos de transcripción y reparación del ADN, lo que lleva a la muerte celular (Saravanakumar *et al.*, 2015; Mesa *et al.*, 2019).

Los terpenos (presentes en los aceites esenciales) son compuestos volátiles que participan en la defensa de las plantas que poseen diferente actividad biológica como la disuasión de la alimentación de una gran cantidad de insectos y mamíferos, así como actividad antibacteriana y antifúngica. Uno de los principales mecanismos de acción es sobre la disminución de la permeabilidad de membrana celular, que causa una drástica reducción en el número de mitocondrias y las vesículas generadas en el complejo de Golgi, lo que perjudica la respiración y el tráfico vesicular (Saravanakumar *et al.*, 2015; Ojito-Ramos y Portal, 2017).

Estos grupos de compuestos de plantas cumplen una función muy importante en la agroecología, por el beneficio al medio ambiente y al ecosistema cuando son usados como antifúngicos, entre éstos, los componentes de los aceites esenciales como los terpenos, muestran este potencial para su aplicación en plantas de valor agrícola (Jiménez y Mosquera, 2014; Nazzaro *et al.*, 2017).

2.2. Aceites esenciales de plantas con actividad antifúngica

Los aceites esenciales son fracciones líquidas volátiles, generalmente mezclas homogéneas de hasta 100 compuestos químicos orgánicos, provenientes de la familia química de los terpenoides. Generan diversos aromas agradables y perceptibles al ser humano. Bajo condiciones de temperatura ambiental, son líquidos poco densos, pero con mayor viscosidad que el agua. Los aceites esenciales están conformados por diversos metabolitos secundarios sintetizados por las plantas, principalmente terpenos y fenilpropanoides que son producidos al momento de activarse algunos mecanismos de defensa como respuesta a factores ambientales y ecológicos, sus componentes presentan funciones de defensa, atracción de polinizadores, repulsión de insectos patógenos, entre otras. Son inflamables, pero no son considerados tóxicos, aunque pueden provocar alergias en personas sensibles a determinados terpenos (Cadby *et al.*, 2002).

Además, los aceites esenciales son inocuos, mientras la dosis suministrada no supere los límites de toxicidad. Sufren degradación química en presencia de la luz solar, del aire, del calor, de ácidos y álcalis fuertes, generando oligómeros de naturaleza indeterminada. Son solubles en los disolventes orgánicos comunes. Casi inmiscibles en disolventes polares asociados (agua, amoníaco). Tienen propiedades de solvencia para los polímeros con anillos aromáticos presentes en su cadena. Son aceptados como sustancias seguras (GRAS) por la Agencia de Drogas y Alimentos de E.E.U.U. (FDA) (Code of Federal Regulations, 2003). Los aceites esenciales presentan diferentes tonalidades, como, por ejemplo, en genotipos de albahaca presentan diferentes tonalidades en la gama del amarillo, hasta incoloros en algunos casos (Rodríguez *et al.*, 2012).

Por lo general, el contenido de aceite esencial de las plantas es bajo, con rendimientos de extracción del 1 al 3 %, aunque existen algunas excepciones como el clavo de olor y nuez moscada con el 9 al 19 % de rendimiento. Sin embargo, tienen una gran actividad biológica a bajas concentraciones (López y Tránsito, 2004; Benouali, 2016).

En el cuadro 1 se presentan algunos ejemplos de compuestos terpénicos de aceites esenciales de plantas, con actividad antifúngica (Science Direct, PUBMED y Scielo, Consulta en julio

2021), libros especializados y demás reportes bibliográficos relacionados con aceites esenciales de distintas especies de vegetales con actividad inhibitoria sobre los diferentes fitopatógenos específicamente de los géneros *Botrytis*, *Fusarium*, *Penicillium*, *Aspergillus*, *Colletotrichum*, *Rhizopus*, así como sus principales compuestos.

Cuadro 1. Ejemplos de compuestos terpénicos de aceites esenciales de plantas con actividad antifúngica.

Especie vegetal	Aceite esencial	Compuestos principales	Hongo patógeno	Referencia
<i>Azadirachta indica</i>	Neem	Eicosano Diacenafto [1,2-j: 1', 2'-l] fluoranteno	<i>Fusarium oxysporum</i>	DeJesus, 2019
<i>Calamintha nepeta</i>	Calaminto	Pulegona Mentona Piperitenona Piperitona	<i>Botrytis cinerea</i>	Ambrico <i>et al.</i> , 2020
<i>Cananga odorata</i>	Ylang-ylang o flor de cananga	Linalol Germacreno-D Timol Timol	<i>Fusarium graminearum</i>	Kalagatur-Naveen <i>et al.</i> , 2018
<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Canela	Carvacrol p-cimeno γ -terpineno β -cariofileno	<i>Botrytis cinerea</i>	Mohammadi <i>et al.</i> , 2015
<i>Cymbopogon nardus</i>	Citronela	Citronelal Citronelol Geraniol	<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Oliveira <i>et al.</i> , 2020
<i>Eucalyptus camaldulensis</i>	Eucalipto	1,8-cineol α - pineno α - felandreno p-cimeno 1,8-cineol	<i>Fusarium spp</i>	Roques <i>et al.</i> , 2017
<i>Hedychium spicatum</i>	Hedichium	Linalol β -pineno Trans- anetol	<i>Fusarium graminearum</i>	Kalagatur-Naveen <i>et al.</i> , 2018
<i>Illicium verum</i>	Anís estrella	D-limoneno Estragol Viridiflorol Himacalol	<i>Aspergillus flavus</i>	Li <i>et al.</i> , 2020
<i>Inula britannica</i> L.	Ínula	6,10,14-trimetil-2-pentadecanona 13-tetradecanolido 3-metil-4-propil-2,5-furandiona	<i>Fusarium moniliforme</i>	Zhao <i>et al.</i> , 2013
<i>Lippia origanoides</i>	Orégano	Monoterpenos oxigenados Carvacrol	<i>Botrytis cinerea</i>	Hernandes <i>et al.</i> , 2017

Cuadro 1. Ejemplos de compuestos terpénicos de aceites esenciales de plantas con actividad antifúngica (CONT).

<i>Mentha × piperita</i>	Menta	Acetato de mentilo Mentol Mentofurano Mentona 1,8 cineol	<i>Alternaria alternata</i> <i>Fusarium tabacinum</i> <i>Fusarium oxysporum</i> <i>Aspergillus varicolor</i>	Desam <i>et al.</i> , 2019
<i>Nepeta leucophylla</i>	Hierba gatera o Nepeta	B-monoenolacetato de iridodial Trans-cinamaldehído	<i>Fusarium oxysporum</i>	Vinod-Kumar <i>et al.</i> , 2014
<i>Ocotea quixos</i>	Canelillo del Brasil	Trans-metilsoeugenol β-cariofileno α-pineno	<i>Aspergillus oryzae</i> <i>Fusarium solani</i> <i>Rhizopus stolonifer</i>	Scalvenzi <i>et al.</i> , 2016
<i>Origanum majorana</i>	Mejorana	Terpinen-4-ol	<i>Aspergillus flavus</i>	Chaudhari <i>et al.</i> , 2020
<i>Pinus pinea L.</i>	Pino	Limoneno α-pineno Mirceno α-felandreno	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i>	Demirci <i>et al.</i> , 2015
<i>Piper aduncum L.</i>	Matico	Trans-E-ocimeno Piperitona Dialipol Copaeno Cariofileno	<i>Fusarium solani</i>	Scalvenzi <i>et al.</i> , 2016
<i>Schinus molle</i>	Pirul	δ-cadieno Viridifloral α-pineno Germacreno Eugenol	<i>Aspergillus flavus</i> <i>Aspergillus niger</i> <i>Aspergillus fumigatus</i>	Pereira de Menezes <i>et al.</i> , 2020
<i>Syzygium aromaticum</i>	Calvo de olor	E-cariofileno α-humuleno Óxido de cariofileno Limoneno α-pineno β-pineno Terpinoleno	<i>Fusarium oxysporum</i>	Sharma <i>et al.</i> , 2017
<i>Tagetes spp</i>	Caléndula	(E)-β-ocimen Dihidrotagetona Tagetona Tagetenona β-cariofileno Eugenol Timol	<i>Aspergillus spp</i> <i>Fusarium spp</i>	Salehi <i>et al.</i> , 2018
<i>Thymus vulgaris</i>	Tomillo	Carvacrol Óxido de cariofileno Cimeno Timol	<i>Botrytis cinerea</i>	Mancini <i>et al.</i> , 2015
<i>Trachyspermum ammi</i>	Ajowán	L- limoneno 1,8-cineol γ-terpineno	<i>Aspergillus flavus</i>	Kedia <i>et al.</i> , 2015

Los aceites esenciales se pueden clasificar de acuerdo con el tipo de componentes mayoritarios, hay aceites esenciales ricos en monoterpenos (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.), otros

ricos en sesquiterpenos (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.) y otros que están mayormente compuestos de fenilpropanoides (p.ej. clavo, canela, anís, etc.) (Bruneton, 2003; Breitmaier, 2006).

Dentro de las especies vegetales productoras de aceites esenciales más reconocidas por sus propiedades antifúngica se encuentran *Azadirachta indica* (neem), que se ha utilizado en el manejo de enfermedades fúngicas como *Pestalotia psidii*, *Gloesporium psidii*, *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* sp., *Alternaria alternata*, *Cladosporium* sp. y *Geotrichum candidum* (Nongmaithem, 2014), al igual que *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *Melaleuca alternifolia* (árbol del té), *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), *Mentha × piperita* (menta) (Mohammadi *et al.*, 2015; Sharma *et al.* 2017; Zhang *et al.*, 2018; Desam *et al.*, 2019). En los últimos años se han estudiado los aceites esenciales de la familia Asteraceae en particular del género *Tagetes* por el marcado efecto de los aceites esenciales sobre hongos patógenos, favorables en varios agentes patógenos con un efecto selectivo (Salehi *et al.*, 2018; Akbar *et al.*, 2021).

2.2.1. Métodos de extracción de aceites esenciales

Para la obtención de aceites esenciales se pueden aplicar diferentes técnicas como la extracción con solventes volátiles no polares, mediante fluidos supercríticos y destilación por arrastre de vapor de agua. Este proceso se aplica en muestras vegetales molidas y secas, para solubilizar los aceites esenciales, a través de sucesivos macerados, el solvente logra concentrar las moléculas aromáticas, posteriormente para eliminar el solvente se aplica una destilación a baja presión. Entre algunos de los disolventes empleados están el éter de petróleo, el acetato de etilo y el hexano. Las razones por las que no se suele aplicar esta técnica es que no se consigue obtener aceites esenciales puros, lo que representa un problema puesto que los disolventes empleados suelen ser tóxicos y costosos (Martínez, 2003).

La extracción con fluidos supercríticos es una de las técnicas más recientes. El fluido supercrítico más empleado es el anhídrido carbónico (CO₂), ya que es un compuesto no inflamable, no corrosivo, no tóxico, incoloro y relativamente barato. El CO₂ se elimina fácilmente sin dejar residuos, lo que permite obtener productos con un alto grado de pureza. Además, el CO₂ alcanza el estado supercrítico fácilmente, por tanto, se puede trabajar a bajas

temperaturas previniendo la degradación térmica de los componentes orgánicos al ser extraídos (Gómez, 2018).

La hidrodestilación es el método de extracción de aceites esenciales que se basa en la destilación heterogénea. Para aplicar esta técnica es importante tomar en cuenta que el compuesto volátil debe ser insoluble en el agua, el material a extraer está en el mismo recipiente que el agua con el cual se va a realizar la extracción. Todo el conjunto se calienta y los vapores resultantes son condensados y posteriormente separados. La destilación por arrastre de vapor de agua consiste en aprovechar la volatilidad de los componentes del aceite. Se colocan trozos de muestra fresca en agua caliente que se lleva a ebullición a presión atmosférica. El calor libera las moléculas volátiles formando una mezcla azeotrópica con el vapor de agua. Esta mezcla pasa por un refrigerante donde se condensa formando dos fases inmiscibles, que, debido a las 35 diferencias de densidad entre el hidrolato y el aceite, se decantan en la trampa *DeanStark*. Se puede implementar una bomba de vacío para reducir la presión del sistema y disminuir la temperatura de ebullición del solvente, con el objetivo de prevenir que los enlaces de las moléculas se rompan y mantener la integridad de los componentes de los aceites esenciales (López y Tránsito, 2004; Chemat *et al.* 2006; Gómez, 2018).

La extracción de aceites esenciales asistida por microondas, es una técnica eco amigable relativamente nueva que ha recibido una atención creciente debido a su menor tiempo de extracción y consumo de energía, mayor rendimiento de compuestos de interés y menor consumo de disolvente ya que al emplearse agua como vehículo de extracción, se elimina el uso de solventes tóxicos y dañinos al medio ambiente, así como la degradación térmica ocasionada por el uso del vapor de agua para obtener los aceites esenciales; gracias a esto, el rendimiento del extracto es mayor mientras se mantiene la composición de los compuestos volátiles (Guarín y Barajas, 2015; Cordova *et al.*, 2020). El mecanismo de extracción por microondas se fundamenta en la fuerte absorción de energía por el agua *in situ*, lo que proporciona el aumento de temperatura al interior de la muestra y, por ende, la ruptura de las células de aceite esencial por el agua *in situ* (Lucchesi *et al.*, 2007).

2.2.2. Métodos de análisis para identificación y cuantificación de compuestos

Para la caracterización de los aceites esenciales se emplea la técnica de cromatografía, cuyo fundamento consiste en separar el aceite esencial en diferentes elementos para definir los metabolitos secundarios presentes y estudiarlos individualmente (Sgariglia y Soberón, 2010). Esta técnica se realiza en un entorno con atmósfera saturada en la que se usan dos fases. La fase móvil sirve como eluyente, que va movilizandolos diferentes componentes del aceite por la fase estacionaria. Los componentes son retenidos en la fase estacionaria de acuerdo a su polaridad, permitiendo la separación de los mismos (Sgariglia y Soberón, 2010; Mayolo y Martínez, 2012). Mediante cromatografía en capa fina y de gases, se analizan, identifican y cuantifican los diversos tipos de terpenos.

La cromatografía de capa fina (*Thin Layer Chromatography, TLC*) es la técnica cualitativa más utilizada por su simplicidad y bajo costo de operatividad (Mayolo y Martínez, 2012), se basa en la preparación de una capa uniforme de un absorbente (como por ejemplo gel de sílice, alúmina o celulosa) mantenido sobre una placa de vidrio u otro soporte; la fase estacionaria será un componente polar y el eluyente será menos polar para permitir la separación de los analitos en la cual los más polares van a desplazar con mayor facilidad. Se emplea para determinar el grado de pureza de un compuesto, comparación de muestras, realizar el seguimiento de una reacción (Elsa-Lundanes, 2013).

La cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) es una técnica que combina la capacidad de separación que presenta la cromatografía de gases con la sensibilidad y capacidad selectiva del detector de masas. Esta combinación permite analizar y cuantificar compuestos trazas en mezclas complejas con un alto grado de efectividad. Esta técnica está indicada para la separación de compuestos orgánicos volátiles y semivolátiles como los diversos grupos de terpenos y fenilpropanos. La separación de dichas sustancias depende de su distribución entre las fases móvil y estacionaria que conforman el sistema. Una vez separadas las sustancias son fragmentadas y analizadas en función de su patrón de fragmentación, el cual puede ser comparado con información contenida en una base de datos de espectros de masas para su identificación preliminar. La identificación definitiva, así como la cuantificación de cada sustancia debe hacerse mediante el empleo de sustancia de referencia (Stashenko y Martínez, 2009).

2.3. Aceites esenciales de *Tagetes* spp

México es considerado como centro de origen de numerosas especies, géneros, subtribus y tribus de la familia Asteraceae (=Compositae), plantas que se caracterizan por presentar sus flores en diferentes cantidades conformando un capítulo o cabezuela, siendo ésta la inflorescencia (Turner y Nesom, 1993). En el país existen 26 tribus, 417 géneros y 3113 especies, de las cuales son nativas aproximadamente 3050 y el 63.8% de éstas (1988) son endémicas, siendo Michoacán el quinto estado con mayor número de especies (837) (Villaseñor, 2018). A esta familia pertenece el género *Tagetes*, de la subtribu *Tageteae*, que cuenta con cerca de 55 especies (Soule, 1993), en México está representado por 26 de ellas, constituyendo un importante centro de diversidad de dicho género (Turner, 1996). En nuestro estado, Michoacán, habitan *T. erecta*, *T. filifolia*, *T. foetidissima*, *T. micrantha*, *T. lucida*, *T. lunulata*, *T. pringlei*, *T. remotiflora*, *T. subulata* y *T. triradiata* (Villarreal, 2003).

Las especies del género *Tagetes* son aromáticas por la presencia de aceites esenciales contenidos en diferentes estructuras de las plantas, se utilizan en diferentes áreas para diversos fines como preparación cosmética, medicinal, ornamental y en la agricultura. En general, los aceites son ricos en hidrocarburos monoterpénicos (ocimenos, limoneno, terpineno, mirceno, entre otros) y en cetonas monoterpénicas acíclicas (tagetona, dihidrotagetona y tagetenona) que son los principales odorantes, además de cantidades menores de hidrocarburos sesquiterpénicos y oxigenados compuestos. Dentro de estos grupos, la diversidad química es bastante alta. Las únicas diferencias notables en la composición de los aceites esenciales provienen de *T. lucida* y *T. filifolia*, los que están constituidos mayormente por fenilpropanoides como metileugenol, metilchavicol y anetol (Akbar *et al.*, 2021).

Los compuestos de los aceites esenciales en las plantas, pueden variar en su composición y/o concentración de acuerdo a la región, tipo de suelo, clima y etapa fonológica (Zarate-Escobedo *et al.*, 2018a). A continuación, en el cuadro 2 se presentan algunos de los componentes más importantes de las especies más estudiadas de *Tagetes*, en reportes encontrados en las distintas bases de datos (Science Direct, PUBMED, Scielo; consultadas en julio 2021).

Cuadro 2. Compuestos terpénicos y fenilpropanoides de aceites esenciales de algunas especies de *Tagetes*.

Especie	Compuestos principales	Referencia
<i>T. lucida</i>	Acetato de geranilo	Zarate-Escobedo <i>et al.</i> , 2018b
	β -ocimeno	
	Nerolidol	
	β -cubebeno	
	Cariofileno	
<i>T. erecta</i>	β -ocimeno	Rajvanshi y Dwivedi, 2017
	α -terpinoleno	
	Trans-cariofileno	
	Z- β -ocimenona	
	DL-limoneno	
	Piperitenona	
	β -pineno	
	car-3-en-2-ona	
<i>T. filifolia</i>	Cis-anetol	Gadban <i>et al.</i> , 2020
	Estragol	
	P-anisaldehído	
	β -bisaboleno	
	Metil eugenol	
	Espatulenol	
<i>T. minuta</i>	Z- β -ocimenona	Walia <i>et al.</i> , 2020
	Dihidrotagetona	
	E-ocimenona	
	Z -tagetona	
<i>T. patula</i>	Óxido de cariofileno	Ali <i>et al.</i> , 2016
	β -cariofileno	
	Espatulenol	

El aceite esencial de las especies del género *Tagetes* tiene muchos usos en distintos sectores. Son utilizados como antioxidantes (*T. patula* y de *T. erecta*) por la gran cantidad de compuestos fenólicos (Muhammad *et al.*, 2015), producción de carotenoides para la industria alimentaria (*T. erecta*) para su uso tanto en colorantes vegetales de alimentos para humanos (huevos con yema amarilla, coloración de sopas de pasta, piel y grasa amarilla de aves y en reses), como en la elaboración de suplementos y medicamentos humanos (cápsulas de luteína) (Gupta, 2014), horticultura ornamental, agricultura orgánica como bioinsecticida, biofertilizante y fitorremediador. A partir de *T. erecta* y *T. patula*, se extrae abono orgánico para la tierra de cultivo, no sólo para mejorar la calidad del suelo, sino también para controlar nemátodos en cultivos. En asociación con otros cultivos, como el melón, funciona como barrera para atraer insectos por el colorido de las flores. *T. lunulata* y *T. patula* han mostrado efecto tanto fungicida

como bactericida, mediante la aplicación directa de extractos acuosos a cultivos agrícolas (Rincón-Enríquez *et al.*, 2012).

2.3.1. Actividad antifúngica de *Tagetes* spp.

Debido al efecto antifúngico de muchos de los componentes de los aceites esenciales de plantas, los derivados de algunas especies de *Tagetes*, muestran esta actividad contra diversas especies de hongos (Sellam *et al.*, 2015). El anetol, uno de los componentes principales de varias especies de *Tagetes*, se ha demostrado que, al combinarse con otras moléculas en el aceite esencial, produce una mayor actividad biológica que en estado puro (López-López *et al.*, 2018). En los últimos años, se ha demostrado el efecto antifúngico de los aceites esenciales de *Tagetes* spp, de los cuales se han identificado los principios activos responsables de la actividad (Cuadro 3).

Cuadro 3. Ejemplos de terpenos y fenilpropanoides con actividad antifúngica de aceites esenciales de *Tagetes* spp. (Duke, 2009).

Actividad / especie	<i>T. lucida</i>	<i>T. erecta</i>	<i>T. filifolia</i>	<i>T. minuta</i>
Efecto fungicida	1,8-Cineol Anisaldehído Cariofileno Chavicol Linalol Metil-eugenol Mirceno	1,8-Cineol	Anetol Anisaldehído Citral	1,8-Cineol Ácido acético β -Felandreno Borneol Cariofileno Ocimeno Citral Geraniol Cimeno 4-Terpinenol Terpinoleno Tiofeno Timol
Efecto fungistático	Limoneno Metil-eugenol		Limoneno	Limoneno

Se sabe que los compuestos producidos por las plantas pueden variar en función de varios factores, incluida la parte de la planta de la que se extrae, las temporadas de cosecha, la etapa de desarrollo de la planta y las fuentes geográficas, así como la especie (Burt, 2004). Hay algunas especies de *Tagetes* que comparten compuestos terpenos volátiles, mientras que otros compuestos solo se encuentran en una sola especie, es por ello la importancia de estudiar sus propiedades biológicas y relacionar éstas con el contenido de sus compuestos. Las especies con

efecto antifúngico como *T. lucida*, *T. erecta* y *T. minuta* contienen 1,8-cineol y cariofileno; el anetol y limoneno ha sido reportado para *T. lucida* y *T. filifolia*; y el citral en *T. filifolia* y *T. minuta* (Serrato y Quijano, 1993; Barajas, 2009; Duke, 2009).

Aunque por su composición química, los aceites esenciales además de su actividad antifúngica, presentan otras propiedades biológicas como bactericida, insecticida y nematocida. El aceite esencial de la parte aérea de especies como *T. erecta*, *T. filifolia*, *T. patula*, *T. minuta*, *T. pusilla* y *T. lucida*, han mostrado efectiva actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos de géneros diversos como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Sclerotium* (Céspedes *et al.*, 2006; Barajas-Pérez *et al.*, 2011; Salehi *et al.*, 2018). De las especies *T. lunulata* y *T. micrantha* no hay reportes de su efecto contra hongos fitopatógenos.

2.3.2 Mecanismos de acción de aceites esenciales de *Tagetes* spp

La actividad antifúngica de los aceites esenciales del género *Tagetes* se ha demostrado por diversos mecanismos, aunque son pocas las investigaciones que precisen esta propiedad. Debido a su alta naturaleza lipofílica y bajo peso molecular son capaces de alterar las membranas celulares provocando muerte o inhibición a la esporulación y germinación del hongo fitopatógeno. Existen cuatro mecanismos principales por los que los aceites esenciales actúan sobre estos patógenos (Nazzaro *et al.*, 2017).

Eugenol, metil-eugenol y estragol son fenilpropanoides que se encuentran presentes en numerosos aceites esenciales en particular en el género *Tagetes*, causan lesiones en la membrana fúngica como respuesta al estrés oxidativo provocando una peroxidación lipídica (LPO) mediada por la cascada de radicales libres (Khan *et al.*, 2011), el limoneno y el trans-antenol son capaces de inhibir el crecimiento fúngico al causar daños en la pared celular y la pérdida de citoplasma en hifas (Scorzoni *et al.*, 2017). El eugenol y el timol producen acidificación intracelular debido a que estos compuestos inhiben la producción de la enzima hidrógeno ATPasa provocando muerte celular (Nazzaro *et al.*, 2017), 1). Los terpenos pueden tener una función clave en la disminución del contenido mitocondrial, que pueden afectar la eficacia mitocondrial inhibiendo la acción de las deshidrogenasas mitocondriales, consecuentemente perturbando el ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) e inhibiendo la síntesis de ATP (Zeng *et al.*, 2015).

2.3.3. Ensayos antifúngicos

En diversas investigaciones se han descrito diferentes ensayos antifúngicos de los aceites esenciales del género *Tagetes* contra hongos fitopatógenos con la finalidad de determinar las concentraciones y metodologías más favorables de la inhibición del crecimiento de los hongos. Dentro de los ensayos mayormente utilizados para determinar el efecto antifúngico, están las técnicas de difusión, como la que se realiza directa en agar (métodos de hoyos) (Magaldi *et al.*, 2004) o mediante el uso de sensidiscos (técnica de difusión en disco de Kirby-Bauer) (Bauer *et al.*, 1966), y la de dilución, con la que se adiciona el aceite esencial o compuestos, directamente sobre o en el medio de cultivo.

Existen reportes con ensayos de aceites esenciales como el extraído de una población de *Tagetes lucida* realizado por López-López *et al.* (2018), en el cual se evaluó la actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial contra *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* y *Rhizoctonia solani*, utilizando el método de difusión en agar, ensayando diversas concentraciones del aceite esencial de 1% y 3%, mostrando una reducción del crecimiento micelial del 46% para *F. oxysporum*, 39% en *R. solani*, 21% en *A. niger* y 16% en *P. janthinellum*, con la concentración de 1%. Sin embargo, en concentraciones altas de aceite, como 3%, solo en *R. solani* se observó la mayor la reducción del crecimiento micelial (72%). En otra investigación, Gakuubi *et al.* (2016) evaluaron la actividad antifúngica con aceite esencial extraído por hidrodestilación *Tagetes minuta* contra los hongos fitopatógenos *Fusarium oxysporum*, *F. solani*, *Aspergillus flavus*, *A. parasiticus* y *A. niger*, utilizando el método de difusión en disco, demostrando una alta inhibición sobre el crecimiento de los estudiados, con mayor inhibición sobre *F. oxysporum* y *A. niger*.

2.4. Enfermedades fungosas en fresa

Fresa (*Fragaria x ananassa*) es una planta de tipo herbácea, en tanto el sistema radicular es fasciculado y se compone de raíces y raicillas, es pequeña, de no más de 50 cm de altura, con numerosas hojas originadas en una corona o rizoma muy corto que se encuentra a nivel del suelo y constituye la base de crecimiento de la planta. Las flores son blancas, organizadas en cimas y tienen cáliz de cinco piezas hendidas, cinco pétalos redondeados y numerosos

estambres y pistilos. El fruto proviene de la agregación de numerosos carpelos secos, pequeños, sobre un receptáculo pulposo hipertrofiado; es de color rojo, de sabor dulce y aroma distintivo. La cosecha y recolección se llevan a cabo de manera manual debido a que es altamente sensible; debe cosecharse cada tres días y manejarse con mucha cautela. En el contexto productivo, la fresa representa el 1.14% del producto interno bruto (PIB) agrícola nacional y el 2.19% de la producción de fruta; el 52.21% de la producción nacional se destina al mercado externo, por lo que la fresa es un producto exitoso en el comercio internacional. México es el tercer proveedor de fresa fresca al mercado internacional (López-Vazquez *et al.*, 2017).

En la fresa cultivada, los numerosos clones o cultivares de diferencias genéticas varían en su reacción a los agentes patógenos. A su vez, una enfermedad o alteración en una planta se debe a la interacción entre el huésped (fresa), el patógeno (hongos, virus, bacterias, nemátodos, virus), el vector y a las condiciones de desarrollo que favorecen la enfermedad, como suelos salinos, deficiencias nutricionales, exceso de humedad, sequía u otros.

Las enfermedades fungosas más importantes de la fresa son las siguientes:

- **Verticilosis:** *Verticillium alboatrum* es un hongo que sobrevive en el suelo por 8 a 12 años, produce un marchitamiento rápido de la planta en época seca, comenzando por las hojas periféricas, daño que generalmente ocurre en el primer año de la plantación. La enfermedad se observa en sectores aislados del plantel y muchas veces es confundida con falta de agua, porque en realidad es una enfermedad vascular. Al igual que en el caso anterior, es mejor prevenir (Kirschbaum *et al.*, 2017).
- **Moho gris:** *Botrytis cinerea* es un hongo que daña el fruto produciendo un ablandamiento, y cuando es muy severo, se cubre completamente con vello gris. Su desarrollo se ve favorecido con la alta humedad y bajas temperaturas, puede penetrar en el fruto sin necesidad de heridas y durante la cosecha los frutos sanos pueden ser contaminados con esporas provenientes de otros infectados. Cualquier factor que tienda a producir daños como magulladuras o exceso de manipuleo en la cosecha favorece la propagación de la enfermedad (Petrasch *et al.*, 2019).
- **Oídio:** *Sphaerotheca macularis* es un hongo muy común en áreas de gran humedad ambiental y frío. Los órganos más afectados son las hojas, cáliz de las flores y frutos. El síntoma más característico es el encorvamiento de los márgenes de las hojas hacia arriba,

acompañado de un velo blanquecino. Si el ataque es muy severo, el envés de las hojas adquiere un color rojizo. Se recomiendan aplicaciones de fungicidas sistémicos al comienzo del verano (Claire *et al.*, 2018).

Hay otros hongos que atacan el fruto después de la cosecha, como *Rhizopus* sp, *Rhizoctonia* sp, *Fusarium* sp, *Aspergillus niger*, *Sclerotinia*, *Penicillium expansum*, entre otros. La mayoría de los patógenos se pueden evitar, cosechando y almacenando a bajas temperaturas rápidamente.

La fresa es una planta con gran susceptibilidad a enfermedades por hongos debido a que se encuentra muy cerca del suelo, al tipo de sistemas de cultivo y en los suelos en los que se suele establecer se debe de tener un correcto manejo para evitar daño en el cultivo y por consecuente pérdidas económicas.

2.4.1. *Neopestalotiopsis* spp. en fresa

Neopestalotiopsis, es un hongo que corresponde a la fase anamorfa de *Pestalosphaeria* o *Neobroomella* del filo Ascomycota (Maharachchikumbura *et al.*, 2011), de la clase Sordariomycetes, orden Xylariales y a la familia Pestalotiopsidaceae, de la cual se describen alrededor de 220 especies (Senanayake *et al.*, 2015). *Neopestalotiopsis* (= *Pestalotiopsis*) se caracteriza por pertenecer a un complejo de hongos patógenos oportunistas, algunos de ellos son saprófitos y endófitos, responsable de la muerte regresiva en diversas plantas, una enfermedad que consiste en la pérdida progresiva de hojas, ramillas y tallos, causada por una infección que avanza desde el extremo distal al extremo basal o de zonas más jóvenes hacia zonas más viejas de la planta. Internamente se generan heridas que forman necrosis en haces vasculares, síntoma conocido como cancrrosis de la madera (Sánchez *et al.*, 2003; Alves *et al.*, 2005; Pérez *et al.*, 2014).

Baggio *et al.* (2021) han descrito la morfología colonial y de esporas de distintas especies de *Neopestalotiopsis* obtenidas en un brote de mancha foliar y pudrición de la fruta en la fresa de Florida. Las colonias de hongos eran blancas, circulares con márgenes ondulados y algodonosas en la superficie superior, independientemente del aislamiento. Sin embargo, en el reverso, los aislamientos de los brotes recientes (*Neopestalotiopsis* sp.) fueron de color blanco a amarillo pálido y *N. rosae* fue de lúteo pálido a naranja. Las esporas de todos los aislamientos fueron

elipsoides a fusiformes, de cinco células y versicolores con tres células de color medio. Las células basales y apicales eran hialinas, mientras que la segunda celda de la base tenía un color marrón claro, la tercera celda era marrón miel y la cuarta celda era marrón.

En los últimos años se ha reportado una nueva enfermedad en los viveros de plantas de fresa, la cual se manifiesta en la etapa del trasplante. Las plantas infectadas muestran pudrición parda de la corona interna y la raíz, causando retraso en el desarrollo, falta de crecimiento y enraizamiento deficiente. La podredumbre parda de la corona interior y la raíz a veces puede provocar el marchitamiento y el colapso de las plantas (Figura 1A). Durante la enfermedad, se han aislado hongos de la raíz y la corona sintomáticas, que, mediante análisis morfológicos y filogenéticos, se identificó a *Neopestalotiopsis clavispora* como el agente causal de la enfermedad (Park *et al.*, 2019) (Figura 1B).

En agosto de 2019, se tuvo el primer informe formal en México, de la presencia de una nueva enfermedad causante de pudrición de raíz en fresa, ya que en el verano del 2018 en el municipio de Atlixco-Puebla, las plantas de fresa 'Camino Real' mostraron un hongo poco común. Los síntomas principales son partes áreas necróticas principalmente en hojas y tallos, inicialmente las hojas mostraban decoloración en toda la superficie laminar, terminando en clorosis y necrosis en la parte central (Morales-Mora *et al.*, 2019), determinando al agente causal como una especie del género *Pestalotiopsis* sp. Rebollar *et al.* (2020) describen a ésta, como una nueva enfermedad micótica que afecta a los cultivos de fresa en la zona de Zamora y Jacona, en Michoacán, del 2017 al 2019. La enfermedad afecta en el trasplante y los factores que favorecen la presencia de esta enfermedad es la alta humedad ambiental, ellos determinaron un aislado causal de la enfermedad identificado como *Neopestalotiopsis rosae*, pero la determinación de especie aún está bajo investigación.

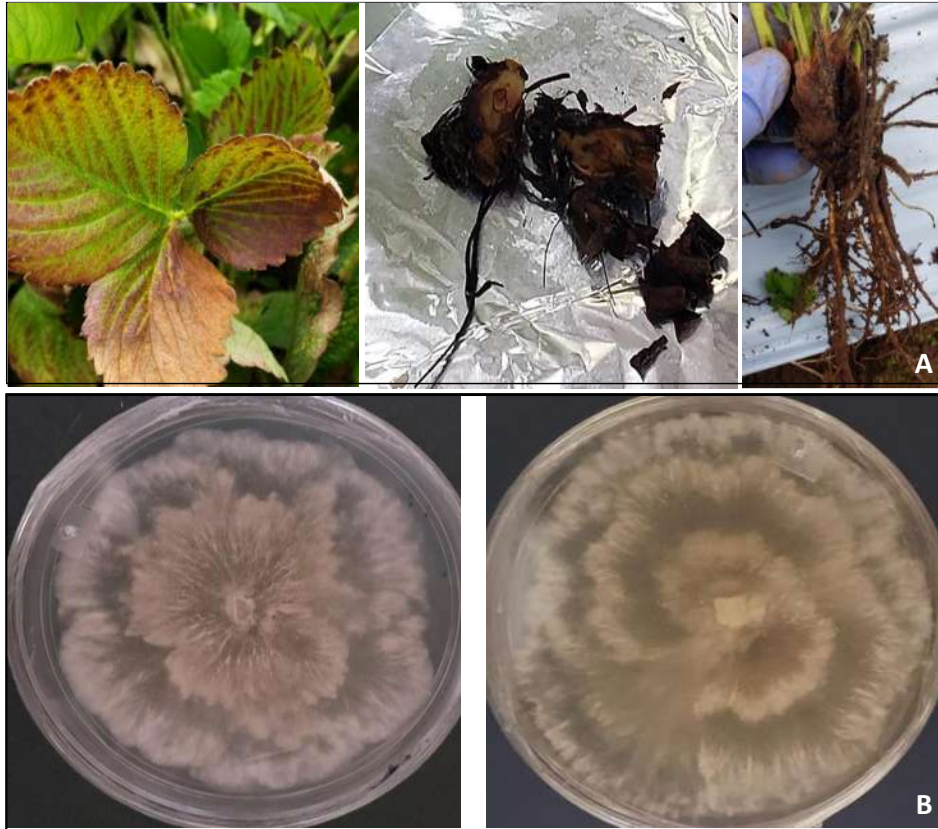


Figura 1. Identificación de *Neopestalotiopsis* spp. **A**, Plantas de fresa que presentan síntomas de la enfermedad causada por *Neopestalotiopsis* sp.; **B**, crecimiento de micelio *in vitro* de *Neopestalotiopsis* sp. (Fotografías propias).

2.5. Plantas en estudio (*Tagetes* spp)

El género *Tagetes* es un género americano que incluye cerca de 50-55 especies, con distribución comprendida desde el suroeste de Estados Unidos hasta Argentina. El género está representado por plantas aromáticas, herbáceas anuales o perennes y subarbustos; con hojas opuestas en la base de la planta y alternas en la porción superior, simples, pinnadas o Pinnatisectas (Anaya-Gutiérrez *et al.* 2022). Pertenecen a la división Tracheophyta, clase Magnoliopsida, orden Asterales, familia de las Asteraceae (IBUNAM 2012). Los pigmentos en las flores y los metabolitos secundarios sintetizados en los órganos vegetativos en la mayoría de las especies de *Tagetes* les han conferido importancia en la industria agrícola, alimenticia, cosmética y medicinal, entre otras. En este sentido las investigaciones sobre *Tagetes* se han dirigido principalmente a la caracterización de sus compuestos químicos debido a la actividad biológica sobre varios organismos patógenos (Tereschuk *et al.*, 1997; Dharmagadda *et al.*, 2005;

Romagnoli *et al.*, 2005; Céspedes *et al.*, 2006; Pérez-Gutiérrez *et al.*, 2006; Serrato-Cruz *et al.*, 2008; Barajas-Pérez *et al.*, 2011). En la presente investigación se utilizaron tres especies: *T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*.

2.5.1. *Tagetes lucida* Cavanilles. Icon. [Cavanilles] 3(2): 33, t. 264

Esta especie es conocida de forma común como pericón, hierbanís, jericón, pericón vomol y Santa María. Es herbácea perenne, aunque su crecimiento y floración es en los meses de julio a octubre en la región central de México. Puede llegar a alcanzar ochenta centímetros de altura y cuarenta centímetros de anchura, sus flores son de color oro con toques ámbar y marrón, dotadas de unidades reproductivas hermafroditas (Pérez, 2013) (Figura 2A). En nuestro país se distribuye en Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Guerrero, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, San Luís Potosí, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz y Zacatecas (Villaseñor y Espinosa, 1998). Tiene usos medicinales, ornamentales, el humo de la planta al quemarse se usa para ahuyentar mosquitos, se utiliza como insecticida (Linares *et al.*, 1999; Márquez *et al.*, 1999).

El efecto biológico de algunos de los compuestos mayoritarios del aceite esencial de *T. lucida* se encuentra documentado en diversas publicaciones, donde describen propiedades antiinflamatorias, antibióticas, antioxidantes, induce resistencia a patógenos y es importante en la protección de plantas aromáticas contra insectos plaga (Adorjan y Buchbauer, 2010).

2.5.2. *Tagetes lunulata* Ortega. Nov. Rar. Pl. Descr. Dec. 44. (1797)

Es una planta herbácea y anual de hasta 80 cm de altura, se le conoce como cinco llagas o cocoyatón. Las flores, como en todas las plantas pertenecientes a la familia de las compuestas, son sésiles dispuestas en un receptáculo formando cabezuelas; estas cuentan con 5 lígulas de color amarillo o naranja con una marca roja o anaranjada en el centro en forma de V o W, que define el epíteto *lunulata* (= en forma de media luna) (Figura 2B) (Calderón y Rzedowski, 2010). Posee un fuerte aroma al estrujar las hojas, el cual es el típico aroma característico del compasúchil comercial (*T. erecta*) (Pérez, 2013). Se reporta como maleza en Aguascalientes, Ciudad de México, Durango, Guanajuato, Hidalgo, Jalisco, Estado de México, Michoacán,

Morelos, Querétaro, Tlaxcala y Zacatecas (Villaseñor y Espinosa, 1998). Es usada como medicinal, anticonceptivo y ornamental; a veces se cultiva (Heike, 2009).

No hay trabajos previos sobre la actividad biológica de *T. lunulata*, sin embargo, los compuestos presentes en el aceite esencial han sido reportados en otras especies vegetales demostrando actividad antimicrobiana (Fraternale y Ricci, 2018).

2.5.3. *Tagetes micrantha* Cavanilles. *Icon. [Cavanilles] 4(1): 31, t. 352 (1797)*

Es de hábito anual, que puede llegar a alcanzar veinte centímetros de altura y es conocida de forma común como anís, anís de campo, anís del suelo, temolillo. La especie se reconoce fácilmente por su baja estatura, olor a anís y pedúnculos largos con cabezuelas con 1-2 flores liguladas blancas (Figura 2C). Se encuentra distribuida en regiones templadas y semiáridas de México como Baja California, Baja California Sur, Sonora, Chihuahua, Coahuila, Durango, Zacatecas, Aguascalientes, San Luís Potosí, Guanajuato, Querétaro, Hidalgo, Nayarit, Jalisco, Michoacán, México, Morelos, Distrito Federal, Puebla, Tlaxcala y Veracruz. Es una planta medicinal popular, tomado en infusiones contra dolor de estómago o para resfriados, también se usa como condimento (Villarreal, 2003).

La actividad biológica de *T. micrantha* no ha sido demostrada, sin embargo, haciendo una comparativa con la especie que presenta la mayor similitud en la composición química de sus aceites esenciales *T. filifolia*, la cual presenta actividad insecticida y microbicida (Camarillo *et al.*, 2009).



Figura 2. Plantas en estudio en etapa de floración. **A**, *Tagetes lucida*; **B**, *T. lunulata*; **C**, *T. micrantha* (Fotografías propias).

3. JUSTIFICACIÓN

El uso de agroquímicos sintéticos para el control de enfermedades en la agricultura convencional y el desgaste de suelos derivados del uso continuo de éste, han derivado a que surjan enfermedades emergentes que han representado grandes pérdidas económicas para el sector agrario. Tal es el caso de fresa (*Fragaria × ananassa*), uno de los cultivos más importantes de nuestro país por el valor de sus exportaciones, que en los últimos años ha presentado una enfermedad micótica, la cual ha representado la pérdida de más del 50% durante el trasplante de plántulas, determinando que *Neopestalotiopsis* sp. es el hongo responsable de la enfermedad.

Una alternativa para su control, es el uso de extractos o compuestos antifúngicos derivados de plantas y algunas especies del género *Tagetes* como *T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*, que son abundantes en el territorio nacional, presentan compuestos que han demostrado ser efectivos contra otros hongos causantes de enfermedades, en cultivos bajo condiciones *in vitro*, invernadero y de cielo abierto. El estudiar los extractos de estas especies de *Tagetes* como fuente de compuestos antifúngicos, contra *Neopestalotiopsis* sp. en fresa, generará el conocimiento básico para proponer el control efectivo de la enfermedad.

4. HIPÓTESIS

La actividad antifúngica sobre el hongo *Neopestalotiopsis* sp. causante de la mancha foliar y pudrición en fresa, es dependiente de los compuestos activos del aceite esencial de cada especie de *Tagetes* en estudio.

5. OBJETIVOS

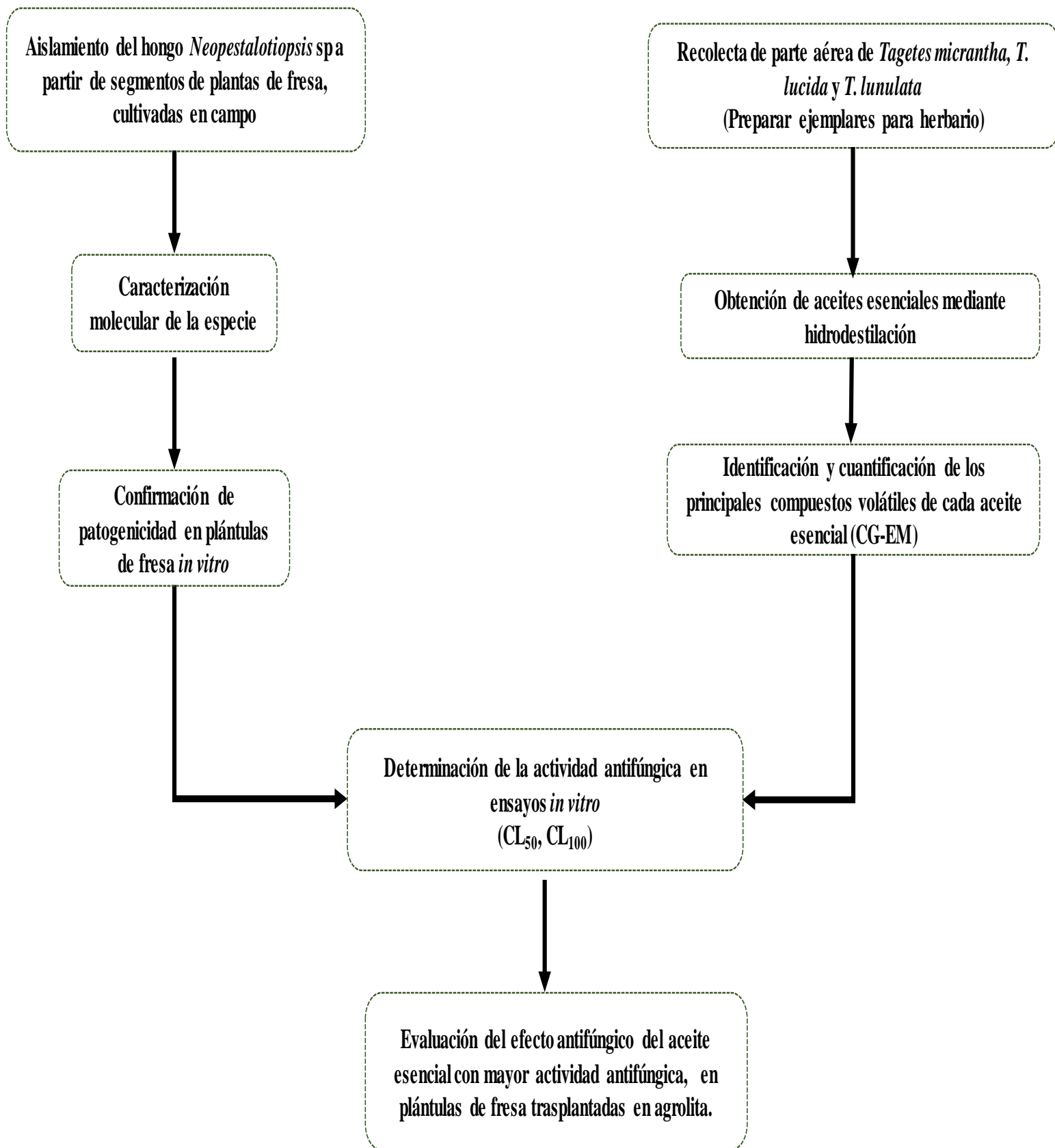
5.1. Objetivo general

Determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de tres especies de *Tagetes* (*T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*), contra *Neopestalotiopsis* sp. causante de la mancha foliar y pudrición en fresa.

5.1.1. Objetivos específicos

1. Identificar la especie de *Neopestalotiopsis* sp. del aislado de plantas de fresa, utilizado en los ensayos *in vitro* y confirmar su patogenicidad en plántulas de fresas *in vitro*.
2. Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del aceite esencial de tres especies de *Tagetes* (*T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*) sobre *Neopestalotiopsis* sp.
3. Identificar y cuantificar los compuestos volátiles de cada aceite esencial de *Tagetes*, para determinar los principales compuestos bioactivos.
4. Evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de la especie de *Tagetes* con mayor actividad antifúngica *in vitro*, en plántulas de fresa inoculadas con *Neopestalotiopsis* sp.

6. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL



7. RESULTADOS

7.1. CAPÍTULO 1. Aislamiento y caracterización del hongo fitopatógeno *Neopestalotiopsis* sp. de plantas de fresa (*Fragaria x ananassa*) Cv. Albión

Resumen

Para el aislamiento, identificación y caracterización molecular del hongo fitopatógeno *Neopestalotiopsis* sp. se tomaron 15 segmentos de raíz y corona de plantas de fresa (*Fragaria x ananassa*) Cv. Albión previamente desinfectados, obteniendo 40 aislados preliminares en medio Papa Dextrosa Agar (PDA) con antibióticos (0.1 g/L de Estreptomicina y 0.25 g/L de Ampicilina) e incubados a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) en oscuridad. Después de 10 días de incubación se analizó la morfología colonial y microscópica de cada aislamiento, observando coincidencia morfológica típica de uno de los aislados, ya que presentó micelio de color blanco algodonoso con crecimiento ondulatorio, después de 15 días de crecimiento, el reverso de la colonia se tornó de color amarillo claro, intensificándose después de 10 días de crecimiento. A los 20 días desde el aislamiento, se formaron conidios de color negro sobre el micelio, conteniendo macroconidios que presentaron cinco celdas donde la basal y la apical son hialinas y las tres celdas medias de diferentes tonos de café. Además, los conidios presentan tres apéndices apicales hialinos. Para la identificación se realizó la amplificación y secuenciación de dos regiones genéticas ITS (ITS1, ITS4) y mediante el análisis BLAST se obtuvo una identidad del 100 % con *Neopestalotiopsis clavispora* en el NCBI GenBank. Con el fin de corroborar la patogenicidad de este hongo, se realizaron ensayos con la inoculación de esporas en plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Cv. Aromas) *in vitro*, aplicando dos volúmenes (10 μ L y 25 μ L) de una suspensión de esporas (1×10^3 esporas/mL) en el centro de la corona en plantas completas. Como control negativo se inoculó un volumen igual de agua destilada estéril. Desde las 36 horas, se observó la presencia de micelio en el sitio de la inoculación y la aparición de manchas en los bordes de las hojas de color café-óxido y principios de necrosis en la corona y raíces. Con el inóculo de 25 μ L, los síntomas de la enfermedad causada por *Neopestalotiopsis* fueron mayores, presentándose índices más altos de necrosis en la corona y en los peciolo, así como manchas más claras en los bordes de las hojas. No se observaron cambios en las plantas de fresa no inoculadas. Estos resultados confirman el género y especie (*N. clavispora*) del aislado de plantas de fresa, el cual tiene la capacidad de infectar plántulas de fresa.

Palabras clave: Caracterización molecular, fresa, hongo, *Neopestalotiopsis*, patogenicidad.

Introducción

El nombre de este género de hongos (*Neopestalotiopsis*) proviene de otros previamente clasificados como *Pestalotia* y *Pestalotiopsis*, cuyos nombres fueron dedicados al médico y botánico italiano Fortunato Pestalozza desde 1839. Fue llamado así por su similitud morfológica con *Pestalotiopsis*, el primer reporte de identificación del patógeno en el cultivo de fresa se realizó en España por Chamorro (2016).

Seis reportes adicionales fueron documentados en Bélgica, Bangladés, Italia, Uruguay, Argentina y México a partir del año 2017 hasta el 2019. Existen gran variedad de fenotipos en este género fúngico, por lo que se debe recurrir a la similitud morfológica para identificarlos (Maharachchikumbura *et al.*, 2011).

Una estructura diferencial de este género son sus macroconidios, los cuales tienen cinco celdas de diferentes tonos de café, además de tener apéndices apicales, estas estructuras permiten la fácil diseminación e infección. Presenta estructuras protectoras para los conidios denominadas conidiomas las cuales son unas esferas cafés oscuro a negras que se encuentran por encima del crecimiento del micelio (Agrios, 2005). De forma general, el género *Neopestalotiopsis* tiene conidios cilíndricos que miden alrededor de 22 a 30 micrómetros (μm) con una leve curvatura en los extremos.

En México, particularmente en los últimos años se ha reportado esta enfermedad en los viveros de plantas de fresa, especialmente en la etapa del trasplante, y durante la enfermedad, se han aislado hongos de la raíz y la corona sintomáticas, que, mediante análisis morfológicos y filogenéticos, se identificó a *N. clavispora* como el agente causal (Park *et al.*, 2019). Desde el 2019 se tuvo el primer informe formal en México, en plantas de fresa 'Camino Real' determinando inicialmente a *Pestalotiopsis* sp., como al agente causal que posteriormente fue identificado como *N. rosae* (Rebollar *et al.*, 2020).

Es por ello, la importancia de realizar aislados de plantas de fresa con síntomas de la enfermedad para mediante estudios macro y microscópicos, así como por herramientas moleculares, caracterizar la especie y determinar su patogenicidad en plántulas de fresa, durante el trasplante.

Materiales y métodos

Aislamiento del hongo fitopatógeno *Neopestalotiopsis* sp.

La recolecta de plantas de fresa con sintomatología fúngica se realizó en invernaderos de Guarachanillo, municipio de Zamora, Michoacán (19°50'28.5'N – 102°23'01.10), en el mes de junio de 2021 (Figura 3A) y se mantienen a 4 °C. Los síntomas que describen la enfermedad causada por este hongo, son la aparición de manchas foliares el secado del borde de las hojas jóvenes, el cual avanza hasta la mitad del área de las mismas (Figura 3B). Después, se visualizan estos síntomas en las hojas viejas y si las condiciones ambientales favorecen el desarrollo de la enfermedad, la planta se marchita y muere. Las plantas que están severamente infectadas presentan hojas y flores completamente secas y raíces negras. Los síntomas en la corona consisten en la decoloración o áreas marrones necróticas tanto en la corona como en la raíz (Figura 3C).



Figura 3. Producción de planta de fresa. **A**, Invernadero en Guarachanillo, Zamora, Mich.; **B**, Planta de fresa infectada por *Neopestalotiopsis* sp.; **C**, Corona de fresa con necrosis.

Para el aislamiento, se tomaron fragmentos de raíz y corona previamente desinfectados empleando el protocolo de desinfección descrito por Chauhan *et al.* (2019), que consiste en cortar segmentos de material vegetal de 1 cm de longitud, los que se colocan en medio papa-dextrosa-agar (PDA) con antibióticos (0.1g/L de estreptomina y 0.25g/L de ampicilina), incubándolos a 25 °C hasta la formación de conidios. Existen gran variedad de fenotipos en este género fúngico, por lo que se debe recurrir a la similitud morfológica en los conidios tanto para agrupar al género como subdividirlo por especies. La agrupación por especies se basa en el largo y ancho de conidios, número de septos, color de septos, número y largo de flagelos (Maharachchikumbura *et al.*, 2011). Presenta estructuras protectoras para los conidios denominadas conidiomas (Agrios, 2005).

El tipo de conidioma en este género puede ser variable dependiendo de la especie desde un acérvulo hacia un picnidio reconocible a simple vista como puntos de color café oscuro a negro (Maharachchikumbura *et al.*, 2011). De forma general, el género *Neopestalotiopsis* tiene conidios cilíndricos que miden alrededor de 22 a 30 micrómetros (μm) con una leve curvatura en los extremos.

Extracción de ADN genómico, amplificación y secuenciación por PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de *Neopestalotiopsis* sp.

El aislado de *Neopestalotiopsis* sp. obtenido de plantas de fresa se cultivó en medio Caldo Papa Dextrosa en cámara de incubación con agitación durante 8 días a $25 \pm 2^\circ\text{C}$, después se filtra el micelio en papel filtro y se lava con agua destilada estéril libre de nucleasas para eliminar el exceso de caldo de cultivo, se conserva en congelación a -20°C .

El ADN genómico total se extrajo utilizando el método descrito por Kuramae-Izioka (2008), se pulverizaron 100 mg de micelio en mortero con nitrógeno líquido para evitar la descongelación. El micelio pulverizado se transfirió en tubos eppendorf de 1.5 ml (manteniéndolos sumergidos en nitrógeno líquido para evitar descongelación), el cual se resuspendió con 600 μL de solución buffer de extracción (Tris pH 8.0 100 mM, EDTA pH 8.0 50 mM, NaCl 500 mM, β -mercaptoethanol 10 mM, SDS 1%) y 6 μL de β -mercaptoethanol 10 mM, incubando 30 min a 65°C . Se le agregó medio volumen de acetato de potasio 5 M (300 μL), mezclando gentilmente

y se incubó en hielo durante 30 min. Posteriormente, se llevó a centrifugación a 10,000 gravedades por 10 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL estéril. Se añadió un volumen igual (600 µL) de cloroformo-isoamílico (25:1) y se mezcló perfectamente. De nuevo, se llevó a centrifugación a 10,000 gravedades por 10 min a 4 °C y se transfirió el sobrenadante a un tubo de 1.5 mL estéril. Se agregó un volumen igual (600 µL) de isopropanol para precipitar el ADN y se centrifugó a 10,000 gravedades por 10 min a 4 °C, para descartar el sobrenadante, conservando el precipitado, el cual se lavó con 1000 µL de etanol. Finalmente, se centrifugó a 7500 gravedades por 5 min y se retiró el sobrenadante, para resuspender la pastilla en 30 µL con agua libre de nucleasas, a la cual se le añadieron 2 µL de RNasa (libre de DNasas) (40 µg/mL) e incubando por 45 min a 37 °C.

Las regiones del gen espaciador transcrito interno (ITS) del ADN genómico total se amplificaron mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) utilizando los pares de cebadores ITS. La mezcla de PCR estuvo compuesta por 17.45 µL de agua libre de nucleasas, 2.5 µL de buffer (Tris-HCl 200 Mm, Ph 8.4; KCl 500Mm), 0.75 µL Cloruro de magnesio 50 mM, 1 µL de cada uno de los cebadores (ITS-D y ITS-R) 10ppm/v, 1µL dNTP's 2.5 mM, 1 µL DNA fúngico, 0.3 Taq Polimerasa 5 U/µL. La reacción en cadena de la polimerasa se realizó con las siguientes condiciones descritas en el cuadro 4, en el termociclador:

Cuadro 4. Condiciones térmicas de PCR para cebadores ITS, para la caracterización del hongo aislado de fresa.

Nº de ciclo	Paso	Temperatura	Tiempo
1	Desnaturalización inicial	94 °C	2 min
	Desnaturalización	94 °C	30 s
30	Alineación	60 °C	45 min
	Extensión	72 °C	30 s
1	Elongación final	72 °C	10 min

Pruebas *in vitro* de patogenicidad

Las pruebas de patogenicidad de *Neopestalotiopsis* sp. se realizaron en plántulas de fresa micropropagadas en medio de Murashige y Skoog (1962) sin reguladores de crecimiento de 28 días de cultivo. Éstas fueron trasplantadas en agar agua (10 g/L, pH 5.7) manteniendo condiciones de asepsia *in vitro*, en las que se inoculó una suspensión de esporas con una concentración de 1×10^3 esporas/mL en agua destilada estéril, en plántulas completas y en segmentos de corona con 10 μ L y 25 μ L, las que se mantuvieron bajo condiciones no controladas de luz y temperatura (laboratorio). Los síntomas causados por el hongo, se observaron a los 7 días después de la inoculación.

Resultados y discusión

Aislamiento del hongo fitopatógeno *Neopestalotiopsis* sp.

Se tomaron 15 segmentos de plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Cv. Albión) con sintomatología fúngica (Figura 4A y 4B) y de éstos se obtuvieron 40 aislados preliminares de hongos (Figura 4C), mediante microcultivo (Figura 4D) se observaron estructuras fúngicas completas con las que se confirmaron características del género *Neopestalotiopsis*, mediante examinación morfológica (Figura 4E). Rebollar *et al.* (2020) describe la morfología colonial y pigmentación de *Neopestalotiopsis rosae* obtenida de segmentos de planta de fresa en el Valle de Zamora, Mich., con un micelio de color blanco algodonoso y color crema-rosado en el envés, con formación de conidios a los 10 días después de la siembra (25 °C).

La morfología microscópica la describe con hifas hialinas septadas, los primeros acérvulos hialinos/amarillos, volviéndose negros con la edad, con la presencia de macroconidios con cinco celdas, de las cuales, la basal y la apical son hialinas, la segunda celda basal es de color marrón claro, la tercera celda es de color marrón oscuro y la cuarta celda es de color marrón oscuro, los conidios también presentan 3-4 apéndices apicales.

Para la identificación, se obtuvieron cepas tipo de *Neopestalotiopsis* del departamento de sanidad vegetal de vivero de fresa de la empresa Driscoll's[®] con la finalidad de realizar comparaciones macro y microscópicas de los aislados obtenidos de los segmentos de fresa. La morfología de estas cepas tipo, muestra una de tipo colonial con micelio denso, circular, margen

rugoso blanco, después de dos semanas, plano o derramado en la superficie, sin micelio aéreo y color amarillo en el envés (Figura 5A), presencia de macroconidios con cinco celdas (Figura 5B) y con formación de conidiomas negros después de 20 días de la siembra en PDA (25 ± 2 °C) (Figura 5C).

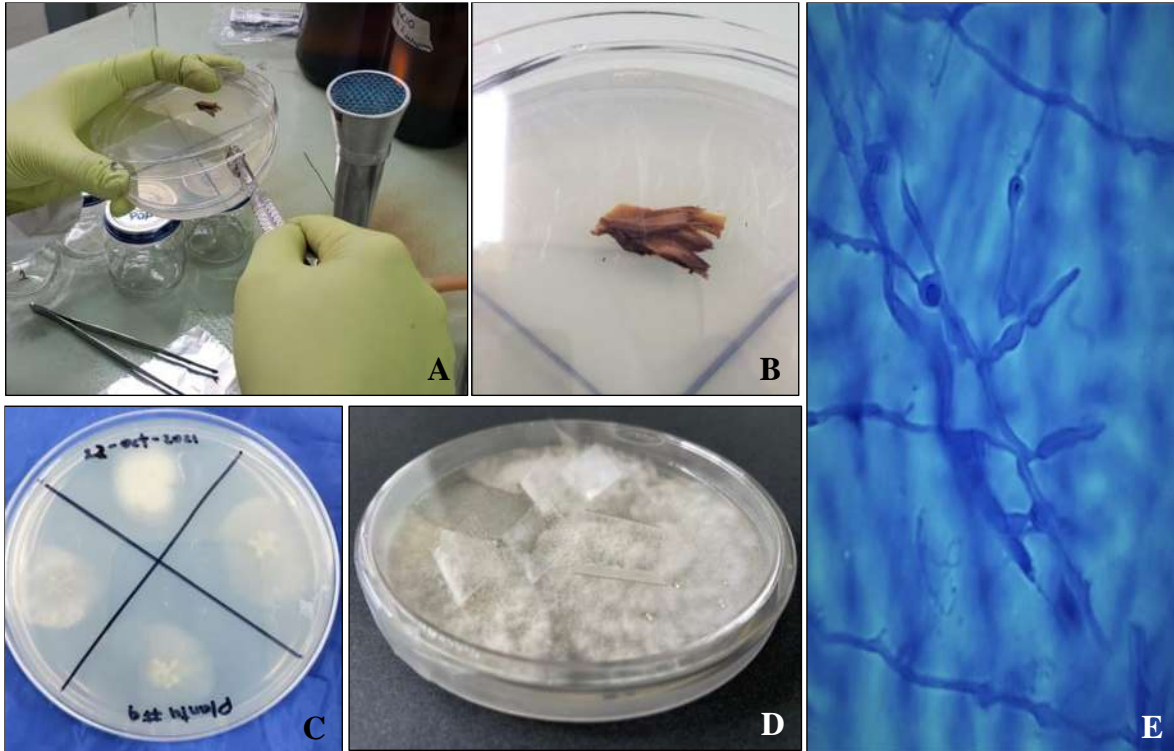


Figura 4. Identificación fúngica por el método de siembra directa en agar PDA con antibióticos. **A** y **B**, Siembra directa de segmento de planta. **C**, Primer aislamiento. **D**, Microcultivo. **E**, Microscopía óptica, tinción con azul de fenol 40x.

Con el análisis de la morfología microscópica del aislado en la presente investigación, se observaron hifas de color amarillo claro, septadas cenocíticas, macroconidios de $2 \mu\text{m}$, con cinco celdas, de las cuales, la basal y la apical son hialinas, la segunda celda basal de color marrón claro, la tercera celda de color marrón miel y la cuarta celda de color marrón oscuro. Los conidios también presentaron apéndices apicales. De los 40 aislados preliminares, solo uno de ellos mostró características morfológicas macroscópicas y microscópicas típicas de lo descrito por otros autores y al compararla con la cepa tipo.

El micelio es de color blanco algodónoso con crecimiento ondulatorio, después de 15 días de crecimiento, el reverso de la colonia se torna de un color amarillo claro, intensificándose al pasar el tiempo (Figura 5d), después de 10 días de crecimiento en medio PDA a temperatura ambiente (25 ± 2 °C) en la obscuridad se formaron los conidiomas por encima del micelio, los cuales son unas pequeñas esferas de color negro (Figura 5F) en donde se encuentran los macroconidios, estos presentan cinco celdas donde la basal y la apical son hialinas y las tres celdas medias de diferentes tonos de café, además los conidios presentan tres apéndices apicales hialinos (Figura 5E).

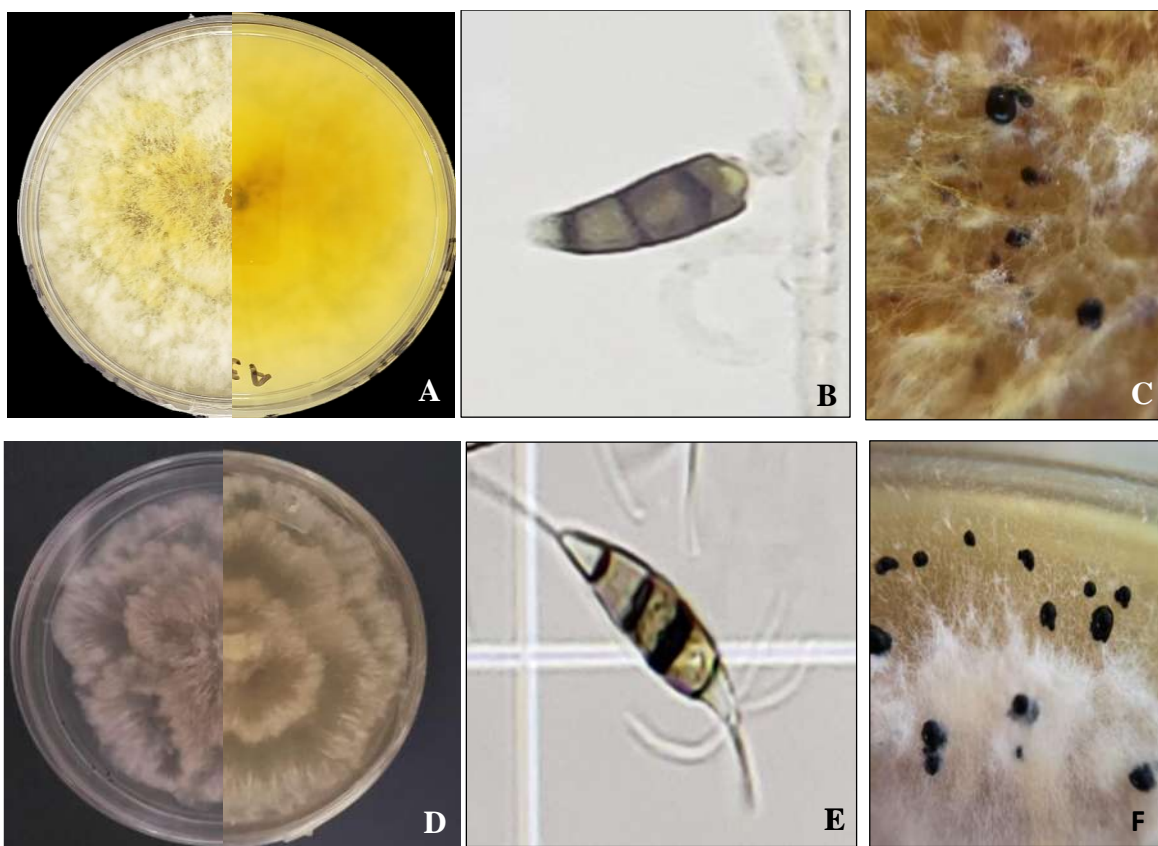


Figura 5. Cepa tipo de *Neopestalotiopsis* spp. **A**, Morfología macroscópica; **B**, Macroconidio 40x; **C**, Conidiomas. *Neopestalotiopsis* sp. aislado de segmentos de plantas de fresa. **D**, Morfología macroscópica; **E**, Macroconidio 40x; **F**, Conidiomas.

Neopestalotiopsis sp. es un problema nuevo de enfermedades fúngicas en el cultivo de fresa, ya que antes solamente era considerado como un hongo oportunista y saprófito; no obstante, desde

hace unos años se ha encontrado atacando fuertemente a cultivos de fresa y otras frutillas, por lo que su aislamiento, identificación y caracterización es de gran importancia, sobre todo para realizar estudios que inhiban su crecimiento con la aplicación de aceites esenciales de plantas, como los de *Tagetes* spp. (Baggio *et al.*, 2021).

Extracción de ADN genómico, amplificación y secuenciación por PCR de *Neopetalotiopsis* sp

La identificación se realizó mediante amplificación y secuenciación de dos regiones genéticas ITS (ITS1, ITS4) (Figura 6) (White *et al.* 1990) (número de acceso de GenBank—aún no registrado--) El análisis BLAST mostró una identidad del 100 % con *Neopetalotiopsis clavisporea* en NCBI GenBank (Cuadro 5).

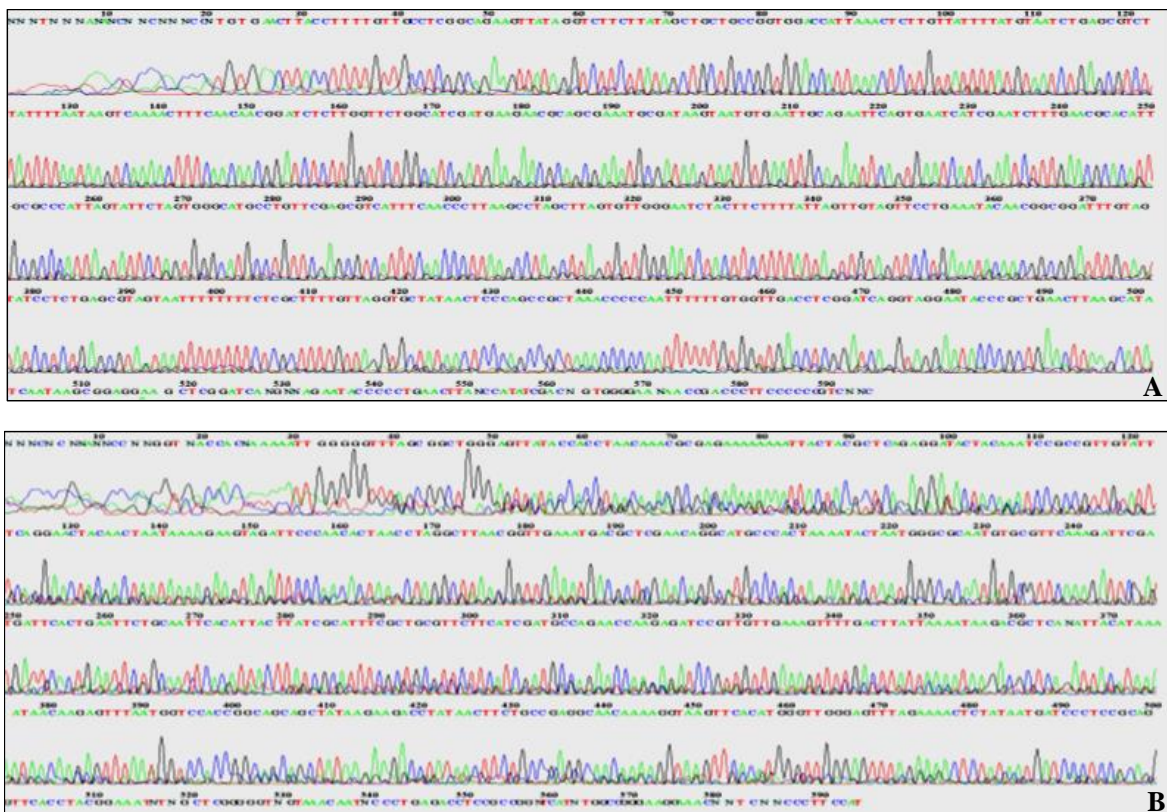


Figura 6. Electroferogramas. **A**, Secuencia de la región ITS1 de RNA ribosomal; **B**, Secuencia de la región ITS4 de RNA ribosomal.

Chamorro *et al.* (2016) publicaron el primer reporte de pudrición de raíz y corona de fresa causado por *N. clavisporea* en la región de Huelva, España donde fue aislado y caracterizado.

La identificación como *N. clavispora* fue confirmada por amplificación y secuenciación de tres regiones genéticas: ITS [(ITS1, 5.8S, ITS2) (número de acceso de Gen Bank KU096879), β -tubulina (KU096880) y el gen *tefl* (KU096881) con una identidad del 98 a 99 % de tres aislamientos. Este mismo patógeno ha sido reportado en arándano en Chile (Espinoza *et al.*, 2008) y en Uruguay (González *et al.*, 2012).

Cuadro 5. Resultado del análisis BLAST de las secuencias de nucleótidos obtenidos por PCR en NCBI GenBank.

Descripción	Cobertura	Identidad
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i> isolate WH81	97%	100%
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i> isolate WH79	97%	100%
<i>Neopestalotiopsis clavispora</i> isolate WH54	97%	100%
<i>Neopestalotiopsis rosae</i> isolate JZB340068	97%	99.64%
<i>Neopestalotiopsis foedans</i> isolate DMW1050	97%	99.46%
<i>Pestalotiopsis microspora</i> isolate WH109_	97%	99.27%

La exportación de plantas de fresa para la producción de este cultivo ha originado la diseminación de enfermedades a diversas regiones del mundo. Los hongos fitopatógenos son de fácil adaptabilidad a nuevas condiciones ecológicas, sumando el deterioro de la rizosfera provocada por un mal manejo de plagas y enfermedades (Xie *et al.*, 2020). Por lo que el aislado del hongo causante de pudrición de raíz y corona de las plantas de fresa obtenidas en este trabajo corresponde a *N. clavispora*, la importancia de la identificación molecular de las especies patógenas permite identificar el origen, patogenicidad y características y así proponer medidas de control para proteger a los cultivos.

Pruebas *in vitro* de patogenicidad

El grado de infección de las pruebas de patogenicidad de *N. clavispora* sobre plántulas de fresa (*Fragaria x ananassa* Cv. Aromas) cultivadas *in vitro* después de siete días de la inoculación, mostró diferencias entre dos volúmenes utilizados para la inoculación (10 y 25 μ L). Los

controles de los tratamientos no mostraron sintomatología de la enfermedad (Figura 7A y 7B). Con el inóculo de 10 μ L de suspensión de esporas, las plántulas completas presentaron crecimiento del micelio y la presencia de manchas en los bordes de las hojas de color café-óxido y poca afección en coronas y raíces (Figura 7C), en la corona de fresa inoculada con 10 μ L de la suspensión, se presentó crecimiento del micelio y principios de necrosis de corona y raíz (Figura 7D). En el caso de los ensayos con 25 μ L de inóculo, las afecciones fueron mayores, presentándose un daño mayor en la corona y peciolo de la plántula completa (Figura 7E), así como manchas en los bordes de las hojas y en la corona se observó necrosis de los tejidos (Figura 7F).

Las lesiones presentadas en las plántulas de fresa en este ensayo corresponden con lo descrito para la enfermedad fúngica, marchitez de hojas con coloración café-óxido, lesiones necróticas de corona y raíz (Chamorro *et al.*, 2016; Sigillo *et al.*, 2020). El patógeno se re-aisló para confirmar el postulado de Koch, demostrando que *N. clavispora* fue el responsable de la mancha foliar y pudrición en fresa como se informó por primera vez en España (Chamorro *et al.*, 2016). La patogenicidad de esta especie es debida a sus estructuras de resistencia y a la producción de metabolitos fitotóxicos como la afritoxinona B, afritoxinona A y oxisporona (Xie *et al.*, 2020).

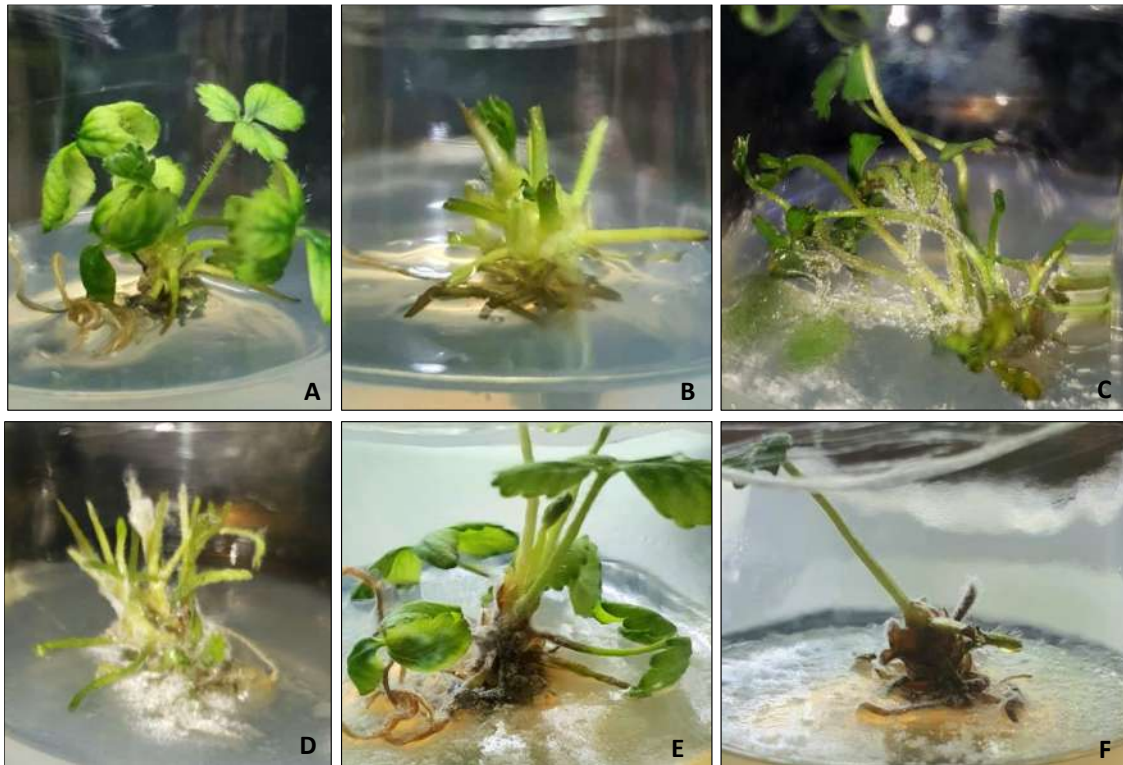


Figura 7. Pruebas de patogenicidad de *Neopestalotiopsis clavispora* en plántulas y coronas de fresa después de 7 días de incubación. **A**, Plántula de fresa control; **B**, Corona de fresa control; **C**, Plántula de fresa inoculada con 10 µL de suspensión; **D**, Corona de fresa inoculada con 10 µL de suspensión de esporas; **E**, Plántula de fresa inoculada con 25 µL de suspensión; **F**, Corona de fresa inoculada con 25 µL de suspensión de esporas.

Conclusión

El aislado obtenido de segmentos de planta de fresa que presentaron sintomatología propia de la enfermedad corresponde de acuerdo a la morfología macroscópica y microscópica para el género *Neopestalotiopsis*, obteniendo como resultado de la caracterización molecular, la especie *N. clavispora*, confirmando su patogenicidad en plántulas de fresa.

Estos resultados confirman el género y especie (*N. clavispora*) del aislado de plantas de fresa, el cual tiene la capacidad de infectar plántulas de fresa.

Referencias

Agrios G. (2005). Plant Pathology. University of Florida, Plant Pathology. Florida: Elsevier.

Akbar B.R., Hosur N.V., Devihalli Ch.M. (2021). Chemical Characterization of *Schefflera actinophylla* (Endl.) Harms Essential Oil: Antifungal and Antimycotoxin Activities for

Safe Storage of Food Grains. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 11(1): 60-69.

- Baggio S.J., Forcelini B.B., Wang N., Ruschel G.R., Mertely C.J., Peres A.N. (2021).** Outbreak of Leaf Spot and Fruit Rot in Florida Strawberry Caused by *Neopestalotiopsis* spp. *Plant Disease*, 105(2): 305-315.
- Chamorro M., Aguado A., de los Santos B. (2016).** First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. *Plant Disease*, 100(7): 1495.
- Chauhan N.M., Gutama A.D., Aysa A. (2019).** Endophytic fungal diversity isolated from different agro-ecosystem of Enset (*Ensete ventericosum*) in Gedeo zone, SNNPRS, Ethiopia. *BMC Microbiol.*, 19: 172.
- Kuramae-Izioka E.E. (2008).** A rapid, easy and high yield protocol for total genomic DNA isolation of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum*. *Revista UNIMAR*, 19: 683-689.
- Maharachchikumbura S., Guo L., Chukeatirote E., Bahkali A., Hyde K. (2011).** *Pestalotiopsis* – morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*, 50: 167-187.
- Murashige T. y Skoog F. (1962).** A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plantarum*, 15: 473-497.
- Park K., Han I., Lee S.-M., Choi S.-L., Kim M.C., Lee H. (2019).** Crown and Root Rot of Strawberry Caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 47 (4): 427–435.
- Rebollar A.A., Silva R.H.V., Fuentes A.D., Acosta G.U., Martínez R.M., Parra R.B.E. (2020).** An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. *APS Publications*, 104(8): 2054-2059.
- Sigillo L., Ruocco M., Gualtieri L., Pane C., Zaccardelli M. (2020).** First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing crown rot in strawberry in Italy. *J. Plant Pathol.*, 102: 281. <https://doi.org/10.1007/s42161-019-00415-2>
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylor J. (1990).** Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: InnisMA, Gelfand DH, Sninsky JJ, White TJ (eds) *PCR protocols-a guide to methods and applications*. Academic Press, San Diego, pp 315–32
- Xie J., Wei J.G., Wang K.W., Luo J., Wu Y.J., Luo J.T., Yang X.H., Yang X.B. (2020).** Three phytotoxins produced by *Neopestalotiopsis clavispora*, the causal agent of ring spot on *Kadsura coccinea*. *Microbiological Research*, 238:126531.

7.2. CAPÍTULO 2. Efecto antifúngico sobre *Neopestalotiopsis clavispora* y perfil químico de los aceites esenciales de tres especies de *Tagetes* (*T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*)

Resumen

Para la determinación del efecto antifúngico de los aceites esenciales de tres especies de *Tagetes* (*T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*), estos se obtuvieron mediante hidrodestilación en un equipo tipo Clevenger, a partir de la parte aérea (tallos, hojas y flores). La actividad antifúngica se realizó por el método de difusión en pozos, utilizando cajas Petri con medio papa-dextrosa-agar (PDA). En cada pozo se vertieron 50 μ L de cada uno de los aceites esenciales, resuspendidos en dimetilsulfóxido (DMSO, 1%) a una concentración de 10 mg/mL, realizando los ensayos con discos de micelio de 0.5 cm de diámetro del hongo en estudio (*Neopestalotiopsis clavispora*), cultivado previamente por 8 días en medio PDA. Como control positivo se empleó el fungicida comercial Captan[®] (2.0 mg/mL) y como control negativo la solución vehículo DMSO 1%. Los resultados se reportan como porcentaje de inhibición, determinando el crecimiento micelial (mm) a los 8 días del cultivo, a 28 ± 2 °C. Se determinó la concentración inhibitoria media (CL₅₀) y total (CL₁₀₀), para seleccionar el aceite esencial con mayor actividad antifúngica. Se realizó un análisis de cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas (CG-EM) para la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles de cada aceite esencial. Los rendimientos de los aceites esenciales de *T. micrantha* y *T. lucida* fueron del 0.2% e inferior a éste, en *T. lunulata*, con 0.1%. El aceite esencial de *T. micrantha* tuvo el mayor efecto antifúngico sobre *N. clavispora*, presentando los valores más bajos de CL₅₀ y CL₁₀₀ (CL₅₀=0.061 μ g/mL, CL₁₀₀ = 0.135 μ g/mL). En cada aceite esencial se observó un perfil diferente de compuestos volátiles, observando al estragol y anetol como los mayoritarios del de *T. micrantha*, que representan el 89.1 % del total del aceite; el estragol y el metileugenol en *T. lucida*, que representan el 83.98 % del aceite; y, el β -ocimeno, el α -thujeno y pinenona, los mayoritarios de *T. lunulata*, que representan el 55.54 % de este aceite. Estos resultados sugieren que la mezcla de los compuestos estragol y anetol, presentes en el aceite esencial de *T. micrantha*, son los responsables del mayor efecto antifúngico sobre *N. clavispora*.

Palabras clave: Aceite esencial, antifúngicos, *Neopestalotiopsis*, *Tagetes*, Volátiles.

Introducción

Tagetes es un género de plantas de la familia Asteraceae, del cual diversas especies son ampliamente utilizadas en la medicina tradicional mexicana, debido al contenido de compuestos del aceite esencial, que presentan propiedades antimicrobianas como los monoterpenos (ocimeno, limoneno, terpineno, mirceno, etc.), cetonas monoterpénicas acíclicas (tagetona, dihidrotagetona y tagetenona), sesquiterpenos y fenilpropanoides (estragol, metileugenol, etc.), responsables del olor de este tipo de aceites esenciales (Zitzelsberger y Buchbauer, 2015; Sharifi-Rad *et al.*, 2017). Las especies de *T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*, son plantas que crecen hasta su floración en la época de lluvias en el municipio de Morelia (Michoacán, México), de las que puede recolectarse material para obtener los aceites esenciales.

Se sabe que los compuestos producidos por las plantas pueden variar en función de muchos factores, incluida la especie, la parte de la planta de la que se extrae, las temporadas de cosecha, la etapa de desarrollo de la planta y las fuentes geográficas. Las propiedades biológicas de varias de estas plantas afectan a diversos organismos, desde bacterias, virus, hongos, nematodos, ácaros e insectos, inclusive otras especies de plantas (Cubillo *et al.*, 1999; Serrato y Quijano, 2003).

Aunque son pocas las especies de *Tagetes* en las que se han descrito propiedades contra hongos, las más ampliamente estudiadas son *Tagetes erecta* y *T. lucida*, contra hongos fitopatógenos de géneros diversos como *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Fusarium* y *Sclerotium* (Céspedes *et al.*, 2006; Ávila-Sosa *et al.*, 2010; Barajas-Pérez *et al.*, 2011; Salehi *et al.*, 2018). En nuestro grupo de trabajo, se ha estudiado el efecto fungicida del aceite esencial de *T. lucida*, demostrando su actividad sobre diversos hongos como *Botrytis cinerea*, hongo causal del moho gris en plantas y frutos de fresa, así como otras frutillas como zarzamora, frambuesa y arándano (Céspedes *et al.*, 2006; Fulgencio-Negrete, 2013; Cázarez-Chávez, 2017). No se han realizado estudios con el aceite esencial de *Tagetes* spp para determinar la actividad antifúngica sobre *N. clavispora*, hongo responsable de la pudrición parda de la corona interna y la raíz en fresa (Park *et al.*, 2019), una nueva enfermedad micótica que afecta a los cultivos de fresa en la zona de Zamora y Jacona, en Michoacán, del 2017 al 2019 (Rebollar *et al.*, 2020).

El aceite esencial de las tres especies en estudio (*T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*) se presenta con un alto potencial para determinar el efecto antifúngico sobre *N. clavispora*, así como analizar el perfil químico de sus componentes volátiles para realizar una relación entre

los compuestos mayoritarios de éstos y su actividad antifúngica, objetivo de la presente investigación.

Materiales y métodos

Recolecta de material vegetal

La recolecta se realizó de las partes aéreas (tallos, hojas y flores) de tres especies de *Tagetes* (*T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*) (Figura 2) en los alrededores de la presa de Cointzio, municipio de Morelia, Michoacán (19°37'46.6''N - 101°14'48.8''O), en los meses de agosto a octubre de 2021. De cada especie de *Tagetes* se recolectaron 1000 g de la parte aérea, la cual se sometió a limpieza con agua corriente y se dejó secar a temperatura ambiente.

Especímenes de herbario

Cada espécimen de cada especie de *Tagetes* (*T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*) fue herborizado (Figura 8) y analizado en el herbario de la Facultad de Biología de la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, para confirmar cada especie.



Figura 8. Ejemplares de plantas de *Tagetes*. **A**, *Tagetes micrantha*; **B**, *Tagetes lunulata*; **C**, *Tagetes lucida*.

Obtención por hidrodestilación de aceites esenciales

El aceite esencial de cada especie de *Tagetes*, se obtuvo de 1000 g de materia fresca, mediante un equipo de hidrodestilación tipo Clevenger (Figura 9A), mezclando 200 g de muestra por cada 1500 mL de agua por cada extracción, a una temperatura de 90 °C (3-4 h). El aceite esencial fue separado del aceite esencial/agua por partición líquido-líquido en un embudo de separación (Figura 9B) y removido con micropipeta (Torres-Martínez *et al.*, 2018). El aceite esencial de cada especie, fue almacenado a 4 °C en oscuridad, hasta su análisis por cromatografía de gases-espectrometría de masas, así como la actividad antifúngica (Figura 9C).



Figura 9. Obtención de aceites esenciales. **A**, Hidrodestilador tipo Clevenger; **B**, Embudo de separación; **C**, Aceites esenciales de las tres especies de *Tagetes*.

Cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas (CG-EM)

La cuantificación e identificación de compuestos volátiles, particularmente terpénicos y fenilpropanos, fueron analizados por CG-EM siguiendo la metodología descrita por Torres-Martínez *et al.* (2014), en el Laboratorio de Ecología Química del Instituto de Investigaciones en Ecosistemas y Sustentabilidad de la UNAM, campus Morelia.

Un volumen de 1 μL se inyectó en un equipo de cromatografía de gases (Agilent Technologies 7890A) acoplado a un detector de masas (Agilent 5975C), utilizando helio como gas portador, con un flujo de 1 mL/min, con una inyección dividida (50:1) a una temperatura de 250 °C en columna capilar no polar HP 5MS (30 m \times 0.25 mm de diámetro interno \times 0.25 μm), en las siguientes condiciones: temperatura inicial de 50 °C, seguida de una rampa de 5 °C/min para alcanzar una temperatura de 280 °C durante 1 min; y de otra rampa de 25 °C/min para elevar la temperatura a 380 °C, durante 3 min. El tiempo de ejecución fue de 50 min, con una velocidad de flujo de 1 mL/min, con un voltaje de ionización de 70 eV, a una temperatura de interfaz de 250 °C, en modo SCAN, y a un intervalo de masa de 50–500 m/z.

El porcentaje de los componentes de los aceites esenciales se determinó mediante la integración de las áreas de pico, los valores mostrados corresponden al valor promedio de tres inyecciones. Los compuestos se identificaron mediante la comparación de sus índices de retención, en relación con los de los n-alcános C8-C20, y por comparación con una biblioteca de espectros de masas con la biblioteca de espectros de masas NIST02 (por sus siglas en inglés, National Institute of Standards and Technology), así como por la comparación de sus índices de retención con los descritos por Adams (2007). La determinación cuantitativa se basó en el recuento total de iones detectado por el CG-EM.

Determinación de la actividad antifúngica in vitro

La actividad antifúngica se realizó con el método de difusión en pozos “*agar well diffusion assay*”, utilizando cajas Petri con medio PDA (Magaldi *et al.*, 2004). En cada pozo se vertieron 50 μL de cada uno de los aceites esenciales, previamente resuspendidos en dimetilsulfóxido (DMSO, 1%) a una concentración de 10 mg/mL, realizando los ensayos con discos de micelio del hongo (0.5 cm de diámetro) bajo estudio. Para seleccionar el fungicida como control positivo, se realizaron ensayos con tres fungicidas comerciales (Tecto60®, Cercobin® y

Captan®) determinando la concentración letal total (CL₁₀₀). Para el control negativo se aplicó la solución vehículo de DMSO 1%. Los resultados se reportan como porcentaje de inhibición, determinando el crecimiento micelial (mm) a los 8 días de los cultivos mantenidos a 28 ± 2 °C, calculado de acuerdo a la fórmula reportada por Rutiaga (2001): Inhibición (%) = (crecimiento de control – crecimiento de tratamiento) x 100 crecimiento de control.

Resultados y discusión

Rendimiento de los aceites esenciales

Los porcentajes de rendimiento de cada uno de los aceites esenciales por cada 1000 g de material fresco se presentan en el cuadro 6, observando que los mayores rendimientos los presentaron los aceites esenciales de *T. micrantha* y *T. lucida*, en comparación al de *T. lunulata* (Cuadro 6).

Cuadro 6. Rendimiento de los aceites esenciales de tres especies de Tagetes (*T. micrantha*, *T. lucida* y *T. lunulata*) obtenidos por hidrodestilación.

Espece vegetal	Volumen del aceite esencial (ML)	Rendimiento del aceite esencial (%)
<i>TAGETES</i>	2	0.2
<i>MICRANTHA</i>		
<i>TAGETES LUCIDA</i>	2	0.2
<i>TAGETES LUNULATA</i>	1	0.1

En otras investigaciones, se han reportado rendimientos similares del aceite esencial de *T. lucida* del 0.26 % de plantas en floración recolectadas en México (Garrido *et al.*, 2013). Para *T. micrantha* y *T. lunulata* no existen referencias de rendimientos de extracción del aceite esencial por hidrodestilación ni con otras metodologías, por lo que no hay referencia para la comparación con los rendimientos obtenidos en este trabajo. El porcentaje de rendimiento depende de diversos factores, como la altitud, latitud, tipo de suelo, de las condiciones climáticas y del estrés de la planta, la edad y la fenología de la planta, así como de los ecotipos o quimiotipos de cada especie, lo que resulta en la variación del contenido de los compuestos

volátiles terpénicos en los aceites esenciales de algunas plantas (Barra *et al.*, 2009; Moriconi *et al.*, 2009). Los porcentajes de los aceites esenciales obtenidos para las tres especies de *Tagetes*, concuerdan con lo reportado en general para plantas medicinales aromáticas, en las que se obtienen en un rango de 0.1 a 1 % mayormente (Butnariu y Sarac, 2018).

Actividad antifúngica *in vitro* de los aceites esenciales de *Tagetes* spp

En los ensayos para evaluar la inhibición del crecimiento del micelio de *Neopestalotiopsis clavisporea*, se emplearon los aceites esenciales de las tres especies de *Tagetes* a evaluar (*T. micrantha*, *T. lucida* y *T. lunulata*) en diferentes concentraciones para determinar la CL₅₀ e CL₁₀₀; se utilizó DMSO a 1% como control negativo y el fungicida comercial Captan® como control positivo. Las concentraciones efectivas fueron de 0.004 hasta 0.127 µg/mL para *T. micrantha* con una CL₅₀ = 0.061 µg/mL y una CL₁₀₀ = 0.135 µg/mL (ver figura 10); de 0.004 a 0.143 µg/mL, con una CL₅₀ = 0.08 µg/mL y una CL₁₀₀ = 0.16 µg/mL para *T. lucida* (ver figura 11); y de 0.065 hasta 0.218 µg/mL, con una CL₅₀ = 0.1 µg/mL y una CL₁₀₀ = 0.2 µg/mL para *T. lunulata* (ver figura 12). Estos resultados demuestran una alta actividad antifúngica del aceite esencial de *T. micrantha*.

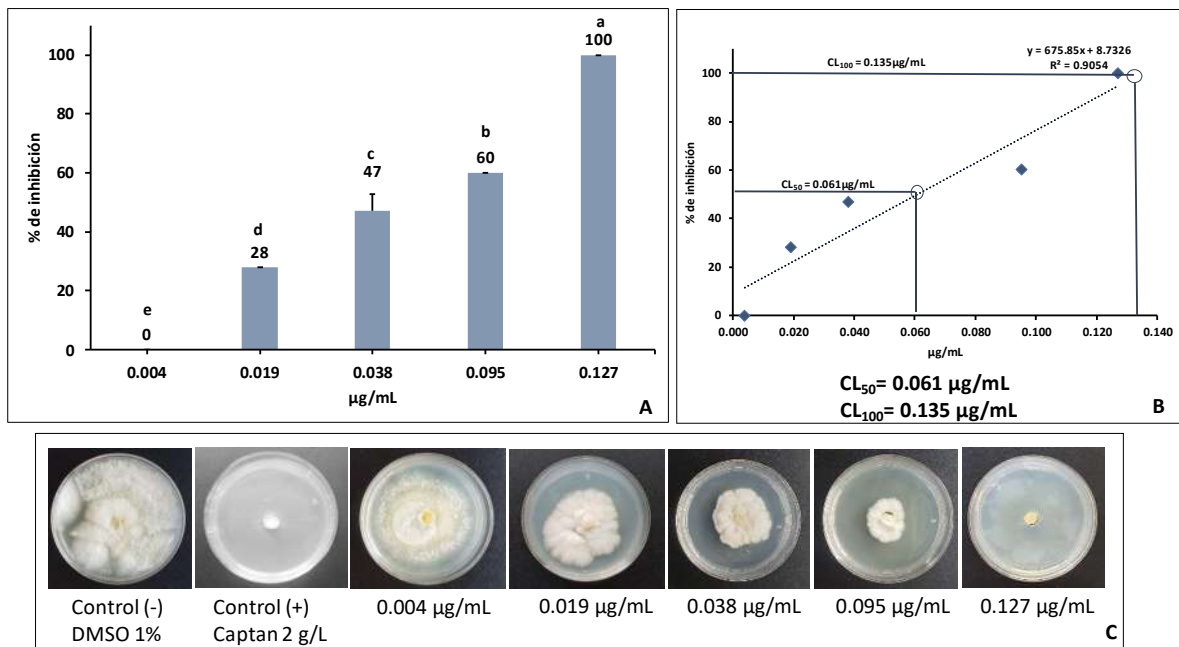


Figura 10. Inhibición del aceite esencial *Tagetes micrantha* sobre *N. clavispora*. **A**, Porcentajes de inhibición con diferentes concentraciones de AE. **B**, Curva de inhibición y análisis de tendencia para la obtención de CL_{50} e CL_{100} . **C**, Bioensayos *in vitro* con el método difusión en pozos en PDA. Control (-) Dimetil sulfóxido 1%. Control (+) fungicida comercial Captan®.

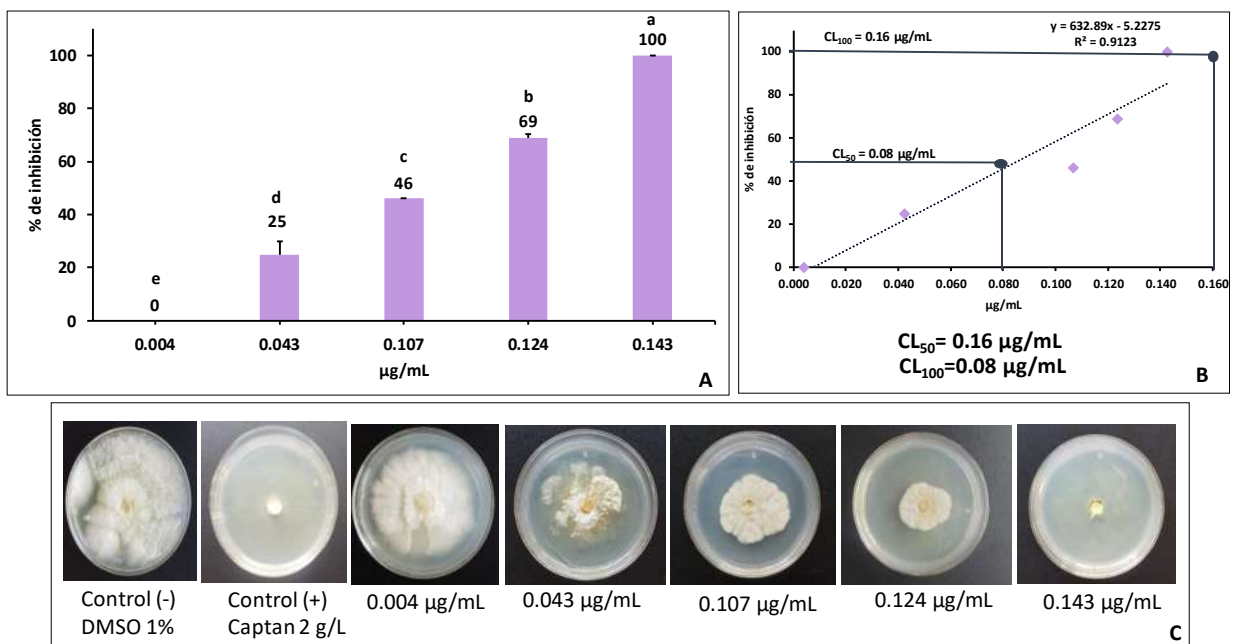


Figura 11. Inhibición del aceite esencial *Tagetes lucida* sobre *N. clavispora*. **A**, Porcentajes de inhibición con diferentes concentraciones de AE. **B**, Curva de inhibición y análisis de tendencia para la obtención de CL_{50} e CL_{100} . **C**, Bioensayos *in vitro* con el método difusión en pozos en PDA. Control (-) Dimetil sulfóxido 1%. Control (+) fungicida comercial Captan®.

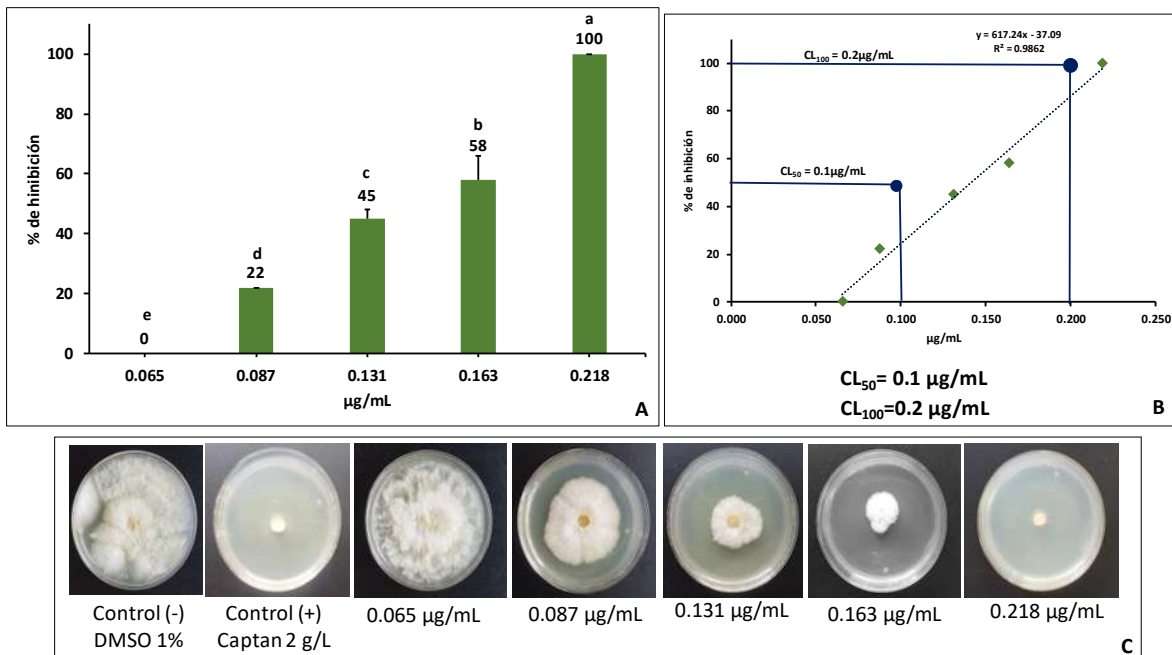


Figura 12. Inhibición del aceite esencial *Tagetes lunulata* sobre *N. clavispora*. **A**, Porcentajes de inhibición con diferentes concentraciones de AE. **B**, Curva de inhibición y análisis de tendencia para la obtención de CL_{50} e CL_{100} . **C**, Bioensayos *in vitro* con el método difusión en pozos en PDA. Control (-) Dimetil sulfóxido 1%. Control (+) fungicida comercial Captan[®].

En un bioensayo realizado con 1% y 3% del aceite esencial de una población de *Tagetes lucida*, en el cual se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* mediante la técnica de difusión en agar, contra *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* y *Rhizoctonia solani*, se obtuvo una reducción del crecimiento micelial del 46% para *F. oxysporum*, 39% en *R. solani*, 21% en *A. niger* y 16% en *P. janthinellum*, con la concentración de 1%; con la concentración del 3%, solo en *R. solani* se observó la mayor la reducción del crecimiento micelial (72%) (López-López *et al.*, 2018). En la presente investigación, los aceites esenciales de las tres especies de *Tagetes*, tuvieron una alta actividad sobre *N. clavispora* en porcentajes más bajos de cada aceite.

Barajas-Pérez *et al.* (2011) evaluaron el efecto del aceite esencial de *T. filifolia* al 0.1%, sobre la tasa de crecimiento micelial de diferentes aislamientos de *Sclerotium rolfsii*, obteniendo un efecto fungicida sobre todos los aislamientos. En una investigación más reciente, Gadban *et al.*

(2020) reportaron una actividad inhibitoria del 100% sobre *Colletotrichum truncatum* y *Trichoderma harzianum* utilizando el aceite esencial de *T. filifolia* a una concentración de 6 $\mu\text{l}/\text{mL}$ y 9 $\mu\text{l}/\text{mL}$, respectivamente. En otras investigaciones sobre actividad antifúngica utilizando aceites esenciales de algunas especies de *Tagetes*, se ha determinado que las concentraciones letales (100% de inhibición) están en intervalos de 0.05 a 10 $\mu\text{g}/\text{mL}$ sobre diversos hongos fitopatógenos.

Gadban *et al.* (2020) obtuvieron inhibición sobre *Colletotrichum truncatum* y *Trichoderma harzianum* con 6 y 9 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de aceites esenciales de *T. filifolia*, Cázares-Chávez (2017) determinó un 100% de inhibición sobre *Botrytis cinerea* con 0.05 $\mu\text{g}/\text{mL}$. En la presente investigación, el aceite esencial con mayor efecto fungicida sobre *N. clavispora* fue a una concentración de 0.135 $\mu\text{g}/\text{mL}$ para obtener 100% de inhibición, muy por debajo para lo reportado para otros hongos fitopatógenos.

Identificación y contenido de compuestos volátiles de aceites esenciales de *Tagetes* spp

En la figura 14 se muestran los cromatogramas de cada uno de los aceites esenciales de *Tagetes*, obtenidos por cromatografía de gases, y en el cuadro 7 se presenta la composición de los compuestos volátiles de estos aceites (*T. micrantha*, *T. lucida* y *T. lunulata*), en el que los terpenos principales se enlistan en orden de su elución, indicado el tiempo de retención (min), los que fueron identificados por espectrometría de masas, especificando su contenido en porcentaje del total de cada muestra de aceite esencial.

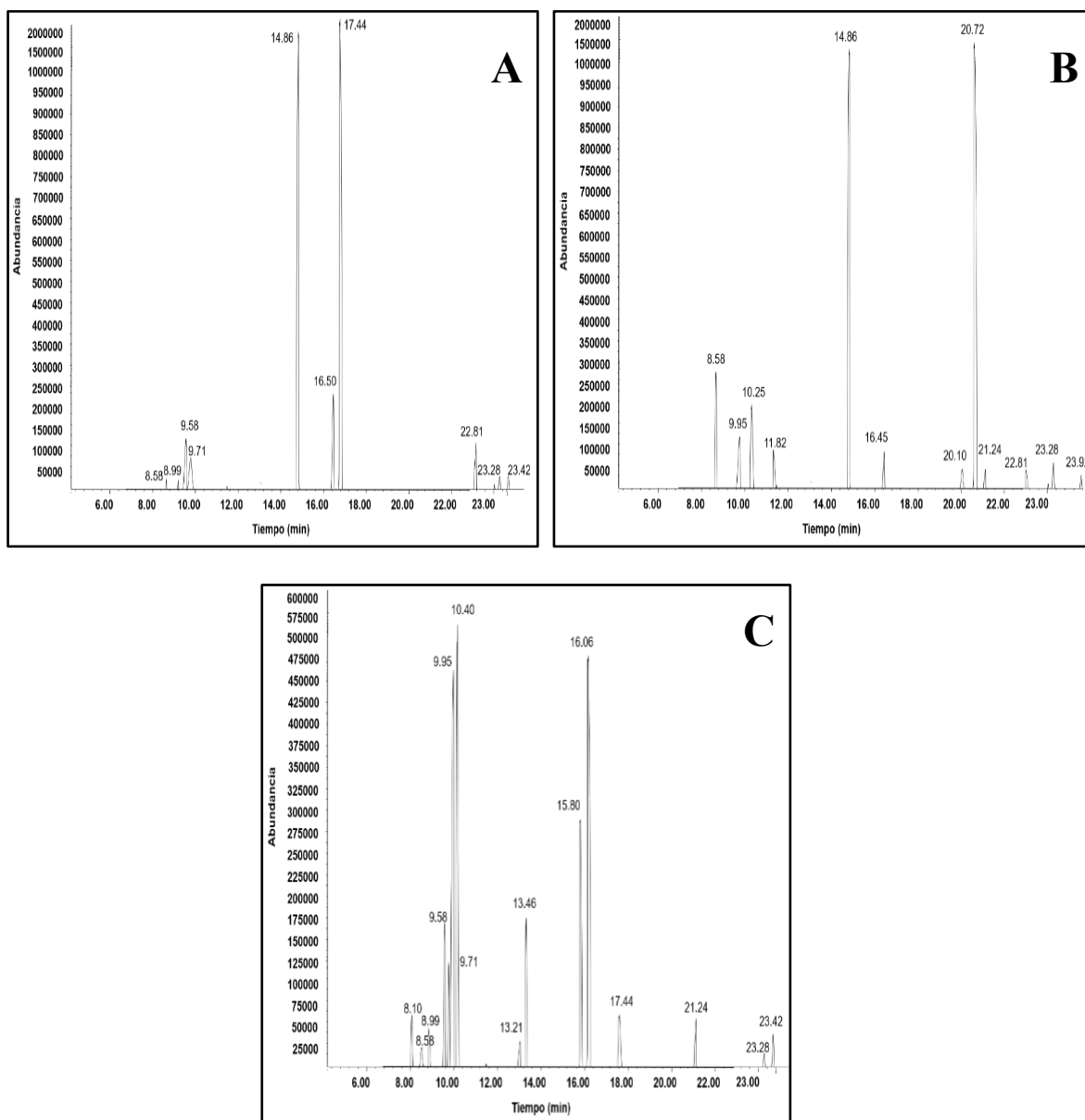


Figura 13. Cromatogramas de los aceites esenciales de tres especies de *Tagetes* obtenidos por hidrodestilación usando cromatografía de gases-espectrometría de masas. **A**, *T. micrantha*; **B**, *T. lucida*; **C**, *T. lunulata*.

Cuadro 7. Principales compuestos identificados del aceite esencial de tres especies de *Tagetes* (*T. micrantha*, *T. lucida* y *T. lunulata*) obtenidos por hidrodestilación usando cromatografía de gases-espectrometría de masas.

Tiempo de retención (MIN)	Compuesto	Contenido (%)		
		<i>T. micrantha</i>	<i>T. lucida</i>	<i>T. lunulata</i>
8.10	Felandreno	--	--	2.12
8.58	Mirceno	0.11	2.23	1.02
8.99	β -Terpineno	0.10	--	1.98
9.58	O-cimeno	0.92	--	5.72
9.71	Limoneno	0.51	--	4.64
9.95	β -Ocimeno	--	1.07	17.08
10.25	β -cis-Ocimeno	--	1.14	--
10.40	α -Thujeno	--	--	19.82
11.82	Linalol	--	0.47	--
13.21	cis-Tagetona	--	--	1.15
13.46	trans-Tagetona	--	--	6.21
14.86	Estragol	43.4	39.87	--
15.80	Verbenona	--	--	11.32
16.06	Pinenona	--	--	18.64
16.45	Pulegona	--	0.52	--
16.50	p-Anisaldehído	1.85	--	--
17.44	Anetol	45.7	--	2.15
20.10	β -Pinoeno	--	0.24	--
20.72	Metileugenol	--	44.11	--
21.24	Cariofileno	--	0.21	2.07
22.81	α -Cubebeno	1.11	0.19	--
23.28	Canfeno	0.05	0.26	0.64
23.42	α -Farneseno	0.04	--	1.18
23.92	δ -Cadineno	--	0.14	--

Los resultados muestran que los volátiles mayoritarios del aceite esencial de *T. micrantha* son el estragol y el anetol, que representan el 89.1 % del total del aceite, con tiempos de retención de 14.86 y 17.44, respectivamente (Figura 13A); el estragol y el metileugenol son los mayoritarios del aceite esencial de *T. lucida*, que representan el 83.98 %, con los tiempos de retención de 14.86 y 20.72, respectivamente (Figura 13B); y, el β -ocimeno, el α -thujeno y pinenona, con tiempos de retención de 9.95, 10.40 y 16.06, respectivamente (Figura 13C), son los mayoritarios del aceite esencial de *T. lunulata*, que representan el 55.54 % de este aceite.

Zarate-Escobedo *et al.* (2018) identificaron 19 compuestos presentes en el aceite esencial de partes aéreas de *T. lucida*, cinco de ellos mayoritarios (acetato de geranilo (40.83%), β -ocimeno (15.14%), nerolidol (8.19%), cariofileno (5.29%) y β -cubebeno (5.17%) de plantas recolectadas en Ixtapan de la Sal (Edo. de México); en otro estudio, Fulgencio-Negrete (2013) determinó la composición del aceite esencial de *T. lucida* (recolectada en Morelia) la cual contiene los compuestos volátiles, metil-eugenol (64%) y estragol (29.4%), como mayoritarios, lo que confirma el perfil químico similar al aceite esencial analizado en este estudio. El metil-eugenol se ha reportado como el compuesto con mayor actividad antifúngica tanto *in vitro* como *in vivo* contra el hongo *B.s cinerea*, inhibiendo la esporulación y el crecimiento de micelio (Fulgencio-Negrete, 2013).

Gadban *et al.* (2020) reportaron altas cantidades de anetol (75.1%), estragol (22.11%) y otros compuestos volátiles en menor proporción como el β -bisaboleno (0.69%), metileugenol (0.55%), p-anisaldehído (0.49%), espatulenol (0.26%) en el aceite esencial de *T. filifolia*, una especie que presenta similitud botánica con *T. micrantha*, en la cual el aceite esencial presentó al anetol (45.7%) y al estragol (43.4%) como mayoritarios, con una composición química similar a lo reportado para *T. filifolia*.

Debido a que no se encontraron reportes sobre el aceite esencial de *T. lunulata*, no fue posible comparar el perfil químico obtenido, sin embargo, los volátiles de este aceite esencial (β -Ocimeno, α -Thujeno y Pinenona) son reportados en otros aceites esenciales con actividad antifúngica, como los de *Artemisia* (Farzaneh *et al.*, 2006), de *Cotinus coggygria* (Fraternale y Ricci, 2018) y de *Ferulago angulata* (Moghaddam *et al.*, 2018), entre otros.

La composición química de los aceites esenciales de especies vegetales puede variar dependiendo de múltiples factores como la localización geográfica, etapa fenológica, condiciones climáticas, entre otras, por lo que los compuestos mayoritarios pueden encontrarse en diferentes concentraciones y los compuestos traza pueden o no estar presentes en la planta en el momento de la recolecta (Barra *et al.*, 2009; Moriconi *et al.*, 2009; Butnariu y Sarac, 2018).

Como anteriormente se mencionó, la concentración requerida para la inhibición del crecimiento de *N. clavispota* es menor con respecto a lo reportado con otros hongos fitopatógenos, cabe

señalar, que el anetol como componente mayoritario combinado con otras moléculas en el aceite esencial de *T. micrantha* (ver cuadro 7), tiene una mayor actividad biológica que en estado puro (Camarillo *et al.*, 2009), evidencia que sugiere un efecto de sinergismo (Koul *et al.*, 2008). El anetol y el estragol se encuentran en otras especies aromáticas como estragón (*Artemisia dracuncululus*), albahaca (*Ocimum basilicum*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), anís (*Pimpinella anisum*) y anís estrella (*Illicium verum*) (Freire *et al.*, 2005; Rietjens *et al.*, 2005), por lo que el efecto fungicida podría atribuirse a estos dos compuestos.

Los compuestos principales del aceite esencial de *T. lunulata* como α -thujeno, pinenona y β -ocimeno (ver cuadro 7), han sido reportados en otros aceites esenciales de plantas y han mostrado actividad antifúngica. Farzaneh *et al.* (2006) realizaron bioensayos con aceite esencial de especies de *Artemisa* spp. identificando a α -thujeno como el compuesto mayoritario (81.7%), en este trabajo evaluaron la actividad antifúngica sobre *Rhizoctonia solani*, *Fusarium moniliforme* y *F. solani*, obteniendo como resultados inhibiciones de estas tres especies de fitopatógenos con concentración del aceite esencial 0.041 μ L/mL. Moghaddam *et al.* (2018), determinaron la composición química y los efectos antifúngicos *in vitro* del aceite esencial de *Ferulago angulata* sobre *Alternaria alternata*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum trichellum*, obteniendo como uno de los compuestos principales al β -ocimeno (19.93%) e inhibiciones del 100% con concentraciones del aceite esencial de 0.8 μ L/mL.

Con estos resultados, se sugiere que la actividad fungicida del aceite esencial de *T. micrantha*, el de mayor actividad sobre *N. clavispota*, se debe a la presencia de los compuestos químicos mayoritarios como el anetol y el estragol, aunque esta respuesta puede deberse también al sinergismo entre todos los componentes de este aceite esencial.

Conclusiones

Los aceites esenciales de *T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*, demostraron tener gran actividad inhibitoria contra *N. clavispota* a concentraciones relativamente bajas. Sin embargo, el aceite esencial de *T. micrantha* mostró la mayor actividad antifúngica, presentando los valores más bajos de CL₅₀ y CL₁₀₀. El anetol y el estragol son los compuestos mayoritarios de este aceite esencial y se sugiere sean los responsables de esta actividad.

Referencias

- Adams R.P. (2007).** Identification of essential oil components by gas chromatography/ mass spectrometry, 4th Edition. Allured Publ., Carol Stream, IL.
- Ávila-Sosa R., Gastélum-Reynoso G., García-Juárez M., Meneses-Sánchez M.C., Navarro-Cruz A.R., Dávila-Márquez R.M. (2010).** Evaluation of different Mexican plant extracts to control anthracnose. *Food and Bioprocess Technology*, 4(4): 655-659.
- Barajas-Pérez J., Montes-Belmont R., Castrejón-Ayala F., Flores-Moctezuma H., Serrato-Cruz M.A. (2011).** Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Revista Mexicana de Micología*, 34: 85-91.
- Barra A. (2009).** Factors affecting the chemical composition of essential oils. *Natural Product Communications*, 4(8): 1147–1154.
- Butnariu M., Sarac I. (2018).** Essential oils from plants. *Journal of Biotechnology and Biomedical Science*, 1(4): 35-43.
- Camarillo R., Gabriela, Ortega A., Laura D., Serrato C., Miguel A., Rodríguez H.C. (2009).** Actividad biológica de *Tagetes filifolia* (Asteraceae) en *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2): 177-184.
- Cázares-Chávez D. 2017.** Efecto del aceite esencial de *Tagetes lucida* en una biopelícula de quitosano sobre *Botrytis cinerea* en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi). Tesis de Maestría en Ciencias (PIMCB), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Céspedes C.I., Avila J.G., Martínez A., Cerrato B., Calderón-Múgica J.C., Salgado-Garciglia R. (2006).** Antifungal and antibacterial activities of mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 54: 3521–3527.
- Cubillo D., Sanabria G., Hilje L. (1999).** Evaluación de repelencia y mortalidad causada por insecticidas comerciales y extractos vegetales sobre *Bemisia tabaci*. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)*, 53: 65-72.
- Farzaneh M., Ahmadzadeh M., Hadian J., Tehrani A.S. (2006).** Chemical composition and antifungal activity of the essential oils of three species of *Artemisia* on some soil-borne phytopathogens. *Commun. Agric. Appl. Biol. Sci.*, 71: 1327–1333.
- Fraternale D., Ricci D. (2018).** Chemical composition and antifungal activity of the essential oil of *Cotinus coggygria* from Marche region (Italy). *Natural Product Communications*, 13(9): 1175-1178.
- Freire R.S., Morais S.M., Catunda-Junior F.E. (2005).** Synthesis and antioxidant, antiinflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. *Bioorganica Medical Chem.*, 13(13): 4353-4358.

- Fulgencio-Negrete R. (2013).** Propiedad antifúngica de compuestos volátiles de tres plantas medicinales (nurite, santa maría y toronjil) sobre hongos patógenos de fresa. Tesis de Maestría en Ciencias (PIMCB), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Gadban L.C., Camiletti B.X., Bigatton E.D., Distéfano S.D., Lucini E. I. (2020).** Combinations of *Tagetes filifolia* Lag. essential oil with chemical fungicides to control *Colletotrichum truncatum* and their effects on the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Journal of Plant Protection Research*, 60(1): 41-50.
- Koul O., Walia S., Dhaliwal G.S. (2008).** Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International*, 4: 63-84.
- López-López E., Peña-Ortega M.G., Colinas-León M.T., Díaz-Cedillo F., Serrato-Cruz M. Á. (2018).** Fungistasis of essential oil extracted from a *Tagetes lucida* population of Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(2): 329-341.
- Magaldi S., Mata E.S., Hartung de Capriles C., Pérez C., Colella M.T., Olaizola C. (2004).** Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1): 39-45.
- Moghaddam M., Mehdizadeh L., Mirzaei H.N., Pirbalouti A.G. (2018)** Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of seed essential oil of *Ferulago angulata*, *International Journal of Food Properties*, 21(1): 158-170.
- Moriconi J.I., Fernández E.A., Martínez E., Giulietti A. (2009).** Rendimiento de materia seca y composición del aceite esencial de *Lippia turbinata* Griseb. “poleo” (Verbenaceae), en plantas de San Luis (Argentina)”. *Horticultura Argentina*, 28(65): 34-38.
- Park K., Han I., Lee S.-M., Choi S.-L., Kim M.C. y Lee H. (2019).** Crown and Root Rot of Strawberry Caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 47(4): 427–435.
- Rebollar A.A., Silva R.H.V., Fuentes A.D., Acosta G.U., Martínez R.M., Parra R.B.E. (2020).** An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot Caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. *APS Publications*, 104(8): 2054-2059.
- Rietjens I.M., Boersma M.G., Van Der Woude H. (2005).** Review: flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutation Res.*, 574(1): 124-138.
- Rutiaga Quiñones, J.G. 2001.** Chemische und biologische Untersuchungen zum Verhalten dauerhafter Holzarten und ihrer Extrakte gegenüber holzabbauenden Pilzen. Buchverlag Gräffelfing. München. 201 S.
- Salehi B., Valussi M., Morais-Braga M., Carneiro J., Leal A., Coutinho H., Vitalini S., Kręgiel D., Antolak H., Sharifi-Rad M., Silva N., Yousaf Z., Martorell M., Iriti M., Carradori S., Sharifi-Rad J. (2018).** *Tagetes* spp. essential oils and other

extracts: chemical characterization and biological activity. *Molecules* (Basel Switzerland), 23(11): 2847.

Serrato M., Quijano M.L. (2003). Usos de algunas especies de *Tagetes*: Revisión bibliográfica (1984-1992). Memorias I Simposio Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenibles. Centro de Enseñanza, Investigación y Capacitación para el desarrollo Agrícola Regional (CEICADAR, Puebla), del Colegio de Postgraduados. México. 228-238.

Sharifi-Rad J., Sureda A., Tenore G.C., Daglia M., Sharifi-Rad M., Valussi M., Tundis R., Sharifi-Rad M., Loizzo M.R., Ademiluyi A.O., Sharifi-Rad R., Ayatollahi S.A., Iriti M. (2017). Biological activities of essential oils: from plant chemoeology to traditional healing systems. *Molecules*, 22(1): 70.

Torres-Martínez R., Bello-González M.Á., Molina-Torres J., Ramírez-Chávez E., García-Rodríguez Y., Fulgencio-Negrete R., García-Hernández A., López-Gómez R., Martínez-Pacheco M.M., Lara-Chávez B.N., Salgado-Garciglia R. (2014). Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja macrostema* (Benth) Briq. *Revista Mexicana de Ciencias Forestales*, 5(21): 122-134.

Torres-Martínez R., García-Rodríguez Y., Ríos-Chávez P., Saavedra-Molina A., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A., Salgado-Garciglia R. (2018). Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.). *Pharmacognosy Magazine*, 3(4): 875–880.

Zitzelsberger C., Buchbauer G. (2015). Essential oils as “a cry for help”. A review. *Natural product communications*, 10(6), 1934578X1501000678.

7.3. CAPÍTULO 3. Efecto antifúngico del aceite esencial de *Tagetes micrantha* en plantas de fresa infectadas con *Neopestalotiopsis clavispora*.

Resumen

Se evaluó el efecto antifúngico del aceite esencial de *T. micrantha* sobre *Neopestalotiopsis clavispora* en plantas de fresa bajo condiciones asépticas, utilizando plántulas cultivadas *in vitro* por 28 días en medio de Murashige y Skoog (MS) sin reguladores de crecimiento. Al momento de la inoculación con esporas de *N. clavispora*, las plantas fueron cultivadas en frascos de cultivo conteniendo agrolita y agua estéril y cubiertas con plástico autoadherible transparente, manteniéndolas en condiciones de laboratorio (25 ± 2 ° C). La infección se realizó en las coronas de las plantas con la inoculación de 10 μ L de una suspensión de esporas de *N. clavispora* (1×10^6 esporas/mL). El efecto antifúngico se determinó por el método de aspersión con la aplicación de 60 μ L de la CL₁₀₀ del aceite esencial de *T. micrantha* (0.135 μ g/mL), preparada con DMSO 1%. Se empleó como control positivo el fungicida comercial Captan® (2.0 g/L) y como control negativo la solución vehículo DMSO 1%, aplicados también por aspersión. Las plantas tratadas fueron incubadas durante 8 días para observar los síntomas causados por el hongo y el efecto antifúngico del aceite esencial de *T. micrantha* mediante la determinación del índice de severidad (IS) en una escala de 0–4 (0=sin síntomas, 1=0.1–5% de enfermedad, 2=5.1–20%, 3=20.1–40%, y 4=40.1–100%). Los resultados mostraron un efecto antifúngico con la aspersión de la CL₁₀₀ del aceite esencial de *T. micrantha* en plantas de fresa desafiadas al ataque de *N. clavispora* cultivadas por 8 días, debido a que estas no presentaron síntomas de la enfermedad causada por el hongo (IS=0), similar a lo observado con la aplicación del fungicida comercial. La enfermedad estuvo presente en las plantas tratadas con DMSO 1%, mostrando crecimiento de micelio y síntomas de la enfermedad (IS=4). Con estos resultados se demostró el efecto antifúngico del aceite esencial de *T. micrantha* en ensayos *in vivo*, utilizando plantas de fresa inoculadas con esporas de *N. clavispora*.

Palabras clave: Aceite esencial, antifúngicos, Fresa, *Neopestalotiopsis clavispora*, *Tagetes micrantha*.

Introducción

La producción de fresa en los últimos años ha presentado un descenso en el rendimiento del cultivo debido a la presencia de problemas fitosanitarios como enfermedades de la corona y raíz. Zazzetta *et al.* (2018) menciona que las enfermedades de la corona y raíz son difíciles de controlar debido al patógeno *Neopestalotiopsis* sp., debido a que en general forman estructuras de resistencia que permanecen en el suelo durante mucho tiempo. El uso de agentes antifúngicos de origen sintético ya no resulta en una alternativa debido a su residualidad en los suelos (Cabrera-Guzmán *et al.*, 2017). Actualmente se emplean millones de kilogramos al año de estos compuestos y a causa de su alta movilidad y persistencia en el ambiente, lo que conlleva a la contaminación de alimentos y agua, que con el paso del tiempo pueden ser la causa de enfermedades asociadas a la bioacumulación de los plaguicidas (Karam *et al.*, 2004; OMS, 2023).

Desafortunadamente, en México se emplean alrededor de 186 plaguicidas altamente nocivos prohibidos en países primermundistas y otros prohibidos en México, los cuales son comercializados y empleados clandestinamente (Fregoso, 2014). La alternativa de emplear extractos vegetales como los aceites esenciales con actividad antifúngica en los cultivos de fresa son una alternativa más segura.

Los resultados presentados en los capítulos 7.2 y 7.3 de la presente investigación demuestran que los aceites esenciales de tres especies de *Tagetes* (*T. lucida*, *T. lunulata* y *T. micrantha*) presentan actividad antifúngica sobre *N. clavispora*, pero en particular el de *T. micrantha* tiene una inhibición a concentraciones media y total en concentraciones bajas (0.061 y 0.135 µg/mL, respectivamente). Este aceite esencial contiene diversos compuestos terpénicos y fenilpropanos, pero presenta al estragol y al anetol que representan el 89.1 % del aceite esencial, que pudieran ser los responsables de la actividad antifúngica contra *N. clavispora*.

En diversas plantas de alto valor agrícola como maíz y frijol, se han utilizado diversos extractos o aceites derivados de plantas con actividad antifúngica, como el aceite esencial del neem (*Azadirachta indica*) contra *Sclerotium rolfsii*, *Rhizoctonia solani*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Lagenidium giganteum*, *Metarhizium anisopliae*, *Fusarium graminearum* y *Hemileia vastatrix* (Mohanty *et al.*, 2008; Mohammad *et al.*, 2014; Mohamed-Ali *et al.*, 2017; Heidtmann-Bemvenuti *et al.*, 2016; Aguirre-Vega *et al.*, 2022); o el aceite esencial de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*), hierba de limón (*Cymbopogon citratus*), menta (*Mentha piperita*) y

eucalipto (*Eucalyptus globulus*) que muestran actividad antifúngica sobre *Fusarium oxysporum* F. sp. lycopersici, patógeno de tomate (Sharma *et al.*, 2017).

Aunque las mayorías de la investigación se realizan de manera directa contra cada especie de hongo mediante ensayos *in vitro*, pocos son los reportes encaminados a determinar la efectividad de los aceites esenciales o extractos de plantas en ensayos *in vivo*, utilizando plántulas o plantas bajo condiciones *in vitro* (asépticas) o de invernadero y campo. Los aceites esenciales de orégano (*Lippia origanoides*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) se han probado en plantas sobre *Colletotrichum musae* en banano y *Botrytis cinerea* en fresa, encontrando que las dos especies resultaron ser promisoras y eficientes en el control de ambos hongos, aunque destacando que el orégano presentó unos porcentajes más altos (Taborda-Andrade, 2015).

Hasta ahora, no hay reportes del efecto antifúngico *in vivo* de aceites esenciales del género *Tagetes*, por lo que el objetivo de este capítulo es evaluar el efecto antifúngico del aceite esencial de *T. micrantha* en plántulas de fresa inoculadas con *N. clavispora*.

Materiales y Métodos

Obtención de esporas

A los 20 días del cultivo *in vitro* de *N. clavispora* en medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (Figura 14A) se obtuvo una suspensión de esporas en 1 ml de agua destilada estéril, para posteriormente hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer, y con diluciones consecutivas se obtuvo un conteo de 1×10^6 esporas/mL, suspensión utilizada como inóculo para realizar la infección en plantas de fresa cultivadas *in vitro* (Figura 14B).

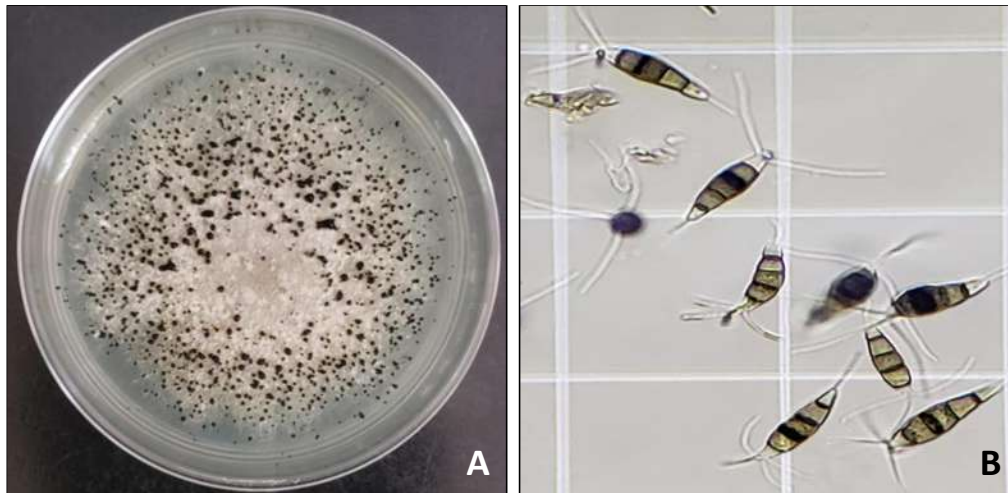


Figura 14. Obtención de esporas para ensayo en plantas de fresa. A, Cultivo de *N. clavispora* en medio PDA después de 20 días. B, Conteo de esporas (macroconidios) en cámara de Neubauer 40x.

Determinación de la actividad antifúngica en plántulas de fresa

Se seleccionaron plántulas de fresa (*Fragaria x ananassa* Cv. Aromas) de 28 días de cultivo en medio nutritivo de Murashige y Skoog (MS, Murashige y Skoog, 1962) sin reguladores de crecimiento, mantenidas bajo condiciones de cuarto de cultivo (25 ° C, un fotoperiodo de 16 horas/luz, lámparas de luz blanca fluorescente con una intensidad de 32 $\mu\text{mol}/\text{m}^2\text{s}$). Éstas se trasplantaron en sustrato estéril de agrolita humedecido previo a la esterilización con agua destilada en frascos de cultivo, para conseguir un sistema de cultivo aséptico. La inoculación se realizó en las coronas de las plantas con 10 μL de la suspensión de esporas de *N. clavispora* y se les aplicó un volumen de 60 μL de la CL₁₀₀ del aceite esencial de *T. micrantha* mediante aspersión, preparado como una emulsión con DMSO 1%, incubando a 25 \pm 2 ° C durante 8 días. Como control positivo se aplicó Captan[®] (2.0 g/L) y como control negativo la solución de DMSO 1%, también se utilizaron plántulas de fresa sin ningún tratamiento.

Los frascos se taparon con una envoltura de plástico autoadherible y transparente, con pequeñas perforaciones. El desarrollo de la enfermedad fue evaluado cada 24 h, observando principales síntomas como marchitamiento, necrosis, manchas foliares o muerte, determinados con el índice de severidad en una escala de 0–4 (0=sin síntomas, 1=0.1–5% de enfermedad, 2=5.1–20%, 3=20.1–40%, y 4=40.1–100%) (Lee *et al.*, 2006). Estos ensayos se realizaron para

determinar la actividad antifúngica del aceite esencial de *T. micrantha* en plantas de fresa infectadas con *N. clavispora*, siguiendo los protocolos reportados por Soyly *et al.* (2010).

Resultados y discusión

Con la aplicación del aceite esencial de *T. micrantha* ($CL_{100} = 0.135 \mu\text{g/mL}$) en plantas de fresa inoculadas con esporas de *N. clavispora* cultivadas por 8 días en agrolita, se observó un óptimo efecto antifúngico (ver cuadro 8), ya que las plantas mostraron un índice de severidad de 0, ya que no se observaron síntomas de la enfermedad causada por el hongo, ni el crecimiento de micelio en la zona de la inoculación (Figura 15A). A este tiempo, las plantas tratadas con DMSO 1% presentaron síntomas de la enfermedad como necrosis en la corona y crecimiento de micelio, observando un índice de severidad de 4 (Figura 15B). Sin embargo, en las plantas tratadas con el fungicida (Captan[®]) y las no tratadas, no se observaron síntomas, considerando un índice de severidad de 0 (Figuras 15C y 15D). El comportamiento de las plantas con los diferentes tratamientos dio como resultado una aparente disminución de tamaño en el control negativo debido a los daños ocasionados por este hongo patógeno, sin embargo, no hubo variación en el peso de las plantas después de los 8 días de tratamiento.

Cuadro 8. Resultados de la actividad antifúngica del aceite esencial de *T. micrantha* en plantúlas de fresa (*Fragaria x ananassa* Cv. Aromas) infectadas con *N. clavispora*.

Tratamiento	Esporas <i>CLAVISPORA</i>	<i>N.</i> Concentración aplicada $\mu\text{G/ML}$	Índice de severidad
Control ^A	-	-	0
Control + ^B	1x10 ⁶ mL	2000	0
VH ^C	1x10 ⁶ mL	1%	4
VH + AE ^D	1x10 ⁶ mL	0.135	0

^a Planta control sin tratamiento o vehículo; ^b Control positivo: Captan[®]; ^c Solución vehículo (DMSO 1%); ^d Aceite esencial resuspendido en solución vehículo.

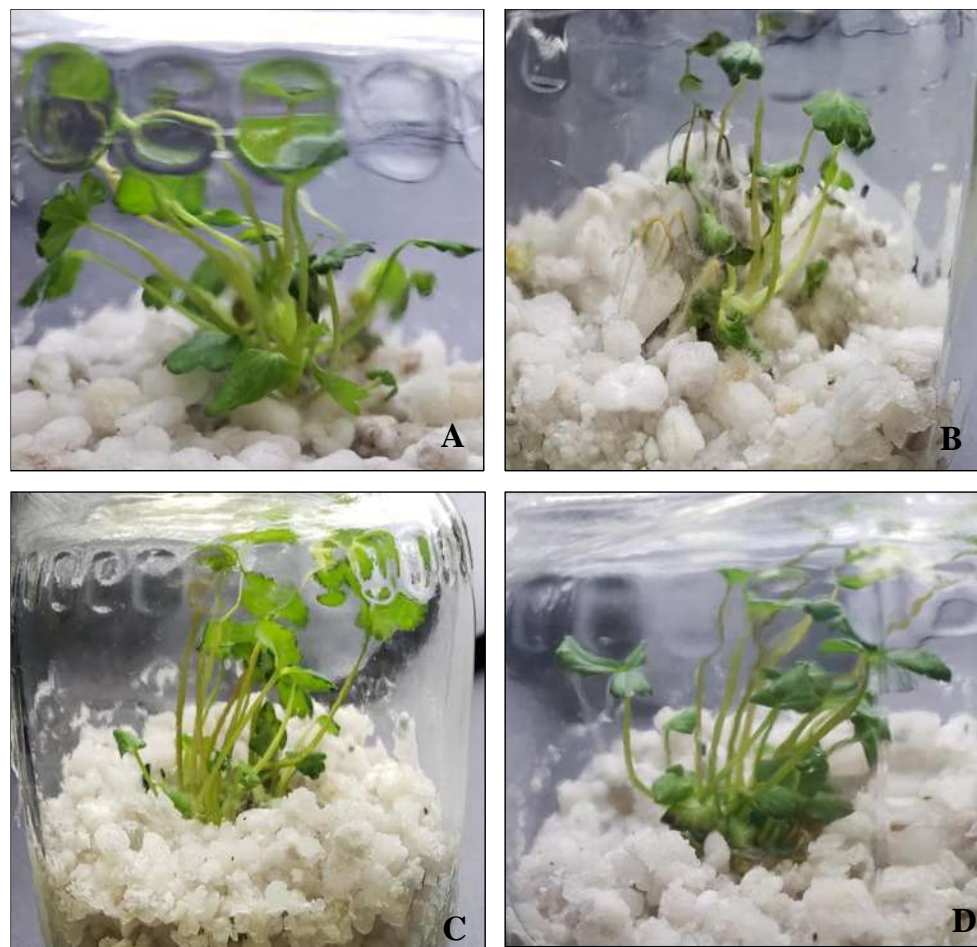


Figura 15. Determinación de la actividad antifúngica en plantas de fresa inoculadas con esporas de *N. clavispora* después de 8 días de incubación. **A**, Planta de fresa inoculada con *N. clavispora*, tratada con el aceite esencial de *T. micrantha*. **B**, Planta de fresa tratada solo con DMSO 1%, inoculada con *N. clavispora*. **C**, Planta de fresa inoculada con *N. clavispora*, tratada con Captan®. **D**, Plántula de fresa sin tratamiento.

Los aceites esenciales de plantas pueden ser aplicados de manera directa en las plantas o partes de éstas para realizar ensayos antifúngicos, antes o después de inocular esporas del hongo en estudio. Sin embargo, también pueden ser aplicados en fase volátil. En plantas de tomate se ha observado que la aplicación con la fase volátil fue más eficiente que por contacto, cuando se aplicaron aceites volátiles de orégano (0.2 µg/mL) en un flujo de aire, inhibiendo el crecimiento de *B. cinerea*; una misma inhibición con 1.6 µg/mL de aceite esencial de romero y lavanda. La germinación y el tubo de elongación fueron completamente inhibidos, por lo que las plantas no mostraron síntomas de la enfermedad (Soylu *et al.*, 2010).

Bajpai y Kang (2012) también describieron el efecto antifúngico en ensayos *in vivo*, aplicando 250 a 500 µg/L del aceite esencial de *Magnolia liliflora*, preparado en DMSO 0.5% adicionado con agua y Tween-20 0.1%, en plantas de pimiento () inoculadas con 6 mL de una suspensión de esporas (1×10^8 esporas/mL) de *Phytophthora capsici* KACC 40157 con un sistema de aspersión.

Los resultados del presente estudio demostraron que el aceite esencial presenta un alto potencial y promisorio como antifúngico, y para ser probado como fungicida para la protección de las plantas de fresa en contra de *N. clavispora*.

Conclusiones

El aceite esencial de *T. micrantha* demostró su efectividad inhibitoria sobre *N. clavispora* inoculado en plántulas de fresa, corroborando los resultados obtenidos en las pruebas *in vitro*, por lo que se confirma su efecto antifúngico.

Referencias

- Aguirre-Vega R., Alvarado-Castillo G., Ramírez-Benítez M.C., García-Pérez J.A., Hernández-Martínez M.J., Torres-Pelayo V.R., Alarcón-Gutiérrez E. (2022).** Actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de extractos de *Azadirachta indica* y *Piper auritum* contra la germinación de uredosporas de *Hemileia vastatrix*. Revista Mexicana de Fitopatología, 40(3): 458-473.
- Bajpai V.K., Kang S.C. (2012).** *In vitro* and *in vivo* inhibition of plant pathogenic fungi by essential oil and extracts of *Magnolia liliflora* Desr. J. Agr. Sci. Tech., 14: 845-856.
- Cabrera-Guzmán A., Noa-Carrazana J.C., Escalante-Rebolledo M.A., Susan-Tepetlán P.V. (2017).** Residualidad de plaguicidas en suelos dedicados al cultivo de banano dominico (*Musa* spp.) en Tlapacoyan Veracruz y sus posibles efectos a la salud. UVserva, 4.
- Fregoso J. (2014).** En México se usan 186 plaguicidas altamente peligrosos, denuncian activistas; algunos fueron prohibidos en Europa. Sin embargo, 1.
- Heidtmann-Bemvenuti R., Tralamazza S.M., Jorge Ferreira C.F., Corrêa B., Badiale-Furlong E. (2016).** Effect of natural compounds on *Fusarium graminearum* complex. Journal of the Science of Food and Agriculture, 96(12): 3998-4008.

- Karam M., Ramírez, Montes P., Galván J. (2004).** Plaguicidas y salud de la población. Red de Revistas Científicas de América Latina, el Caribe, España y Portugal Sistema de Información Científica, 11-3: 246-254.
- Mohammad R.O., Wang L., Zhou Q.-C., Yang Ch., Zhongyun T., Xie G.-L. (2014).** Antifungal and SAR potential of crude extracts derived from neem and ginger against storage carrot rot caused by *Sclerotinia Sclerotium*. Industrial Crops & Products, 55: 130-139.
- Mohamed-Ali E.O., Akhtar Shakil N., Singh Rana V., Sarkar D.J., Majumder S., Kaushik P., Bhushan Singh B., Kumar J. (2017).** Antifungal activity of nano emulsions of neem and citronella oil against phytopathogenic fungi, *Rhizoctonia solani* and *Sclerotium rolfsii*. Industrial Crops & Products, 108: 379-387.
- Mohanty S.S.G., Raghavendra K., Prasad Dash A. (2008).** Influence of growth medium on antifungal activity of neem oil (*Azadirachta indica*) against *Lagenidium giganteum* and *Metarhizium anisopliae*. Mycoscience, 49: 318-320.
- Soylu E.M., Kurt Ş., Soyly S. (2010).** In vitro and in vivo antifungal activity of essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology, 143(3):183-189.
- Sharma A., Rajendran S., Srivastava A., Sharma S., Kundu B. (2017).** Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici 1322, with emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. Journal of Bioscience and Bioengineering, 123(3): 308-313.
- Soylu E.M., Kurt S., Soyly S. (2010).** In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. Int. J. Food Microbiol., 43(3): 183-189.
- Taborda Andrade L.A. (2015).** Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia organoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Colletotrichum musae* en banano y *Botrytis cinerea* en fresa (Doctoral dissertation, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira).
- Zazzetta M., Mairosser A., Kiehr M., Luciani C., Conci V. (2018).** Enfermedades en el cultivo de frutilla en el valle bonaerense del Rio Colorado. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria. Recuperado de: https://inta.gov.ar/sites/default/files/enfermedades_frutilla_-_febrero_2018.pdf

8. DISCUSIÓN GENERAL

En una investigación que tiene el interés de aislar e identificar un hongo fitopatógeno, es importante establecer un sistema de identificación en las etapas tempranas de la infección de estos agentes patógenos, por lo que deben de realizarse técnicas de aislamiento efectivos, para asegurar que no haya otros hongos contaminantes y la caracterización morfológica (macro y microscópicamente), bioquímicas y moleculares sea la óptima. Las técnicas de biología molecular son una excelente herramienta para lograrlo, ya que su alta especificidad, sensibilidad y rapidez las colocan en primer plano para determinar rápidamente el agente causal de una determinada enfermedad y por lo tanto el tratamiento específico y oportuno, que identifica a género y especie (Angarita-Merchán *et al.*, 2017).

Un segundo paso, fue la búsqueda de una alternativa para aplicarse en el control del hongo en estudio (*Neopestalotiopsis* sp.), con el propósito de disminuir el uso de productos químicos sintéticos por sus desventajas antes mencionadas. Es evidente que se requiere de nuevos productos y prácticas agronómicas basadas en el control biológico de los fitopatógenos, que no representen un riesgo tanto para la sanidad del suelo, como para la salud de los consumidores de fresa. Además, actualmente los consumidores son más exigentes y demandan productos agrícolas que se caractericen por ser sanos, nutritivos, con mejor sabor y libres de plaguicidas (Reganold *et al.*, 2010; Barboza-Corona *et al.*, 2012). En la presente investigación se estudió el efecto de los aceites esenciales de tres especies del género *Tagetes* (*T. lucida*, *T. lunulata* y *T. michantha*) sobre este aislado de *Neopestalotiopsis* con la realización tanto en ensayos *in vitro* como en *in vivo*, utilizando plantas de fresa micropropagadas.

8.1. Identificación del aislado de *Neopestalotiopsis*

En una investigación que tiene el interés de aislar e identificar un hongo fitopatógeno, es importante establecer un sistema de identificación en las etapas tempranas de la infección de estos agentes patógenos, por lo que deben de realizarse técnicas de aislamiento efectivos, para asegurar que no haya otros hongos contaminantes y la caracterización morfológica (macro y microscópicamente), bioquímicas y moleculares sea la óptima. Las técnicas de biología molecular son una excelente herramienta para lograrlo, ya que su alta especificidad, sensibilidad y rapidez las colocan en primer plano para determinar rápidamente el agente causal de una

determinada enfermedad y por lo tanto el tratamiento específico y oportuno, que identifica a género y especie (Angarita-Merchán *et al.*, 2017).

Los resultados del presente estudio confirmaron que la especie de este hongo fitopatógeno causal de podredumbre en raíces y corona de plantas de fresa durante el trasplante a suelo, es *N. clavispora*, lo que concuerda con lo reportado por μ *et al.* (2019), distinto a los observado en plantas de fresa 'Camino Real' determinando inicialmente a *Pestalotiopsis* sp. y después como *N. rosae* (Rebollar *et al.*, 2020). La caracterización molecular fue contundente para llegar a la identificación de género y especie, confirmada por amplificación y secuenciación de tres regiones genéticas ITS [(ITS1, 5.8S, ITS2) (número de acceso de Gen Bank KU096879), β -tubulina (KU096880) y el gen *tef1* (KU096881) con una identidad del 98 a 99 % de tres aislamientos.

Además, con la inoculación de esporas de este hongo, se probó su patogenicidad en plántulas de fresa *in vitro*, observando los síntomas que identifican a la enfermedad causada por *N. clavispora*.

8.2. Efecto antifúngico del aceite esencial de *Tagetes* spp. sobre *N. clavispora*

Un segundo paso, fue la búsqueda de una alternativa para aplicarse en el control del hongo en estudio (*N. clavispora*), con el propósito de disminuir el uso de productos químicos sintéticos por sus desventajas antes mencionadas. Es evidente que se requiere de nuevos productos y prácticas agronómicas basadas en el control biológico de los fitopatógenos, que no representen un riesgo tanto para la sanidad del suelo, como para la salud de los consumidores de fresa. Además, actualmente los consumidores son más exigentes y demandan productos agrícolas que se caractericen por ser sanos, nutritivos, con mejor sabor y libres de plaguicidas (Reganold *et al.*, 2010; Barboza-Corona *et al.*, 2012). Debido a esto, se estudió el efecto de los aceites esenciales de tres especies del género *Tagetes* (*T. lucida*, *T. lunulata* y *T. michantha*) sobre este hongo.

El uso de productos de origen sintético para el control de plagas y enfermedades en el cultivo de fresa han producido un desequilibrio en la rizosfera, causando que organismos saprófitos surjan como nuevos patógenos (Ortega 2001; Choi *et al.*, 2003), por lo que se debe recurrir

a alternativas naturales para su control, como lo son los aceites esenciales, como los de *Tagetes* spp. (Sellam *et al.*, 2015).

Con los ensayos *in vitro* se comprobó que los aceites esenciales de las tres especies de *Tagetes* poseen compuestos capaces de inhibir el crecimiento micelial de *N. clavispota*, con porcentajes de inhibición del 100% en concentraciones dependientes del aceite esencial pero menores a 0.25 µg/mL.

8.2.1. Efecto antifúngico del aceite esencial de *T. micrantha* sobre *N. clavispota*

Con la determinación de la CL₅₀ y CL₁₀₀ se observó un mayor efecto antifúngico con el aceite esencial de *T. micrantha* (CL₅₀=0.061 µg/mL, CL₁₀₀ = 0.135 µg/mL), que mediante su análisis por CG-EM se obtuvo el perfil de los compuestos volátiles, encontrando al estragol y al anetol como los mayoritarios, resultados que sugieren que la mezcla de los compuestos estragol y anetol, presentes en el aceite esencial de *T. micrantha*, son los responsables del mayor efecto antifúngico sobre *N. clavispota*

La actividad antifúngica de los extractos naturales y aceites esenciales puede ser atribuida a la mezcla de sus componentes, como resultado de una sinergia entre todos ellos (Santamarina *et al.*, 2015). Sin embargo, se ha probado que algunos mayoritarios como el metileugenol y el estragol del aceite esencial de *Tagetes lucida* sobre *B. cinerea* y *C. gloeosporioides* son más eficientes cuando éstos han sido probados en forma separada (Fulgencio-Negrete, 2013).

Además, se han publicado diversos estudios sobre la efectividad inhibitoria de los aceites esenciales del género *Tagetes* sobre varios hongos fitopatógenos como *Fusarium* spp., *Botrytis cinerea*, *Alternaria* spp., entre otros, atribuyendo estos resultados a los compuestos mayoritarios de los aceites (metileugenol, estragol, α-thujeno, anetol, etc.) (Farzaneh *et al.*, 2006; Fulgencio-Negrete, 2013; Fraternali y Ricci, 2018; Moghaddam *et al.*, 2018).

La aplicación del aceite esencial de *T. micrantha*, utilizado para los ensayos de inhibición de crecimiento de *N. clavispota* no cuenta con antecedentes previos, sin embargo, el anetol y estragol, compuestos mayoritarios presentes en el aceite esencial, son fenilpropanoides volátiles ya reportados por su naturaleza fenólica como antifúngicos (Clarke, 2008).

Aunque el mecanismo por el cual actúan los componentes de un aceite esencial no está totalmente entendido, puede involucrarse la destrucción de la membrana celular del hongo por los constituyentes lipofílicos que poseen (Schelz *et al.*, 2006), y estudios recientes reportan otros efectos como cambios en la morfología del hongo que incluyen daños sobre estructuras como conidias, macroconidias e hifas, así como la disminución en la producción de micotoxinas (Park *et al.*, 2009).

Dentro de otros mecanismos implicados en la actividad antifúngica, se ha reportado que los aceites esenciales inducen muerte celular por elevar el estrés oxidativo debido a un proceso denominado pro-oxidante causado por algunos terpenos o fenilpropanos como el estragol, eugenol y metileugenol (Khan *et al.*, 2011); o inhibiendo la síntesis de ergosterol disrumpiendo la integridad de la membrana celular (Ahmad *et al.*, 2011).

Recientemente, Mani-López *et al.* (2021), reportaron que los aceites esenciales o sus componentes son capaces de penetrar y disrumir la pared celular y la membrana citoplásmica de la célula fúngica, utilizando los procesos de permeabilización, pudiendo alcanzar las membranas mitocondriales. Un cambio en la fluidez de la membrana plasmática puede causar la pérdida de electrolitos o el contenido celular, alterar el metabolismo de las proteínas, y las concentraciones del ion calcio. De esta manera, ocasionan un daño en lípidos, proteínas y en el contenido de ácidos nucleicos, afectan la bomba de protones y el abastecimiento de ATP, lo que lleva a un decremento en el potencial de membrana. La permeabilización tanto de las membranas mitocondriales internas y externas, afecta la vía del citocromo C, lo que resulta en apoptosis celular o necrosis que conduce a la muerte celular del hongo (Saad *et al.*, 2013; Akthar *et al.*, 2014; Swamy *et al.*, 2016).

En particular, en algunas investigaciones se han reportado los mecanismos de acción antifúngica tanto del anetol como del estragol, ambos compuestos del aceite esencial de *T. micrantha*, como lo descrito por Fujita *et al.* (2014) que describen que estos compuestos inducen la muerte celular debido a aumentar el estrés oxidativo dependiente de la vía apoptótica que lleva a la muerte celular, en *Aspergillus fumigatus* y *Saccharomyces cerevisiae* (Fujita *et al.*, 2014; Mani-López *et al.*, 2021).

8.3. Efecto fungicida del aceite esencial de *T. micrantha* en plantas de fresa inoculadas con *N. clavispora*

Pocas son las investigaciones en las que se confirma la actividad antifúngica observada en ensayos *in vitro* con ensayos *in vivo*, utilizando las plantas hospederas de los hongos fitopatógenos, ya que los aceites esenciales o extractos de plantas y fitoquímicos actúan de muchas maneras dependiendo del ensayo, ya que en unos es directo sobre el hongo y en otros está de por medio el hospedero y la aplicación puede verse compleja.

Sin embargo, en esta investigación fue posible la aplicación del aceite esencial de *T. micrantha* en plantas de fresa desafiadas al ataque de *N. clavispora*, observando una relación directa entre la actividad antifúngica *in vitro* y la obtenida en plantas inoculadas.

9. CONCLUSIONES GENERALES

Uno de los aislados obtenidos de plantas de fresa con síntomas de enfermedad asociadas a *Neopestaloptiosis* spp., fue caracterizado micro, macroscópicamente y molecularmente como *N. clavispora*, el cual es patógeno de fresa.

Los aceites esenciales de las tres especies de *Tagetes* (*T. micrantha*, *T. lucida* y *T. lunulata*) presentaron actividad antifúngica sobre el crecimiento *in vitro* de *N. clavispora*. El obtenido de *T. micrantha* mostró la mayor actividad antifúngica, presentando los valores más bajos de CL₅₀ y CL₁₀₀.

El anetol y el estragol son los compuestos mayoritarios de este aceite esencial y se sugiere podrían ser los responsables de esta actividad.

El efecto antifúngico del aceite esencial de *T. micrantha* se observó también en plantas de fresa inoculadas con esporas de *N. clavispora*, lo que confirma su efecto antifúngico tanto *in vitro* como *in vivo*.

10. LITERATURA GENERAL CITADA

- Adams T.M., Armitage A.D., Sobczyk M.K., Bates H.J., Tabima J.F., Kronmiller B.A., Tyler B.M., Grünwald N.J., Dunwell J.M., Nellist C.F., Harrison R.J. (2020).** Genomic investigation of the strawberry pathogen *Phytophthora fragariae* indicates pathogenicity is associated with transcriptional variation in three key races. *Front. Microbiol.*,11: 490.
- Adorjan B., Buchbauer G. (2010).** Biological properties of essential oils: an updated review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25: 407-426.
- Agrios G. (2005).** Plant Pathology. University of Florida, Plant Pathology. Florida: Elsevier.
- Ahmad A., Khan A., Kumar P., Bhatt R.P., Manzoor N. (2011).** Antifungal activity of *Coriaria nepalensis* essential oil by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity against *Candida*. *Yeast*, 28(8): 611-617.
- Akbar B.R., Hosur N.V., Devihalli Ch.M. (2021).** Chemical Characterization of *Schefflera actinophylla* (Endl.) harms essential oil: antifungal and antimycotoxin activities for safe storage of food grains. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 11(1): 60-69.
- Akthar M.S., Degaga B., Azam T. (2014).** Antimicrobial activity of essential oils extracted from medicinal plants against the pathogenic microorganisms: a review. *Issues Biol. Sci, Pharm. Res.*, 2(1): 1-7.
- Ali A., Tabanca N., Amin E., Demirci B., Khan I.A. (2016).** Chemical composition and biting deterrent activity of essential oil of *Tagetes patula* (Marigold) against *Aedes aegypti*. *Natural Product Communications*, 11(10).
- Alves A., Phillips A., Henriques I., Correia A. (2005).** Evaluation of amplified ribosomal DNA restriction analysis as a method for the identification of *Botryosphaeria* species. *FEMS Microbiology*, 245: 221-229.
- Ambrico A., Trupo M., Martino M., Sharma N. (2020).** Essential oil of *Calamintha nepeta* (L.) Savi subsp. *nepeta* is a potential control agent for some postharvest fruit diseases. *Org. Agr.*, 10: 35-48.
- Anaya-Gutiérrez E., Gutiérrez J., Serrato-Cruz M., Vázquez-Sánchez M. (2022).** Leaf anatomy of nine species of *Tagetes* L. (Tageteae: Asteraceae). *Botanical Sciences*, 100 (3): 667-684.
- Angarita-Merchán M., Torres-Caicedo M.I., Díaz-Torres A.K. (2017).** Técnicas de Biología Molecular en el desarrollo de la investigación. Revisión de la literatura. *Revista Habanera de Ciencias Médicas*, 16(5): 796-807.
- Ávalos-García A., Pérez-Urria Carril E. (2009).** Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*. Serie Fisiología Vegetal, 2(3): 119-145.

- Ávila-Sosa R., Gastélum-Reynoso G., García-Juárez M., Meneses-Sánchez M.C., Navarro-Cruz A.R., Dávila-Márquez R.M. (2010).** Evaluation of different mexican plant extracts to control anthracnose. *International Food Research Journal*, 21: 1863-1867.
- Baggio S.J., Forcelini B.B., Wang N., Ruschel G.R., Mertely C.J., Peres A.N. (2021).** Outbreak of leaf spot and fruit rot in florida strawberry caused by *Neopestalotiopsis* spp. *Plant Disease*, 105(2): 305-315.
- Barajas P.J. (2009).** Propiedades plaguicidas de cinco especies del género *Tagetes*. Instituto Politécnico Nacional. Tesis para obtener el grado de Maestro en Ciencias en manejo agroecológico de plagas y enfermedades.
- Barajas-Pérez J., Montes-Belmont R., Castrejón-Ayala F., Flores-Moctezuma H., Serrato-Cruz M.A. (2011).** Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Revista Mexicana de micología*, 34: 85-91.
- Barboza-Corona J.E., De la Fuente-Salcido N.M., Leon M.F. (2012).** Future challenges and prospects of *Bacillus thuringiensis*. En: *Bacillus thuringiensis Biotechnology*, E. Sansinenea (Ed.) 367-381 pp.
- Bauer A., Kirby W., Sherris J., Truck M. (1966).** Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *American Journal of Clinical Phatology*, 45(4): 493- 496.
- Benouali D. (2016).** Extraction et identification des huiles essentielles. Oran: Universite des Sciences et de la Technologie D'Oran.
- Breitmaier E. (2006).** Terpenes: Flavors, Fragences, Pharmacia, Pheromones, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA. Germany.
- Bruneton J. (2003).** Elementos de fitoquímica y farmacognosia 1ª edicieón.; Editorial Acribia S.A. Zaragoza, España. 230-290 pp.
- Buchanan B.B., Gruissem W., Jones R.L. (2015).** *Biochemistry & Molecular Biology of Plant*. 2da (ed.). United Kingdom: John Wiley & Sons, Ltd.
- Burt S. (2004).** Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods. A review. *Int. J. Food Microbiol.*, 94: 223-253.
- Cadby P., Troy W., Vey M. (2002).** Consumer Exposure to Fragrance Ingredients: Providing Estimates for Safety Evaluation. *Regulatory Toxicology and Pharmacology*. Vol. 36, Issue 3. Pp. 246-252. <https://doi.org/10.1006/rtp.2002.1581>.
- Calderón de Rzedowski G., Rzedowski J. (2010).** Flora fanerogámica del Valle de México. Instituto de Ecología, A. C. y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán. (Edición digital: INECOL).
- Camarillo R., Ortega A., Serrato C., Rodríguez H. (2009).** Biological activity of *Tagetes filifolia* (Asteraceae) on *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). *Revista Colombiana de Entomología*, 35(2): 177-184.

- Cázarez-Chávez D. (2017).** Efecto del aceite esencial de *Tagetes lucida* en una biopelícula de quitosano sobre *Botrytis cinerea* en frutos de zarzamora (*Rubus fruticosus* Cv. Tupi). Tesis de Maestría en Ciencias (PIMCB), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Centeno-Briceño S., Carrera-Jaspe Y. (2013).** Actividad antifúngica y antiaflatoxigénica de extractos de *Melissa officinalis* (Lamiaceae) sobre *Aspergillus flavus*. SABER, Revista Multidisciplinaria del Consejo de Investigación de la Universidad de Oriente, 25(2): 185-191.
- Céspedes C.I.J., Avila G., Martínez A., Cerrato B., Calderón–Mugica J.C., Salgado-Garciglia R. (2006).** Antifungal and antibacterial activities of mexican tarragon (*Tagetes lucida*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 54: 3521-3527.
- Chamorro M., Aguado A., de los Santos B. (2016).** First report of root and crown rot caused by *Pestalotiopsis clavispora* (*Neopestalotiopsis clavispora*) on strawberry in Spain. (en línea). Plant Disease, 100(7): 1495.
- Chaudhari A.K., Singh V.K., Das S., Deepika-Prasad J., Dwivedy A.K., Dubey N.K. (2020).** Improvement of in vitro and in situ antifungal, AFB1 inhibitory and antioxidant activity of *Origanum majorana* L. essential oil through nanoemulsion and recommending as novel food preservative. Food and Chemical Toxicology, 143: 111536.
- Chemat F., Lucchesi M.E., Smadja J., Favretto L., Colnaghi G., Visinoni F. (2006).** Microwave accelerated steam distillation of essential oil from lavender: A rapid, clean and environmentally friendly approach. Analytica Chimica Acta, 55(1): 157-160.
- Choi W.I., Lee E.H., Choi B.R., Park M., Ahn Y.J. (2003).** Toxicity of plant essential oils to *Trialeurodes vaporariorum* (Homoptera: Aleyrodidae). Journal of Economic Entomology, 96(5): 1479-1484.
- Ciriminna R., Lomeli-Rodríguez M., Carà P., López-Sánchez J.A, Pagliaro M. (2014).** Limonene: a versatile chemical of the bioeconomy. Chemical Communications, 50: 15288-15296.
- Claire D., Watters N., Gendron L., Boily C., Pépin S., Caron J. (2018).** High productivity of soilless strawberry cultivation under rain shelters. Scientia Horticulturae, 232: 127-138.
- Cordova C., Guillén J., Tuesta T. (2020).** Solvent free microwave extraction of orange essential oil (*Citrus sinensis*), and the effect of the process conditions in its yield, composition and antimicrobial activity. Revista Chilena de Nutrición, 47(6): 965-974.
- DeJesus K. (2019).** Preventative Compositions of *Azadirachta indica* Against *Fusarium oxysporum*. The FASEB Journal, 33: 662.50-662.50.

- Demirci F., Bayramiç P., Göger G., Demirci B., Başer K. (2015).** Caracterización y evaluación antimicrobiana del aceite esencial de *Pinus pinea* L. de Turquía. *Volátiles Naturales y Aceites Esenciales*, 2(2): 39-44.
- Departamento de Botánica, Instituto de Biología (IBUNAM). (2023).** *Tagetes microglossa* Benth., ejemplar de: Herbario Nacional de México (MEXU), Plantas Vasculares. En "Portal de Datos Abiertos UNAM" (en línea), México, Universidad Nacional Autónoma de México. <https://datosabiertos.unam.mx/IBUNAM:MEXU:884088>
- Desam N.R., Al-Rajab A.J., Sharma M., Mylabathula M., Gowkanapalli R.R., Mohammed A. (2019).** Chemical constituents, in vitro antibacterial and antifungal activity of *Mentha*×*Piperita* L. (peppermint) essential oils. *Journal of King Saud University–Science*, 31(4): 528-533.
- Dharmagadda V.S.S., Naik S.N., Mittal P.K., Vasudevan P. (2005).** Larvicidal activity of *Tagetes patula* essential oil against three mosquito species. *Bioresource Technology*, 96: 1235-1240.
- Duke J. (2009).** USDA Phytochemical and Ethnobotanical databases. <http://www.ars-grin.gov/duke/Plants.html>. (Octubre de 2009).
- Elsa-Lundanes L.R. (2013).** *Chromatography: Basic Principles, Sample Preparations and Related Methods*. John Wiley & Sons. Obtenido de <https://books.google.com.co/books?isbn=3527675221>
- Falcón-Rodríguez A., Costales-Mené D., González-Peña F., Nápoles-García M. (2015).** Nuevos productos naturales para la agricultura: las oligosacarinas. *Cultivos Tropicales*, 36(Supl. 1): 111-129.
- Fujita K.-I., Tatsumi M., Ogita A., Kubo I., Tanaka T. (2014).** Anethole induces apoptotic cell death accompanied by reactive oxygen species production and DNA fragmentation in *Aspergillus fumigatus* and *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS J.*, 281: 1304-1313.
- Fulgencio-Negrete R. (2013).** Propiedad antifúngica de compuestos volátiles de tres plantas medicinales (nurite, santa maría y toronjil) sobre hongos patógenos de fresa. Tesis de Maestría en Ciencias (PIMCB), Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo.
- Gadban L.C., Camiletti B.X., Bigatton E.D., Distéfano S.D., Lucini E.I. (2020).** Combinations of *Tagetes filifolia* Lag. essential oil with chemical fungicides to control *Colletotrichum truncatum* and their effects on the biocontrol agent *Trichoderma harzianum*. *Journal of Plant Protection Research*, 60(1): 41-50.
- Gakuubi M.M., Wagacha J.M., Dossaji S.F., Wanzala W. (2016).** Chemical composition and antifungal activity of essential oils of *Tagetes minuta* (Asteraceae) against selected phytopathogenic fungi. *American Journal of Essential Oils and Natural Products*, 4(3): 16-26.

- Gakuya D.W., Itoga S.M., Mbaria J.M., Muthee J.K., Musau J.K. (2013).** Ethnobotanical survey of biopesticides and other medicinal plants traditionally used in Meru central district of Kenya. *Journal of Ethnopharmacology*, 145(2): 547-553.
- Gan H., Wickings K. (2017).** Soil ecological responses to pest management in golf turf vary with management intensity, pesticide identity, and application program. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 246: 66-77.
- Garrido B., Polanco S., Gaitán I., Cáceres A., Paredes M. (2013).** Caracteres farmacognósticos para el control de calidad. *Dominguezia*, 29(2): 25-39.
- Gómez, R. M. (2018).** Fish oil valorization using supercritical carbon dioxide technologies (Doctoral dissertation, Universidad de Burgos).
- González P., Alaniz S., Montelongo M.J., Rauduviniche L., Rebellato J., Silvera-Pérez E., Mondino P. (2012).** First report of *Pestalotiopsis clavispora* causing dieback on blueberry in Uruguay. *Plant Disease*, 96(6): 914-914.
- Guillén-Andrade H., Escalera-Ordaz A.K., Torres-Gurrola G., García-Rodríguez Y.M., Espinosa-García F.J., Tapia-Vargas L.M. (2019).** Identificación de nuevos metabolitos secundarios en *Persea americana* Miller variedad Drymifolia. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 10(spe23): 253-265.
- Gupta P. (2014).** Carotenoids of Therapeutic Significance from Marigold. *Nat Prod Chem Res.*, 2(6): 1000e110.
- Heike V. (2009).** *Tagetes lunulata* - ficha informativa. Malezas de México: *Tagetes lunulata* Ort. <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/tagetes-lunulata/fichas/ficha.htm>
- Hernandes C., Pina E., Taleb-Contini S., Bertoni B., Cestari I., Espanha L., Varanda E, Camilo K., Martinez E., França S., Pereira A. (2017).** *Lippia origanoides* essential oil: an efficient and safe alternative to preserve food, cosmetic and pharmaceutical products. *Applied Microbiology*, 122(4): 900-910.
- Isman M., Grieneisen M. (2014).** Botanical insecticide research: many publications, limited useful data. *Trends in Plant Science*, 19(3): 140-145.
- Jiménez E.V., Mosquera O.M. (2014).** Actividad antifúngica In vitro de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinérea* (Moho gris). *Salud Soc Uptc.*1(2): 16-21.
- Kalagatur-Naveen K., Kamasani-Jalarama R., Siddaiah Ch., Gupta-Vijai K., Krishna K., Mudili V. (2018).** Combinational Inhibitory Action of Hedychium spicatum L. Essential Oil and γ -Radiation on Growth Rate and Mycotoxins Content of *Fusarium graminearum* in Maize: Response Surface Methodology. *Frontiers in Microbiology*, 9: 1511.

- Kedia A., Prakash B., Mishra P., Dwivedy A., Dubey N. (2015).** *Trachyspermum ammi* L. essential oil as plant-based preservative in food system. *Industrial Crops and Products*, 69: 104-109.
- Khan A., Ahmad A., Akhtar F., Yousuf S., Xess I., Khan L.A., Manzoor N. (2011).** Induction of oxidative stress as a possible mechanism of the antifungal action of three phenylpropanoids. *FEMS Yeast Res.*, 11(1): 114-22.
- Kirschbaum D.S., Vicente C.E., Cano-Torres M.A., Gambardella M., Veizaga-Pinto F.K., Antunes L.E.C. (2017).** Strawberry in South America: from the Caribbean to Patagonia. *Acta Hortic.*, 1156: 947-956.
- Leahy J., Mendelsohn M., Kough J., Jones R., Berckes N. (2014).** Biopesticide oversight and registration at the US Environmental Protection Agency. *Biopesticides: state of the art and future opportunities*. American Chemical Society. 3-18 pp.
- Lee J.P., Lee S.W., Kim C.S., Son J.H., Le, K.Y., Ki, H.J., Jun S.J., Moo B.J. (2006).** Evaluation of formulations of *Bacillus licheniformis* for the biological control of tomato grey mould caused by *Botrytis cinerea*. *Biological Control*, 37: 329-337.
- Li Y., Wang Y., Kong W., Yang S., Luo J., Yang M. (2020).** *Illicium verum* essential oil, a potential natural fumigant in preservation of lotus seeds from fungal contamination, *Food and Chemical Toxicology*, 141: 111347.
- Linares E., Bye R., Flores B. (1999).** *Plantas Medicinales de México. Usos y remedios tradicionales*. Instituto de Biología. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F.
- López-López E., Peña-Ortega M.G., Colinas-León M.T., Díaz-Cedillo F., Serrato-Cruz M.Á. (2018).** Fungistasis of essential oil extracted from a *Tagetes lucida* population of Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(2): 329-341.
- López M., Tránsito L. (2004).** Los aceites esenciales. *Ámbito Farmacéutico Fitoterapia*, 88-91.
- López-Vazquez E., Herrera-Oropeza M.A., Lagunes-Arellano M.A., et al. 2017.** Planeación agrícola 2017-2030. Subsecretaría de agricultura, 1: 1-13.
- Lucchesi M.E., Smadja J., Bradshaw S., Louw W., Chemat F. (2007).** Solvent free microwave extraction of *Elletaria cardamomum* L.: A multivariate study of a new technique for the extraction of essential oil. *J. Food Eng.*, 79: 1079-1086.
- Magaldi S., Mata E.S., Hartung de Capriles C., Perez C., Colella M. T., Olaizola C. (2004).** Well diffusion for antifungal susceptibility testing. *International Journal of Infectious Diseases*, 8(1): 39-45.
- Maharachchikumbura S., Guo L., Chukeatirote E., Bahkali A.Y., Hyde K. (2011).** *Pestalotiopsis* – morphology, phylogeny, biochemistry and diversity. *Fungal Diversity*. 50: 167-187.

- Mancini E., Senatore F., Del Monte D., De Martino L., Grulova D., Scognamiglio M., Snoussi M., De Feo V. (2015).** Studies on chemical composition, antimicrobial and antioxidant activities of five *Thymus vulgaris* L. Essential Oils. *Molecules*, 20: 12016-12028.
- Mani-López E., Cortés-Zavaleta O., López-Malo A. (2021).** A review of the methods used to determine the target site or the mechanism of action of essential oils and their components against fungi. *SN Appl. Sci.* 3: 44.
- Márquez A.C., Lara F.O., Esquivel B.R., Mata R.E. (1999).** Plantas medicinales de México II. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D. F.
- Martínez, J, Sulbarán de Ferrer, B, Ojeda de Rodríguez, G, Ferrer, A, & Nava, R. (2003).** Actividad antibacteriana del aceite esencial de mandarina. *Revista de la Facultad de Agronomía*, 20(4), 502-512. Recuperado en 29 de marzo de 2023, de http://ve.scielo.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0378-78182003000400010&lng=es&tlng=es
- Mayolo, K., & Martínez, L. (2012).** Técnicas cromatográficas y su aplicación a estudios de cambios conformacionales, estabilidad y plegamiento de proteínas. *Revista mexicana de ingeniería química*, ISSN 1665-2738.
- Mesa V.A.M., Marín P., Ocampo O., Calle J., Monsalve Z. (2019).** Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, 45(1): 23-30.
- Mohammadi A., Hashemi M., Hosseini S. (2015).** The control of *Botrytis* fruit rot in strawberry using combined treatments of Chitosan with *Zataria multiflora* or *Cinnamomum zeylanicum* essential oil. *J. Food Sci. Technol.*, 52: 7441–7448.
- Morales-Mora L.A., Martínez-Salgado S.J., Valencia de Ita M.A., Andrade-Hoyos P., Silva-Rojas H.V., Romero-Arenas O. (2019).** First report of leaf spot and anthracnose caused by *Pestalotiopsis* sp. on strawberry in Puebla, Mexico. *Plant Dis.*, 103: 2668.
- Moriconi J.I., Fernández E.A., Martínez E., Giulietti A. (2009).** Rendimiento de materia seca y composición del aceite esencial de *Lippia turbinata* Griseb. “poleo” (Verbenaceae), en plantas de San Luis (Argentina)”. *Horticultura Argentina*, 28(65): 34-38.
- Muhammad K., Samina B., Sabira N., Shaheen F., Lubna M., Ahmed M., Khawaja S.A., Ahsana D.F. (2015).** Cytotoxic and antioxidant properties of phenolic compounds from *Tagetes patula* flower, *Pharmaceutical Biology*, 53(5): 672-681.
- Navarro-Rocha J., Burillo J., González-Coloma A. (2017).** Efectos insecticidas y antifúngicos de una nueva variedad de ajeno (*Artemisia absinthium* L.) - ensayos preliminares. *Boletín de la SEA*, 2: 23-25.

- Nazzaro F., Fratianni F., Coppola R., Feo V. (2017).** Essential oils and antifungal activity. *pharmaceuticals* (Basel, Switzerland), 10(4): 86.
- Nongmaithem N. (2014).** Control of post-harvest fungal diseases of guava by essential oil of *Azadirachta indica*. *Indian Journal of Hill Farming*, 27(1): 135-139.
- Guarín O.D., Barajas A.F. (2015).** Hidrodestilación asistida con microondas (MWHD) para la extracción de hidrolatos de plantas aromáticas. *Revista Politécnica*, 11(2): 51-55.
- Ojito-Ramos K., Portal O. (2017).** Metabolitos secundarios de las Plantas, una alternativa para el manejo de enfermedades en cultivos de interés económico. Libro, 1-38.
- Oliveira R., Carvajal-Moreno M., Correa B., Rojo-Callejas F. (2020).** Cellular, physiological and molecular approaches to investigate the antifungal and anti-aflatoxigenic effects of thyme essential oil on *Aspergillus flavus*. *Food Chemistry*, 315: 126096.
- Omar M.S. y Kordali Ş. (2019).** Review of essential oils as antifungal agents for plant fungal diseases. *Ziraat Fakültesi Dergisi*, 14(2): 294-301.
- Ordanza-Beneitez M. (2017).** Biopesticidas: Tipos y aplicaciones en el control de plagas agrícolas. *Agroproductividad*, 10(3): 31-367.
- Ortega L.D. 2001.** Control alternativo de mosca blanca. Folleto técnico. COLPOS, CONACYT y RAPAM. México. 16 p.
- Park K., Han I., Lee S.-M., Choi S.-L., Kim M.C., Lee H. (2019).** Crown and root rot of strawberry caused by *Neopestalotiopsis clavispora* in Korea. *The Korean Journal of Mycology*, 47(4): 427–435.
- Park M.J., Gwaka K.S., Yang K.W., Kim E.B., Jeung J.W., Chang I.G., Choi A. (2009).** Effect of citral, eugenol, nerolidol and α -terpineol on the ultrastructural changes of *Trichophyton mentagrophytes*. *Fitoterapia*, 80: 290–296.
- Pereira de Menezes-Filho A., Cruvinel de Sousa W., Gonçalves de Oliveira-Filho J., de Souza-Castro. (2020).** Antifungal effect of the essential oil from leaves and stems of *Schinus mole* over *Aspergillus* sp. *Rev. Cubana Farm.*, 53(3): 1-14.
- Pérez-Gutiérrez R. M., Hernández-Luna H., Hernández-Garrido S. (2006).** ANTIOXIDANT ACTIVITY OF TAGETES ERECTA ESSENTIAL OIL. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 51(2), 883-886. <https://dx.doi.org/10.4067/S0717-97072006000200010>
- Pérez S., Meriño-Gergichevich C., Guerrero J. (2014).** Detection of *Neofusicoccum nonquaesitum* causing dieback and canker in highbush blueberry from Southern Chile. *Journal of Soil Science and Plant Nutrition*, 14(3): 581-588.

- Pérez M. (2013).** *Tagetes filifolia*. Botánica y Jardines .com. <http://www.botanicayjardines.com/tagetes-filifolia/>
- Petrasch S., Knapp S.J., van Kan J.A.L., Blanco-Ulate B. (2019).** Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20: 877-892.
- Rajvanshi S.K., Dwivedi D.H. (2017).** Phytochemical screening studies of bioactive compounds of African marigold (*Tagetes erecta* L.). *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 6(4): 524-527.
- Rebollar A.A., Silva R.H.V., Fuentes A.D., Acosta G.U., Martínez R.M., Parra R.B.E. (2020).** An emerging strawberry fungal disease associated with root rot, crown rot and leaf spot caused by *Neopestalotiopsis rosae* in Mexico. *APS Publications*, 104(8): 2054-2059.
- Reganold J.P., Andrews P.K., Reeve J.R., Carpenter-Boggs L., Schadt C.W., Alldredge J.R., Ross C.F., Davies N.M., Zhou J. (2010).** Fruit and soil quality and conventional strawberry agroecosystems. *Plos One*, 5(9): e12346.
- Rincón-Enríquez G., Quiñones-Aguilar E.E., Qui-Zapata J.A., Serrato-Cruz M.A. (2012).** Efectividad biológica de extractos de *Tagetes* spp. sobre bacterias fitopatógenas. SNICS-SINAREFI, CIATEJ, México.
- Rodríguez A.M., Alcaraz-Melendez L., Real. Cosio S.M. (2012).** Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. México: Centro de Investigaciones Biológicas del Noroeste, S. C. SAGARPA-CONACYT, 38 P.
- Rodríguez H.C. (2000).** Plantas contra plagas: Potencial práctico del ajo anona, neem, chile y Tabaco. Rapam. México. 133 P.
- Rojas A., Jaramillo L.J.C., Lemus B.M. (2015).** Métodos analíticos para la determinación de metabolitos secundarios de plantas. Machala, Ecuador: Universidad Técnica de Machala.
- Romagnoli C., Bruni R., Andreotti E., Rai M.K., Vicentini C.B., Mares D. (2005).** Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma*. 225: 57-65.
- Roques P., Gakuubi M., Maina A., Wagacha J. (2017).** Antifungal activity of essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehnh. against selected *Fusarium* spp. *International Journal of Microbiology*, 8761610.
- Saad N.Y., Muller C.D., Lobstein A. (2013)** Major bioactivities and mechanism of action of essential oils and their components. *Flavour Fragr. J.*, 28(5): 269–279.
- Sgariglia, M., & Soberón, R. (2010).** CROMATOGRAFÍA: CONCEPTOS Y APLICACIONES. *Revista Arakuku*, ISSN1853-3337.

- Salehi B., Valussi M., Morais-Braga M., Carneiro J., Leal A., Coutinho H., Vitalini S., Kręgiel D., Antolak H., Sharifi-Rad M., Silva N., Yousaf Z., Martorell M., Iriti M., Carradori S., Sharifi-Rad J. (2018).** *Tagetes* spp. essential oils and other extracts: chemical characterization and biological activity. *Molecules* (Basel Switzerland), 23(11): 2847.
- Sánchez M., Venegas J., Romero M., Phillips A.Y., Trapero A. (2003).** *Botryosphaeria* and related taxa causing oak canker in southwestern Spain. *Plant Dis.*, 87: 1515-1521.
- Santamarina P., Roselló J., Chiralt A., Sempere F. (2015).** Antifungal activity and potential use of essential oils against *Fusarium culmorum* and *Fusarium verticilloides*. *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, 18(2): 359-367.
- Saravanakumar D., Karthiba L., Ramjegathesh R., Prabakar K., Raguchander T. (2015).** Characterization of bioactive compounds from botanicals for the management of plant diseases. En: Ganesan S., Vadivel K., Jayaraman J. (ed.). *Sustainable Crop Disease Management Using Natural Products*. Cabi.
- Scalvenzi L., Yaguache-Camacho B., Cabrera- Martínez P., Guerrini A. (2016).** Actividad antifúngica in vitro de aceites esenciales de *Ocotea quixos* (Lam.) Kosterm. y *Piper aduncum* L. *Bioagro*, 28(1): 039-046.
- Schelz Z., Molnar J., Hohmann J. (2006)** Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. *Fitoterapia*, 77: 279-285.
- Scorzoni L., de Paula e Silva A.C.A., Marcos C.M., Assato P.A., de Melo W.C.M.A., de Oliveira H.C., Costa-Orlandi C.B., Mendes-Giannini M.J.S., Fusco-Almeida A.M. (2017).** Antifungal therapy: new advances in the understanding and treatment of mycosis. *Front Microbiol.*, 8: 36.
- Sellam K., Bammou M., Ramchoun M., Bouhlali E.D.T., J'aiti F., Nassiri L., El-Rhaffari L. (2015).** Antifungal potential of the seed and leaf *Foeniculum vulgare* Mill, essential oil in liquid and vapor phase against phytopathogenic fungi. *J. Appl. Pharmaceutical Sci.*, 5(11): 50-54.
- Senanayake I., Maharachchikumbura S., Hyde K., Bath J. (2015).** Towards unraveling relationships in Xylariomycetidae (*Sordariomycetes*). *Fungal Diversity*, 73: 73-144.
- Serrato M.A., Quijano M.L. (1993).** Usos de algunas especies de *Tagetes*: revisión bibliográfica. 1984-1992. In: memorias I Simposio Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible: importancia y contribución de la agricultura tradicional. CEICADAR, Puebla. México. 228-238 pp.
- Serrato-Cruz, M. Á., Díaz-Cedillo, F., & Barajas-Pérez, J. S. (2008).** Composición del aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la región centro-sur de México. *Agrociencia*, 42(3), 277-285.
- Sharma A., Rajendran S., Srivastava A., Sharma S., Kundu B. (2017).** Antifungal activities of selected essential oils against *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici 1322, with

emphasis on *Syzygium aromaticum* essential oil. Journal of Bioscience and Bioengineering, 123(3): 308-313.

Sigillo L., Ruocco M., Gualtieri L. et al. (2020). First report of *Neopestalotiopsis clavispora* causing crown rot in strawberry in Italy. J. Plant Pathol., 102: 281.

Soule J.A. (1996). Novel annual and perennial *Tagetes*. In: progress in new crops. Janick, J. (Ed.). American Society for Horticultural Science Press, Arlington, Virginia. USA. 546-551 pp.

Soylu E.M., Kurt Ş., Soyly S. (2010). In vitro and in vivo antifungal activity of essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology, 143(3): 183-189.

Stashenko E., Martínez J.R. (2009). Algunos aspectos de la detección en cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas. Selectividad e identificación. Scientia Chromatographica, 1(3): 31-49.

Swamy M.K., Akhtar M.S., Sinniah U.R. (2016) Antimicrobial properties of plant essential oils against human pathogens and their mode of action: an updated review. Evid Based Complement. Alternat. Med., 3012462.

Tereschuk M.L., Riera M.V., Castro G.R., Abdala L.R. (1997). Antimicrobial activity of flavonoids from leaves of *Tagetes minuta*. Journal of Ethnopharmacology, 56: 227-232.

The Plant List. (2021). Compositae. Royal Botanic Gardens Kew and Missouri Botanic Garden. Consultado el 17 de junio de 2021.

Torres-Martínez R., Bello-González M.Á., Molina-Torres J., Ramírez-Chávez E., García-Rodríguez Y., Fulgencio-Negrete R., García-Hernández A., López-Gómez R., Martínez-Pacheco M.M., Lara-Chávez B.N., Salgado-Garciglia R. (2014). Efecto de la fertilización sobre el crecimiento y contenido de compuestos volátiles en *Satureja macrostema* (Benth) Briq. Revista Mexicana de Ciencias Forestales, 5(21): 122-134.

Torres-Martínez R., García-Rodríguez Y., Ríos-Chávez P., Saavedra-Molina A., López-Meza J.E., Ochoa-Zarzosa A., Salgado-Garciglia R. (2018). Antioxidant activity of the essential oil and its major terpenes of *Satureja macrostema* (Moc. and Sessé ex Benth.). Pharmacognosy Magazine, 3(4):875-880.

Turner B.L., Nesom G.L. (1993). Biogeography, diversity and endangered or threatened status of Mexican Asteraceae. In: Biological Diversity of Mexico: Origins and Distribution. T P Ramamoorthy, R Bye, A Lot, J Fa (eds). Oxford University Press, New York, USA. 290-299 p.

Turner B.L. (1996). The Comps of Mexico: A systematic account of the family Asteraceae, vol. 6. *Tageteae* and *Athemideae*. Phytologia Memoirs 10.

- Villarreal Q.J. (2003).** Flora Del Bajío Y De Regiones Adyacentes: Familia Compositae Tribu Tageteae, *Tagetes micrantha* Cav. Departamento de Botánica Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Buenavista, Saltillo, Coahuila . Fascículo 113: 63 p.
- Villarreal Q.J.A. (2003).** Familia Compositae, Tribu Tageteae. Flora del Bajío y de Regiones Adyacentes, Fascículo 113: 85 p.
- Villaseñor J.L. (2018).** Diversidad y distribución de la familia Asteraceae en México. *Botanical Sciences*, 96(2): 332–358.
- Villaseñor-Ríos J.L., Espinosa-García F.J. 1998.** Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. 448 p.
- Vinod-Kumar, Mathela C.S., Tewari A.K., Bisht K.S. (2014).** In vitro inhibition activity of essential oils from some Lamiaceae species against phytopathogenic fungi. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 114: 67-71.
- Walia S., Mukhia S., Bhatt V., Kumar R., Kumar R. (2020).** Variability in chemical composition and antimicrobial activity of *Tagetes minuta* L. essential oil collected from different locations of Himalaya. *Industrial Crops and Products*, 150: 112449.
- Xie J., Wei J.G., Wang K.W., Luo J., Wu Y.J., Luo J.T., Yang X.H., Yang X.B. (2020).** Three phytotoxins produced by *Neopestalotiopsis clavispora*, the causal agent of ring spot on *Kadsura coccinea*. *Microbiological Research.*, 238: 126531.
- Yayli N., Fandakli S., Korkmaz B., Barut B., Renda G., Erik I. (2018).** Biological evaluation (antimicrobial, antioxidant, and enzyme inhibitions), total phenolic content and volatile chemical compositions of *Caucasalia macrophylla* (M. Bieb.) B. 2Nord. (Asteraceae). *Journal of Essential Oil-Bearing Plants*, 21(5); 1359–1373.
- Zarate-Escobedo J., Castañeda-González E. L., Cuevas-Sánchez J. A., Carrillo-Fonseca C. L., Ortiz-Torres C., Ibarra-Estrada, E., Serrato-Cruz M.A. (2018a).** Aceite esencial de algunas poblaciones de *Tagetes lucida* Cav. de las regiones norte y sur del estado de México. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 41(2): 199-209.
- Zarate-Escobedo J., Castañeda-González E. L., Cuevas-Sánchez J. A., Carrillo-Fonseca C. L., Mendoza-García E. E., & Serrato-Cruz M. A. (2018b).** Concentrations and application intervals of the essential oil of *Tagetes lucida* Cav. against *Nacobbus aberrans*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(3): 589-600.
- Zeng H., Chen X., Liang J. (2015).** In vitro antifungal activity and mechanism of essential oil from fennel (*Foeniculum vulgare* L.) on dermatophyte species. *J. Med. Microbiol.*, 64: 93-103.
- Zhang X., Guo Y., Guo L., Jiang H., Ji O. (2018).** In vitro evaluation of antioxidant and antimicrobial activities of *Melaleuca alternifolia* essential oil, *BioMed Research International*, 2018: 1-8.

Zhao T., Gao F., Zhou L., Song Y. (2013). Essential oil from *Inula britannica* extraction with SF-CO₂ and its antifungal activity. *Journal of Integrative Agriculture*, 12(10): 1791-1798.