



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO



**DEPARTAMENTO DE FITOTECNIA
COORDINACIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS EN HORTICULTURA**

**DESTILADOS Y HOMEOPÁTICOS DE *Tagetes* PARA
SU APROVECHAMIENTO EN LA HORTICULTURA**

TESIS

**Que como requisito parcial para
obtener el grado de:**

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

Presenta:

MIGUEL ANGEL RUIZ GONZALEZ



APROBADA



**Bajo la supervisión de: DR. MIGUEL ANGEL SERRATO
CRUZ**



Chapingo, Estado de México, diciembre de 2024

DESTILADOS Y HOMEOPÁTICOS DE *Tagetes* PARA SU APROVECHAMIENTO EN LA HORTICULTURA

Tesis realizada por **MIGUEL ANGEL RUIZ GONZALEZ** bajo la supervisión del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTOR EN CIENCIAS EN HORTICULTURA

DIRECTOR:



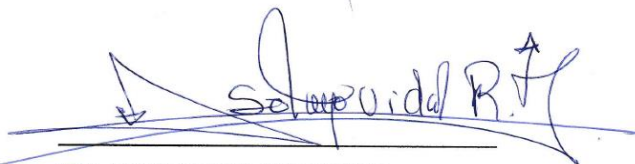
DR. MIGUEL ANGEL SERRATO CRUZ

ASESORA:



DRA. ERNESTINA VALADEZ MOCTEZUMA

ASESOR:



DR. RONEY SOLANO VIDAL

LECTOR EXTERNO:



DR. SABINO HONORIO MARTÍNEZ TOMAS

CONTENIDO

ÍNDICE DE CUADROS	viii
ÍNDICE DE FIGURAS	ix
MATERIAL SUPLEMENTARIO	xii
AGRADECIMIENTOS	xiii
DATOS BIOGRÁFICOS	xiv
RESUMEN GENERAL	1
GENERAL ABSTRACT	1
CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. Objetivos	2
1.1.1. General	2
1.1.2. Específicos	2
CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Enfermedades fungosas	4
2.1.1 Fitopatógenos de importancia económica	4
2.1.2 Control químico	5
2.1.3 Control con extractos de plantas	5
2.2 El género <i>Tagetes</i>	6
2.2.1 Aceites esenciales	6
2.2.1.1 Uso de surfactantes	7
2.2.2 Hidrolatos	8
2.3 Agrohomeopatía	8

2.4	Transcriptómica	10
2.5	Literatura citada.....	10
CAPÍTULO III: Destilados y aceite homeopático de <i>Tagetes remotiflora</i> : efecto en <i>Botrytis cinerea</i>		24
3.1	Resumen	24
3.2	Introducción	26
3.3	Materiales y métodos.....	29
3.3.1	Muestro del material vegetal	29
3.3.2	Extracción de aceite esencial e hidrolato	30
3.3.3	Identificación de compuestos químicos en aceite esencial	30
3.3.4	Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i>	31
3.3.5	Identificación de <i>B. cinerea</i>	32
3.3.6	Preparación de tratamientos	32
3.3.7	Diseño experimental.....	33
3.3.8	Registro de datos	33
3.3.9	Análisis de datos	34
3.3.10	Análisis Probit.....	34
3.4	Resultados y discusión	35
3.5	Conclusiones	43
3.6	Literatura citada.....	44
CAPÍTULO IV: Composición química de hidrolatos de <i>Tagetes</i> y evaluación <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> contra hongos asociados a enfermedades en fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)		50
4.1	Resumen	50
4.2	INTRODUCCIÓN.....	51
4.3	MATERIALES Y MÉTODOS	53

4.4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
4.5	CONCLUSIONES	66
4.6	LITERATURA CITADA	66
CAPÍTULO V: Compuestos químicos y actividad antifúngica de aceite esencial de <i>Tagetes lucida</i> contra <i>Botrytis cinerea</i>		75
5.1	Resumen	76
5.2	Introducción	78
5.3	Materiales y métodos.....	80
5.3.1	Material biológico.....	80
5.3.2	Extracción de aceite esencial	80
5.3.3	Identificación de compuestos químicos	80
5.3.4	Bioensayo <i>in vitro</i>	81
5.3.5	Diseño experimental y análisis de datos	82
5.4	Resultados y discusión	82
5.4.1	Compuestos químicos	82
5.4.2	Bioensayo <i>in vitro</i>	86
5.5	Conclusiones	91
5.6	Bibliografía.....	92
CAPÍTULO VI: Composición química del aceite esencial de <i>Tagetes linifolia</i> , evaluación <i>in vitro</i> y en frutos de fresa contra <i>Botrytis cinerea</i>		97
6.1	RESUMEN.....	97
6.2	Introducción	98
6.3	Material y Métodos	99
6.3.1	Extracción y análisis químico del aceite esencial	99
6.3.2	Evaluación <i>in vitro</i>	99
6.3.3	Evaluación de concentraciones Probit en conidios.....	99

6.3.4	Evaluación de concentraciones Probit en frutos.....	100
6.3.5	Análisis de datos	100
6.4	Resultados y Discusión	101
6.4.1	Compuestos químicos del aceite esencial.....	101
6.4.2	Evaluación <i>in vitro</i>	102
6.4.3	Análisis Probit.....	103
6.4.4	Evaluación de concentraciones Probit en conidios.....	103
6.4.5	Evaluación de concentraciones Probit en frutos.....	104
6.5	Conclusiones	105
6.6	Referencias	106
CAPÍTULO VII: Perfil transcriptómico de <i>Botrytis cinerea</i> en respuesta a la actividad antifúngica del hidrolato de <i>Tagetes remotiflora</i>		111
7.1	Resumen	111
7.2	Introducción	112
7.3	Materiales y métodos.....	114
7.3.1	Pruebas de inhibición <i>in vitro</i> contra <i>B. cinerea</i>	114
7.3.1.1	Evaluación en medio PDA.....	114
7.3.1.2	Evaluación en medio líquida NYDA.....	115
7.3.2	Extracción de ARN	115
7.3.3	Secuenciación, mapeo y anotación	116
7.3.4	Análisis de ontología génica (GO) y rutas KEGG	116
7.4	Resultados.....	117
7.4.1	Pruebas de inhibición <i>in vitro</i> contra <i>B. cinerea</i>	117
7.4.1.1	Evaluación en medio PDA.....	117
7.4.1.2	Evaluación en medio líquida NYDA.....	117
7.4.2	Secuenciación y mapeo	118

7.4.3	Expresión diferencial de genes	119
7.4.4	Anotación de los genes diferencialmente expresados.....	120
7.4.4.1	Enriquecimiento de las rutas KEGG.....	120
7.4.4.2	Análisis de ontología de genes.....	123
7.5	Discusión	125
7.5.1.1	Inhibición <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i>	125
7.5.1.2	Perfil transcriptómico de <i>B. cinerea</i> en respuesta al hidrolato y Tween 20	127
7.5.1.3	Enriquecimiento de rutas KEGG debido al hidrolato	129
7.5.1.4	Enriquecimiento de rutas KEGG debido a Tween 20	130
7.5.1.5	Enriquecimiento de categorías GO debido al hidrolato y Tween 20	132
7.6	Conclusiones	135
7.7	Literatura citada.....	135
CAPÍTULO VIII: DISCUSIÓN GENERAL.....		148
8.1	Literatura citada.....	150
CAPÍTULO IX: CONCLUSIONES GENERALES		154
CAPÍTULO X: MATERIAL SUPLEMENTARIO		156

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Estudios sobre actividad antifúngica de aceites esenciales con especies de <i>Tagetes</i>	7
Cuadro 2. Fórmulas para calcular las variables evaluadas.....	34
Cuadro 3. Dosis mínimas de inhibición para <i>B. cinerea</i> , estimadas por análisis probit a los cinco días de crecimiento.	41
Cuadro 4. Abundancia relativa (%) e índices de Kovats (IK) $\pm$ desviación estándar de compuestos químicos encontrados en hidrolatos de <i>Tagetes coronopifolia</i> , <i>T. minuta</i> , <i>T. parryi</i> y <i>T. terniflora</i> analizados por GC/MSD.....	59
Cuadro 5. Porcentaje de inhibición <i>in vitro</i> de micelio de hongos después de la aplicación de hidrolatos de especies de <i>Tagetes</i>	63
Cuadro 6. Abundancia relativa (%) de compuestos químicos en aceite esencial de <i>Tagetes lucida</i> , mediante Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS) e índice de Kovats (IK).....	83
Cuadro 7. Compuestos químicos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de <i>T. lucida</i> evaluada por Zarate-Escobedo <i>et al.</i> (2018)	85
Cuadro 8. Valores de medias de las variables porcentaje de inhibición y velocidad de crecimiento.....	87
Cuadro 9. Concentraciones letales (CL) y límites de confiabilidad obtenidos con el aceite esencial de <i>T. lucida</i> evaluado en <i>B. cinerea</i>	90
Cuadro 10. Chemical compounds and relative abundance (RA) in <i>T. linifolia</i> essential oil.	101
Cuadro 11. Lethal concentrations LC50 and LC90 of the essential oil of <i>T. linifolia</i> obtained by Probit analysis.	103
Cuadro 12. Incidence and severity of <i>B. cinerea</i> in strawberry fruits treated with essential oil LC90 and LC50 and refrigerated for 15 days.	104

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Cromatograma que muestra los picos y tiempos de retención de compuestos identificados en muestras de aceite esencial de <i>T. remotiflora</i>	35
Figura 2. Efecto del aceite esencial de <i>T. remotiflora</i> en el crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> a los cinco días. FC: fungicida comercial, Tw20: Tween 20 0.1 %, 2: aceite esencial 2 %, 1: aceite esencial 1 %, 0.5: aceite esencial 0.5 %, 0.1: aceite esencial 0.1 %, 0.01: aceite esencial 0.01 %, 0.001: aceite esencial 0.001 %, 0.0001: aceite esencial 0.0001 %. Medias con letras iguales en cada variable no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).	37
Figura 3. Efecto del hidrolato de <i>T. remotiflora</i> en el crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> a los cinco días. FC: fungicida comercial, H25: hidrolato 25 %, H50: hidrolato 50 %, H75: hidrolato 75 %, H100: hidrolato 100 %. Medias con letras iguales en cada variable no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).	39
Figura 4. Efecto de aceite esencial homeopático de <i>T. remotiflora</i> en el crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> a los cinco días. CH: escala de dilución centesimal Hahnemanniana. Medias con letras iguales en cada variable no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).	42
Figura 5. Cromatogramas de hidrolatos de <i>Tagetes parryi</i> (Tp), <i>T. terniflora</i> (Tt), <i>T. coronopifolia</i> , (Tc) y <i>T. minuta</i> (Tm), donde se observan los picos de los compuestos identificados.....	59
Figura 6. Incidencia de <i>B. cinerea</i> , <i>R. solani</i> , <i>F. oxysporum</i> y <i>P. capsici</i> en frutos (A) y flores (B) de fresa a los tres días posteriores a su inoculación en plantas testigo (TO) y sometidas a tratamientos con hidrolatos al 100 % de <i>Tagetes coronopifolia</i> (H100C), <i>T. minuta</i> (H100M), <i>T. parryi</i> (H100P) y <i>T. terniflora</i> (H100T).....	65
Figura 7. Crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> a los cinco días en cajas Petri con los tratamientos. A: Testigo, B: Fungicida comercial, C: Aceite esencial 2 %, D: Aceite esencial 1 %, E: Aceite esencial 0.5 %, F: Aceite esencial 0.1 %, G: Tween	

20 2 %, H: Tween 20 1 %, I: Tween 20 0.8 %, J: Tween 20 0.5 %, K: Tween 20 0.3 %, L: Tween 20 0.1 %.....	90
Figure 8. Inhibition of mycelial growth of <i>B. cinerea</i> with the essential oil of <i>T. linifolia</i> . Means with equal letters are not statistically different (Tukey < 0.05). TO: control, FC: commercial fungicide Cabrio C, concentration of essential oil used (v/v): 1, 0.5, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001.	102
Figure 9. Germination of <i>B. cinerea</i> conidia on PDA medium with lethal concentration LC50, Tween 80 (TW80) and control (TO). The treatment with lethal concentration LC90 is not included since there was no germination of conidia.	104
Figure 10. Protective effect of <i>T. linifolia</i> essential oil fifteen days after incubation on inoculated and non-inoculated fruits. LC50 and LC90: Probit concentrations, TO: control, I: inoculated fruits.	105
Figura 11. Inhibición del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> a los cinco días debido al efecto de los tratamientos aceite esencial 0.5 % (AE), hidrolato 100 % (H), aceite homeopático 6 CH (AH), Tween 20 0.1 % (TW) en comparación con el testigo (TO). Medias $\pm$ desviación estándar (n=5) con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).	117
Figura 12. Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en medio líquido NYDA con los tratamientos de aceite esencial 0.5 % (AE), hidrolato 100 % (H), aceite homeopático 6 CH (AH) y Tween 20 0.1 % (TW) en comparación con el testigo (TO). Medias $\pm$ desviación estándar (n=5) con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).	118
Figura 13. Gráfico MDS que muestra la variación de expresión de genes de <i>Botrytis cinerea</i> obtenida a partir de los datos RNA-seq a las 48 h en respuesta a los tratamientos hidrolato 100 % (H1, H2, H3), aceite homeopático 6 CH (AH1, AH2, AH3), Tween 20 0.1 % (TW1, TW2, TW3) y el testigo (TO1, TO2, TO3).	119
Figura 14. Número de genes diferencialmente expresados (DEG; $ \log FC > 1$ y valor p ajustado < 0.05) en <i>Botrytis cinerea</i> debido al efecto del hidrolato y Tween 20 en comparación con el testigo.	120

Figura 15. Mapas de calor del perfil de expresión de los genes relacionados con las rutas KEGG enriquecidas en <i>Botrytis cinerea</i> en respuesta al hidrolato 100 % (H1, H2, H3) en comparación con el testigo (TO1, TO2, TO3). A: degradación de valina, leucina e isoleucina, B: metabolismo del propanoato, C: metabolismo del azufre. Los mapas de calor fueron contruidos con base en la puntuación Z. El color rojo indica genes sobre-expresados y el color azul indica genes sub-expresados, la intensidad de los colores representa el nivel de expresión.....	121
Figura 16. Mapas de calor del perfil de expresión de los genes relacionados con las rutas KEGG enriquecidas en <i>Botrytis cinerea</i> en respuesta a Tween 20 (TW1, TW2, TW3) en comparación con el testigo (TO1, TO2, TO3). A: biosíntesis de ácidos grasos insaturados, B: metabolismo de ácidos grasos, C: degradación de ácidos grasos. Los mapas de calor fueron contruidos con base en la puntuación Z. El color rojo indica genes sobre-expresados y el color azul indica genes sub-expresados, la intensidad de los colores representa el nivel de expresión.....	122
Figura 17. Mapas de calor del perfil de expresión de los genes relacionados con las rutas KEGG enriquecidas en <i>Botrytis cinerea</i> en respuesta a Tween 20 (TW1, TW2, TW3) en comparación con el testigo (TO1, TO2, TO3). A: metabolismo del glioxilato y dicarboxilato, B: peroxisoma. Los mapas de calor fueron contruidos con base en la puntuación Z. El color rojo indica genes sobre-expresados y el color azul indica genes sub-expresados, la intensidad de los colores representa el nivel de expresión.	123
Figura 18. Mapas de calor del perfil de expresión de los genes relacionados con la “desintoxicación oxidativa celular” en <i>Botrytis cinerea</i> en respuesta al hidrolato (H1, H2, H3) y a Tween 20 (TW1, TW2, TW3) en comparación con el testigo (TO1, TO2, TO3). Los mapas de calor fueron contruidos con base en la puntuación Z. El color rojo indica genes sobre-expresados y el color azul indica genes sub-expresados, la intensidad de los colores representa el nivel de expresión.	125

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Figura suplementaria 1. DEG comunes y únicos en los tratamientos hidrolato y Tween 20.	156
Cuadro suplementario 1. Total de lecturas de entrada y lecturas limpias después del control de calidad y mapeo sobre el genoma de referencia.	156
Cuadro suplementario 2. Rutas KEGG y términos GO enriquecidos debido al hidrolato.	157
Cuadro suplementario 3. Rutas KEGG y términos GO enriquecidos debido al Tween 20.	159

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Autónoma Chapingo, por permitirme continuar con mi formación académica y profesional.

A los miembros de mi comité asesor: Dr. Miguel Angel Serrato Cruz, Dr. Roney Solano Vidal y Dra. Ernestina Valadez Moctezuma por su asesoría y apoyo en la realización de esta investigación.

Al Dr. Sabino Honorio Martínez Tomas por el apoyo en la revisión de la tesis.

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por el financiamiento otorgado

GRACIAS

DATOS BIOGRÁFICOS

DATOS PERSONALES

Nombre	Miguel Angel Ruiz Gonzalez
Fecha de nacimiento	09 de abril de 1993
Lugar de nacimiento	Oaxaca
Cédula profesional	12860801



DESARROLLO ACADÉMICO

Maestría	Maestría en Ciencias en Productividad en Agroecosistemas, TecNM/Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca
Licenciatura	Licenciado en Biología, TecNM/Instituto Tecnológico del Valle de Oaxaca

RESUMEN GENERAL

Destilados y homeopáticos de *Tagetes* para su aprovechamiento en la horticultura

Los compuestos bioactivos presentes en las plantas son eficaces para controlar enfermedades fungosas y se plantean como una alternativa a los fungicidas sintéticos. El objetivo fue evaluar aceite esencial, hidrolato y sustancias homeopáticas de especies de *Tagetes* contra fitopatógenos, *in vitro* e *in vivo*. Como la determinación del perfil transcriptómico de *Botrytis cinerea* en respuesta al efecto del hidrolato y de Tween 20. Los aceites esenciales y los hidrolatos, mostraron efecto antiesporulante, fungicida y fungistático *in vitro* en *B. cinerea*. *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora capsici* fueron menos susceptibles a los hidrolatos. El hidrolato de *T. parryi* fue efectivo como tratamiento preventivo en plantas de fresa en floración y fructificación. El aceite esencial de *T. linifolia* tuvo efecto protector en frutos de fresa con madurez comercial. Las sustancias homeopáticas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 60 y 200 CH) derivadas de *T. remotiflora* tuvieron un menor efecto sobre todos los fitopatógenos evaluados. En el análisis transcriptómico realizado con *B. cinerea* se encontraron 1,662 DEG, de los cuales 1,314 fueron sub-expresados y 348 sobre-expresados debido al efecto del hidrolato. Con Tween 20 se identificaron 791 DEG, 456 sub-expresados y 335 sobre-expresados. En el tratamiento homeopático no se encontraron DEG. Debido a la inhibición severa del hongo con el tratamiento aceite esencial no se pudo obtener RNA de suficiente cantidad y calidad para su secuenciación. El hidrolato y Tween 20 afectaron de manera distinta a *B. cinerea*. El hidrolato afectó a los aminoácidos, propanoato y metabolismo del azufre. Mientras que Tween 20 afectó a los ácidos grasos y el peroxisoma. Tanto los aceites esenciales como los hidrolatos tienen efectos diversos en los hongos, estos afectaron procesos diferentes.

Palabras clave: Aceite esencial, hidrolato, enfermedad fungosa, inhibición, transcriptoma, Tween 20.

Tesis de Doctorado en Ciencias, Doctorado en Ciencias en Horticultura, Universidad Autónoma Chapingo.

Autor: Miguel Ángel Ruíz González.

Director de tesis: Dr. Miguel Angel Serrato Cruz.

GENERAL ABSTRACT

Distillates and homeopathics of *Tagetes* for use in horticulture

Bioactive compounds present in plants are effective in controlling fungal diseases and are proposed as an alternative to synthetic fungicides. The objective was to evaluate essential oil, hydrolate and homeopathic substances of *Tagetes* species against phytopathogens, *in vitro* and *in vivo*. As the determination of the transcriptomic profile of *Botrytis cinerea* in response to the effect of the hydrolate and Tween 20. The essential oils and hydrolates showed *in vitro* antispore, fungicidal and fungistatic effect on *B. cinerea*. *Rhizoctonia solani*, *Fusarium oxysporum* and *Phytophthora capsici* were less susceptible to hydrolates. *T. parryi* hydrolate was effective as a preventive treatment on flowering and fruiting strawberry plants. The essential oil of *T. linifolia* had a protective effect on commercially mature strawberry fruit. The homeopathic substances (1, 2, 3, 4, 5, 6, 60 and 200 CH) derived from *T. remotiflora* had a lesser effect on all the phytopathogens evaluated. In the transcriptomic analysis performed with *B. cinerea*, 1,662 DEGs were found, of which 1,314 were down-regulated and 348 up-regulated due to hydrolate effect. With Tween 20, 791 DEGs were identified, 456 down-regulated and 335 up-regulated. No DEGs were found in the homeopathic treatment. Due to the severe inhibition of the fungus with the essential oil treatment it was not possible to obtain RNA of sufficient quantity and quality for sequencing. Hydrolate and Tween 20 affected *B. cinerea* differently. Amino acids, propionate and sulfur metabolism were affected by hydrolate. While Tween 20 affected fatty acids and peroxisome. Both essential oils and hydrolates have diverse effects on fungi as they affect different processes.

Key words: Essential oil, hydrolate, fungal disease, inhibition, transcriptome, Tween.

CAPÍTULO I: INTRODUCCIÓN GENERAL

Las plantas aromáticas tienen un aprovechamiento debido a que poseen metabolitos secundarios con actividad biológica (Pandita & Pandita, 2021). El recurso fitogenético *Tagetes* (Asteraceae) incluye especies aromáticas con abundantes compuestos químicos y con potencial para formular insumos contra patógenos de cultivos hortícolas (Serrato Cruz et al., 2014). Para extraer estos compuestos bioactivos el tejido fresco o seco se somete a un proceso de hidrodestilación (Akdağ & Öztürk, 2019), el producto principal de la hidrodestilación es el aceite esencial y un subproducto hidrolato (Jakubczyk et al., 2021).

Aunque se ha demostrado que los extractos derivados de las plantas de *Tagetes* tienen actividad bactericida (Camacho-Campos et al., 2019), nematocida (Bhattacharyya, 2017), insecticida (López et al., 2011) y fungicida (López et al., 2018), aún falta complementar la exploración fitoquímica del género y diversificar sus usos en la agricultura. Los estudios realizados con *Tagetes* principalmente han sido con aceites esenciales (López et al., 2018). Con respecto a hidrolatos, solo existen antecedentes sobre los compuestos químicos de *T. minuta*, *T. mendocina* y *T. elliptica* (Álvarez et al., 2022; Lima et al., 2009; Rajeswara et al., 2006). Por ello, se requiere investigación sobre otras especies del género para explorar su potencial como insumos antifúngicos y de los aceites esenciales conformar una alternativa para sustituir a los fungicidas sintéticos en la agricultura, porque estos han generado preocupación sobre la salud humana y el ambiente (Wu et al., 2023).

Por otra parte, los aceites esenciales son susceptibles a la luz, calor, pH y oxígeno, por ello, se requiere el uso de surfactantes para estabilizar sus características mediante emulsiones (Medeleanu et al., 2023). También, los

surfactantes se usan para preparar suspensiones de esporas (Medeleanu et al., 2023). Sin embargo, pueden tener un efecto sinérgico o adicional a los aceites esenciales (Hamzah et al., 2018; Lee et al., 2023). Por lo que se recomienda el uso de concentraciones bajas (< 0.3 %).

Otra alternativa a los agroquímicos es la agrohomeopatía, la cual es un campo emergente, no obstante, con su enfoque sostenible se perfila como un área importante para desarrollar investigación y evaluar su eficacia en diferentes cultivos afectados por patógenos (Surekha & Maniprasad, 2023). Existen antecedentes prometedores sobre el uso de aceites esenciales de *Eucalyptus citriodora* y *Cymbopogon citratus* en su modalidad de homeopáticos contra *Alternaria solani* y *Corynespora cassiicola* (Batista et al., 2017). Considerando este antecedente y el efecto fungistático que tienen algunos aceites esenciales de especies de *Tagetes* (López et al., 2018), se propone la exploración de aceites esenciales de *Tagetes* en su modalidad de homeopáticos que hasta la fecha no se había estudiado. Es importante considerar que otros homeopáticos como el azufre, “nosode” de *Sclerotinia sclerotiorum* y calcárea carbónica, pueden inhibir de forma parcial a *Sclerotinia sclerotiorum* (Botelho & Ronzella, 2021). También *Arnica montana* y *Thuja occidentalis* preparadas homeopáticamente mejoran el crecimiento de leguminosas y reducen la incidencia de *Rhizoctonia solani*, *Fusarium* spp. y *Macrophomina phaseolina* (Hanif & Dawar, 2015).

Aunque el efecto de sustancias homeopáticas se ha comprobado en algunos estudios (Meneses, 2017), aún falta investigar su efecto sobre otros hongos causantes de enfermedades y que afectan el rendimiento y calidad de los cultivos (Nazarov et al., 2020; Siraj et al., 2023). Para continuar con la evaluación de aceites esenciales, hidrolatos y de sustancias homeopáticas, en este estudio se investigó el efecto de insumos provenientes de especies de *Tagetes* contra *Rhizoctonia solani*, *Botrytis cinerea*, *Phytophthora capsici* y *Fusarium oxysporum*, patógenos que causan enfermedades en varios cultivos a nivel mundial y que tienen un impacto importante en los rendimientos, en la calidad y en el desarrollo económico no solamente de la producción hortícola (An et al., 2023).

Otro aspecto importante por conocer es el mecanismo de acción de las sustancias homeopáticas (Khuda-Bukhsh, 1997). Desde el año 1997 se propuso la hipótesis: “los homeopáticos actúan mediante la regulación de la expresión génica” (Khuda-Bukhsh, 1997). Sin embargo, hasta la fecha no existe evidencia molecular suficiente y contundente relacionada con el mecanismo de su efecto. El estudio del transcriptoma de un organismo ofrece respuestas a este tipo de situaciones, se puede conocer el efecto a nivel de genes en respuesta a condiciones específicas (Blumenberg, 2019). Marotti et al. (2014) haciendo un análisis transcriptómico de coleóptilos de trigo cultivados a partir de semillas envenenadas con arsénico homeopático, comprobaron que sí existen efectos a nivel de genes. Considerando que los estudios con sustancias homeopáticas cada vez son más numerosos e incluyen a varios organismos (Khuda-Bukhsh & Pathak, 2008), es importante considerar estudios que involucren tecnologías avanzadas, como la secuenciación de nueva generación, que tiene precisión para conocer los perfiles de expresión génica (Blumenberg, 2019). La transcriptómica que se ha utilizado para comprender el efecto de aceites esenciales contra hongos (Jiang et al., 2021). Sin embargo, con relación al efecto de los hidrolatos y aceites esenciales homeopáticos contra hongos aún no existen antecedentes.

1.1. Objetivos

1.1.1. General

Evaluar *in vitro* e *in vivo* aceites esenciales, hidrolatos y sustancias homeopáticas de especies de *Tagetes* contra fitopatógenos de importancia hortícola y explorar el efecto antifúngico sobre la expresión de genes en *Botrytis cinerea*.

1.1.2. Específicos

Caracterizar compuestos químicos en aceites esenciales e hidrolatos en especies de *Tagetes*.

Evaluar *in vitro* e *in vivo* el efecto de aceites esenciales, hidrolatos y aceites homeopáticos de *Tagetes* contra hongos asociados con enfermedades en plantas de fresa.

Determinar la expresión de genes en *B. cinerea* en respuesta a la actividad antifúngica del hidrolato de *T. remotiflora* y de Tween 20.

CAPÍTULO II: REVISIÓN DE LITERATURA

Alrededor de 5000 especies de plantas aromáticas y medicinales contienen compuestos químicos con actividad biológica (Pandita & Pandita, 2021). Esto ofrece una oportunidad para explorar y desarrollar nuevos productos antifúngicos para el manejo de enfermedades en las plantas y una alternativa a los fungicidas químicos (Şenkal, 2020).

2.1 Enfermedades fungosas

Los hongos causantes de enfermedades fungosas ocasionan pérdidas económicas, por ello, desde 1940 se utilizan fungicidas para proteger o remediar los daños causados a los cultivos (El-Baky & Amara, 2021). Las aplicaciones continuas de estos productos han generado resistencia en varios hongos, además, residuos tóxicos y contaminantes (El-Baky & Amara, 2021). Actualmente, son la principal estrategia en el manejo de las enfermedades de las plantas, aunque, el uso de compuestos naturales son prometedores para servir como nuevos fungicidas (Thind, 2021).

2.1.1 Fitopatógenos de importancia económica

Los patógenos fúngicos de las plantas se dividen en dos grupos principales: patógenos biotróficos y necrotróficos (Doehlemann et al., 2017). Dentro de los principales patógenos de plantas se incluye a *Botrytis cinerea* (necrótrofo), *Fusarium oxysporum* (biotrofo-hemibiotrófico) y *Rhizoctonia solani* (necrótrofo) (Dean et al., 2012). El oomiceto *Phytophthora capsici* (hemibiotrófico), también es de importancia mundial, daña cultivos importantes de solanáceas y cucurbitáceas (Reyes-Tena et al., 2020).

Estos organismos pueden causar la pérdida total de los cultivos por pudriciones de la raíz, tizón del tallo y del follaje, pudrición del fruto, marchitamiento, daños postcosecha y muerte de la planta (Sanogo et al., 2023). Su control se vuelve un

desafío constante debido a su capacidad para desarrollar estrategias de defensa que disminuyen o neutralizan el efecto de varios fungicidas (Khadiri et al., 2024).

2.1.2 Control químico

El carbamato de metil-benzimidazol, dicarboximidas, anilinopirimidinas, fenilpirroles, inhibidores externos de quinona e inhibidores de succinato deshidrogenasa son los principales fungicidas utilizados contra *B. cinerea* (Shao et al., 2021). Se ha comprobado que varios aislados de este patógeno son resistentes (Shao et al., 2021).

El control químico de *F. oxysporum* se basa en bencimidazoles y clorotalonil (González-Oviedo et al., 2022). También con los fungicidas Saaf 75 WP (Carbendazim 12 % y Mancozeb 63 %) y Antracol 70 WP (Propineb 70 %) (Poromarto et al., 2023). Su eficacia es menor al 50 %, por ello, se realizan aplicaciones periódicas (3-5 días) y con ello la generación de resistencia del patógeno (Poromarto et al., 2023).

R. solani se puede controlar con azoxistrobina, tifluzamida, tebuconazol y epoxiconazol (Wang et al., 2018). La misma situación ha previsto el desarrollo de nuevos fungicidas como el SYP-14288, un fungicida que funciona como un desacoplador de la fosforilación oxidativa y controla al menos 32 fitopatógenos (Cheng et al., 2023).

P. capsici se controla de forma eficiente con Metalaxil-M y Acibenzolar-S-metil, aunque, la aplicación de Fosetil-Al y Fosfonato potásico han dejado de ser funcionales (Godínez-Paoli et al., 2020). La resistencia a los fungicidas aumenta su consumo y con ello una situación preocupante para el ambiente y el humano (Thind, 2021).

2.1.3 Control con extractos de plantas

Una alternativa para aprovechar los compuestos bioactivos de las plantas es someterlas a procesos de hidrodestilación (Kaur & Kaur, 2023). El producto principal es el aceite esencial y el subproducto llamado hidrolato que también contiene compuestos bioactivos (Kaur & Kaur, 2023). Tanto los aceites

esenciales como el hidrolato son efectivos en el control de algunos hongos de importancia económica (Ramírez et al., 2017). Los estudios con aceites esenciales son amplios, su efecto contra hongos se ha demostrado *in vitro* e *in vivo* (Bechir et al., 2023; Jahani et al., 2020). Se conocen alrededor de 3000 aceites esenciales provenientes principalmente de las familias botánicas Asteraceae, Lamiaceae, Apiaceae, Annonaceae, Rutaceae, Burseraceae, Zingiberaceae, Poaceae, Myrtaceae, Illiciaceae, Lauraceae, Coriariaceae, Cupressaceae, Rosaceae, Euphorbiaceae y Piperaceae (Nazzaro et al., 2017). Los hidrolatos tienen menor aplicación contra fitopatógenos, su uso se centra principalmente como saborizantes en alimentos o bebidas (D'Amato et al., 2018).

La diversidad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales e hidrolatos es garantía de efectos antifúngicos sobre hongos y oomicetos (Parikh et al., 2021). Además, su efecto multi sitio en las células fúngicas podría relacionarse con una menor posibilidad de generar resistencia (Mani-López et al., 2021).

A continuación, se menciona la importancia del género *Tagetes* (Asteraceae) desde el punto de vista de su aprovechamiento de aceites esenciales e hidrolatos como insumos antifúngicos.

2.2 El género *Tagetes*

El género incluye alrededor de 50-58 especies. En México se estima la presencia de 35 especies (60.3 % del total) dentro de las cuales, al menos 10 son endémicas. La mayoría son plantas aromáticas, herbáceas o arbustivas (Bolaños, 2022; Serrato Cruz et al., 2014).

2.2.1 Aceites esenciales

Los aceites esenciales de *Tagetes* contienen monoterpenos oxigenados, sesquiterpenos, terpenoides, fenilpropanoides, quetonas, aldehídos, esterres, alcoholes, diterpenos y compuestos fenólicos (Salehi et al., 2018). Alrededor de ocho especies se han evaluado contra 27 hongos asociados con daños en las plantas y pérdidas en la producción (Cuadro 1). De las especies con distribución en México solo se ha estudiado el efecto antifúngico del 22.8 % del total (35

especies). *T. erecta*, *T. minuta* y *T. patula* son las especies con más estudios, mientras que, de otras solo se ha descrito su perfil químico (Armas et al., 2012; Cruz et al., 2021).

Cuadro 1. Estudios sobre actividad antifúngica de aceites esenciales con especies de *Tagetes*.

Especie	Hongos que inhibe	Autores
<i>T. lemmonii</i>	<i>B. cinerea</i>	(Larios-Palacios et al., 2020)
<i>T. foetidissima</i> , <i>T. lucida</i> , <i>T. coronopifolia</i>	<i>Monilinia fructicola</i> , <i>Sclerotium rolfsii</i>	(Barajas et al., 2011)
<i>T. filifolia</i>	<i>Penicillium digitatum</i> , <i>Colletotrichum truncatum</i>	(Gadban et al., 2023; Romagnoli et al., 2005)
<i>T. patula</i>	<i>Monilia</i> sp., <i>Fusarium moniliforme</i> , <i>Pythium ultimum</i> y <i>Alternaria alternata</i>	(Ayub et al., 2017; Mares et al., 2004; Teodorescu et al., 2009)
<i>T. lucida</i>	<i>Aspergillus niger</i> , <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Penicillium janthinellum</i> , <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Fusarium sporotrichum</i>	(Céspedes et al., 2006; López et al., 2018)
<i>T. erecta</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i> , <i>F. verticilloides</i> , <i>Pythium aphanidermatum</i> , <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> , <i>Aspergillus fumigatus</i> , <i>Rhizopus stolonifera</i> , <i>Aspergillus brasiliensis</i>	(Ayub et al., 2017; Du et al., 2017; Crevelin et al., 2018; Jabar et al., 2020; Sanam et al., 2024)
<i>T. minuta</i>	<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> , <i>F. solani</i> , <i>Sclerotium cepivorum</i> , <i>Aspergillus flavus</i> , <i>Penicillium oxalicum</i> , <i>P. minioluteum</i>	(Camiletti et al., 2014; Camiletti et al., 2016; Kumar et al., 2019; Saha et al., 2013)

Fuente: elaboración propia

2.2.1.1 Uso de surfactantes

La característica volátil, hidrófoba y de fácil degradación de los aceites esenciales hacen que sea necesario el uso de surfactantes (Tween 20, Tween 60, Tween 80, Tween 85, Span 20) para romper la tensión superficial del agua y así obtener

una emulsión (Lucia & Guzmán, 2021). Algunos surfactantes como el Tween 20 inhibe a *Aspergillus terreus* en altas concentraciones (5 %). Por ello, se sugiere el uso de concentraciones menores al 0.5 % (Gómez-López et al., 2005). Tween 20, Tween 80 y Breakthru afectan la germinación de conidios de *Beauveria bassiana* en altas concentraciones (1-5 %), mientras que a bajas concentraciones (0.5-0.1 %) estimula la germinación (Mwamburi et al., 2015). Incluso con la trietanolamina al 1.5 % se ha observado efecto a nivel de genes en *Rhizopus oryzae* (Wu et al., 2021). Estos antecedentes hacen que sea importante evaluar el efecto de Tween 20 sobre otros organismos.

2.2.2 Hidrolatos

Para el género *Tagetes* solo se habían estudiado tres especies (*T. mendocina*, *T. minuta* y *T. elliptica*), los estudios principalmente se basaron en la descripción del perfil químico de los hidrolatos; destacan clases de compuestos como los monoterpenos, alcoholes y ésteres (Álvarez et al., 2022). Además, contienen abundantes compuestos oxigenados (Rajeswara et al., 2006). Solo el hidrolato de *T. mendocina* ha sido eficaz en el control de dermatofitos (*Microsporum gypseum*, *Trichophyton rubrum* y *Trichophyton mentagrophytes*) (Lima et al., 2009). Debido a que la información aún es escasa, es importante explorar el efecto antifúngico de hidrolatos de *Tagetes*.

2.3 Agrohhomeopatía

Los principios de la homeopatía aplicada en plantas se han propuesto como alternativa al paradigma de uso de los fungicidas sintéticos; por lo tanto, algunos productos homeopáticos se proponen como posibles insumos para el control de enfermedades causadas por hongos (Meneses, 2017). La utilización de diluciones sucesivas y dosis bajas (centesimales) garantiza que las sustancias homeopáticas no sean contaminantes para el ambiente, tampoco para el humano, además, son más económicos (Meneses, 2017). Se ha demostrado que los productos homeopáticos causan cambios biológicos en las plantas e inciden de manera positiva en su desarrollo (Abasolo-Pacheco et al., 2020; Meneses, 2017).

El efecto de productos homeopáticos contra hongos se ha estudiado con homeopáticos en dilución 30C de *Arnica montana*, *Thuja occidentalis*, azufre y sílicea (Hanif & Dawar, 2015; Kumar et al., 2023). Estos inhiben el crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Ascochyta rabiei*, *Alternaria solani*, *Macrophomina phaseolina*, *Rhizoctonia solani*, *Septoria lycopersici* y *Phomopsis vexans* (Hanif & Dawar, 2015; Kumar et al., 2023). El “nosode” 7 CH de *B. cinerea* y arsénico 6 CH también muestran inhibición sobre *B. cinerea* (Larios-Palacios et al., 2020). La germinación de *Alternaria solani* y *Corynespora cassiicola* se redujo con dinamizaciones 6 CH, 12 CH, 30 CH, 60 CH, 100 CH y 200 CH derivadas de aceite esencial de *Eucalyptus citriodora* y *Cymbopogon citratus* (Batista et al., 2017). El aceite esencial de *Psidium cattleianum* 7 CH y 12 CH inhibieron a *Penicillium* sp. en semillas de frijol (Rocha et al., 2019).

Aunque se avanza en la investigación sobre estas sustancias, el fundamento para explicar su mecanismo de acción aún no es preciso. Su efecto se atribuye a la existencia de nanopartículas del ingrediente activo (Chikramane et al., 2010; Mazón-Suástegui et al., 2019). La existencia de compuestos activos ya se ha comprobado en tinturas madre (preparación homeopática) de *Calendula officinalis* y *Echinacea angustifolia* (Palacios, 2013).

Con el uso de microscopía electrónica de transmisión, difracción de electrones y análisis químico mediante espectroscopia de emisión atómica de plasma acoplado inductivamente se confirmó la existencia de nanopartículas en sustancias homeopáticas (Chikramane et al., 2010). También se demostró con resonancia magnética nuclear aplicada en muestras de *Cuprum metallicum* y *Gelsemium sempervirens* (Van Wassenhoven et al., 2020). Su efecto también se ha relacionado con el fenómeno de hormesis, porque las dosis bajas provocan efectos “favorables” y dosis altas provocan efectos “adversos” (Goitia & Sagredo, 2012). Se ha propuesto la “memoria inmunológica” y la “memoria del agua” o la transmisión de información electromagnética del agua (Avello, 2009). La teoría cuántica intenta explicar la retención de información de los materiales activos originales en productos muy diluidos (Henry, 2017).

Por otra parte, el empleo de ciencias ómicas representan una oportunidad para comprender la complejidad de los sistemas biológicos (Vailati-Riboni et al., 2017; Reyes et al., 2024). Se han investigado todas las moléculas biológicas que están involucradas en la estructura, función y dinámica de una célula, tejido u organismo (Reyes et al., 2024; Vailati-Riboni et al., 2017). A continuación, se mencionan avances sobre en mecanismo de acción de sustancias homeopáticas mediante el uso de la transcriptómica.

2.4 Transcriptómica

Desde el año 1997 se ha propuesto la hipótesis que las sustancias homeopáticas actúan mediante la regulación de la expresión génica (Khuda-Bukhsh, 1997). El análisis del perfil transcriptómico de coleóptilos de trigo cultivados a partir de semillas envenenadas con arsénico respaldaron esta hipótesis (Marotti et al., 2014).

Aunque no se conoce el efecto de genes expresados en respuesta a un aceite esencial homeopático. Estudios transcriptómicos sobre hongos tratados con aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* revelaron efectos a nivel de genes (Xu et al., 2017). Si en las sustancias homeopáticas existen nanopartículas del ingrediente activo (Chikramane et al., 2010; Mazón-Suástegui et al., 2019), se esperaría que los homeopáticos derivados de los aceites esenciales tengan efectos similares al aceite esencial, es decir, que inhiba las vías metabólicas primarias mediante la supresión del ciclo del ácido tricarboxílico (TCA) y el metabolismo de los ácidos grasos (Xu et al., 2017).

Aún se requiere investigación para comprender el mecanismo de acción preciso de las sustancias homeopáticas, hasta la fecha es difícil sugerir si estas sustancias tienen alguna influencia sobre los genes (Khuda-Bukhsh, 2003).

2.5 Literatura citada

Abasolo-Pacheco, F., Bonilla-Montalván, B., Bermeo-Toledo, C., Ferrer-Sánchez, Y., Ramírez-Castillo, A. J., Mesa-Zavala, E., Llerena-Ramos, L., & Mazón-Suástegui, J. M. (2020). Efecto de medicamentos homeopáticos

- en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L.). *Terra Latinoamericana*, 38(1), 103-117. <https://doi.org/10.28940/terra.v38i1.718>
- Akdağ, A., & Öztürk, E. (2019). Distillation methods of essential oils. *Selçuk Üniversitesi Fen Fakültesi Fen Dergisi*, 45(1), 22-31. <https://dergipark.org.tr/en/download/article-file/705385>
- Álvarez, R. T., Cama, D. N., & Monzón, L. T. (2022). Effect of the conditioning and ultrasound-microwave sequential technique on the yield, chemical and functional properties of the essential oils and hydrolats extracted from the leaves of *Tagetes elliptica* Smith. *Scientia Agropecuaria*, 13(4), 315-325. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2022.028>
- An, J., Ma, Y., Zhao, W., Hu, Y., Wang, Y., Zhang, Z., Luo, X., Zhang, B., Ding, Y., & Liu, Y. (2023). Drug repurposing strategy II: from approved drugs to agri-fungicide leads. *Journal of Antibiotics*, 76(3), 131-182. <https://doi.org/10.1038/s41429-023-00594-2>
- Armas, K., Rojas, J., Rojas, L., & Morales, A. (2012). Comparative study of the chemical composition of essential oils of five *Tagetes* species collected in Venezuela. *Natural Product Communications*, 7(9), 1225-1226. <https://doi.org/10.1177/1934578X12007009>
- Avello, L. M., Avendaño, O. C., & Mennickent, C. S. (2009). Aspectos generales de la homeopatía. *Revista Médica de Chile*, 137(1), 115-120. <https://dx.doi.org/10.4067/S0034-98872009000100018>
- Ayub, M. A., Hussain, A. I., Hanif, M. A., Chatha, S. A. S., Kamal, G. M., Shahid, M., & Janneh, O. (2017). Variation in phenolic profile, β -Carotene and flavonoid contents, biological activities of two *Tagetes* species from Pakistani flora. *Chemistry & Biodiversity*, 14(6), Article e1600463. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600463>
- Barajas, P. J. S., Montes-Belmont, R., Castrejón, A. F., Flores-Moctezuma, H. E., & Serrato-Cruz, M. A. (2011). Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Revista Mexicana de Micología*, 34, 85-91.

https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-31802011000200010

- Batista, O. J. S., Schwan-Estrada, K. R. F., Moacir, B. C. & Gomes, C. S. M. T. (2017). Homeopatas de óleos essenciais sobre a germinação de esporos e indução de fitoalexinas. *Revista Ciência Agronômica*, 48(1), 208-215. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170024>
- Bechir, A. M., Moumni, M., & Romanazzi, G. (2023). Antifungal activity of thirty essential oils to control pathogenic fungi of postharvest decay. *Antibiotics*, 13(1), 28. <https://doi.org/10.3390/antibiotics13010028>
- Bhattacharyya, M. (2017). Use of marigold (*Tagetes* sp.) for the successful control of nematodes in agricultura. *The Pharma Innovation Journal*, 6(11), 01-03. <https://www.thepharmajournal.com/archives/2017/vol6issue11/PartA/6-9-72-823.pdf>
- Blumenberg, M. (2019). Transcriptome analysis. In M. Blumenberg (Ed.), *Introductory chapter: Transcriptome analysis* (pp. 1-5). IntechOpen eBooks. <https://doi.org/10.5772/intechopen.85980>
- Bolaños, S. M. R. (2022). Distribución potencial y sitios de conservación de *Tagetes* (Asteraceae) en la faja volcánica transmexicana [Tesis de Maestría, Posgrado en Botánica]. Colegio de Postgraduados. <http://colposdigital.colpos.mx:8080/jspui/handle/10521/5007>
- Botelho, R. A. C., & Ronzella, O. J. (2021). Antifungal activity of homeopathic medicines against the white mold causing agent *Sclerotinia sclerotiorum*. *Acta Scientiarum Biological Sciences*, 43, Article e56548. <https://doi.org/10.4025/actascibiols.v43i1.56548>
- Camacho-Campos, C., Pérez-Hernández, Y., Valdivia-Ávila, A., Ramírez-Pérez, H. L., & Gómez-Brisuela, L. (2019). Propiedades fitoquímicas y antibacterianas de extractos de *Tagetes erecta* L. (Asteraceae). *Revista Cubana de Química*, 31(1), 53-64.

http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2224-54212019000100053&lng=es&tln=es.

- Camiletti, B. X., Asensio, C. M., De la Paz Giménez Pecci, M., & Lucini, E. I. (2014). Natural control of corn postharvest fungi *Aspergillus flavus* and *Penicillium* sp. using essential oils from plants grown in Argentina. *Journal of Food Science*, 79(12), M2499-M2506. <https://doi.org/10.1111/1750-3841.12700>
- Camiletti, B. X., Asensio, C. M., Gadban, L. C., De la Paz Giménez Pecci, M., Conles, M. Y., & Lucini, E. I. (2016). Essential oils and their combinations with iprodione fungicide as potential antifungal agents against the rot (*Sclerotium cepivorum* Berk) in garlic (*Allium sativum* L.) crops. *Industrial Crops and Products*, 85, 117-124. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.02.053>
- Céspedes, C. L., Avila, J. G., Martínez, A., Serrato, 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(10), 3521-3527. <https://doi.org/10.1021/jf053071w>
- Cheng, X., Zhang, J., Liang, Z., Wu, Z., Liu, P., Hao, J., & Liu, X. (2023). Multidrug resistance of *Rhizoctonia solani* determined by enhanced efflux for fungicides. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 195, Article 105525. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2023.105525>
- Chikramane, P. S., Suresh, A. K., Bellare, J. R., & Kane, S. G. (2010). Extreme homeopathic dilutions retain starting materials: a nanoparticulate perspective. *Homeopathy*, 99(4), 231-242. <https://doi.org/10.1016/j.homp.2010.05.006>
- Crevelin, E. J., Aguiar, G. P., Lima, K. A., Severiano, M. E., Groppo, M., & Ambr, S. (2018). Antifungal activity of the essential oils of *Plectranthus neochilus* (Lamiaceae) and *Tagetes erecta* (Asteraceae) cultivated in Brazil.

- International Journal of Complementary & Alternative Medicine*, 11(1), 31-35.
<https://doi.org/10.15406/ijcam.2018.11.00343>
- Cruz, F. O., Espinoza, R. M., Santiesteba, H. A., & Cruz-López, L. (2021). Caracterización química de los volátiles de *Tagetes nelsonii*. *Polibotánica*, (51), 203-211. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.51.13>
- D'Amato, S., Serio, A., López, C. C., & Paparella, A. (2018). Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*, 86, 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.030>
- Dean, R., Van, K. J. A. L., Pretorius, Z. A., Hammond-kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Doehlemann, G., Ökmen, B., Zhu, W., & Sharon, A. (2017). Plant pathogenic fungi. *Microbiology Spectrum*, 5(1). <https://doi.org/10.1128/microbiolspec.funk-0023-2016>
- Du, R., Liu, J., Sun, P., Li, H., & Wang, J. (2017). Inhibitory effect and mechanism of *Tagetes erecta* L. fungicide on *Fusarium oxysporum* f. sp. *niveum*. *Scientific Reports*, 7(1), 14442. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-14937-1>
- El-Baky, N. A., & Amara, A. A. A. F. (2021). Recent approaches towards control of fungal diseases in plants: an updated review. *Journal of Fungi*, 7(11), 900. <https://doi.org/10.3390/jof7110900>
- Gadban, L., Camiletti, B., Bigatton, E. D., Distéfano, S., & Lucini, E. (2023). 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. <https://doi.org/10.24425/jppr.2020.132202>

- Godínez-Paoli, R., Leyva-Mir, S. G., Del Rosario García-Mateos, M., Magdaleno-Villar, J., Cruz-Álvarez, O., & Martínez-Damián, M. T. (2020). Fungicides, biocontrollers and resistance inducers in commercial bell pepper hybrids inoculated with *Phytophthora capsici*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 38(2), 258-268. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2002-1>
- Goitia, I. C., & Sagredo, M. E. (2012). Investigación en la literatura científica de conceptos que respaldan el principio homeopático de dosis mínima. *Revista Médica de Homeopatía*, 5(3), 106-112. <https://www.elsevier.es/es-revista-revista-medica-homeopatia-287-pdf-X1888852612811430>
- Gómez-López, A., Aberkane, A., Petrikkou, E., Mellado, E., Rodríguez-Tudela, J. L., & Cuenca-Estrella, M. (2005). Analysis of the influence of Tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*, 43(3), 1251-1255. <https://doi.org/10.1128/jcm.43.3.1251-1255.2005>
- González-Oviedo, N. A., Iglesias-Andreu, L. G., La Rosa, F. R. F., Rivera-Fernández, A., & Luna-Rodríguez, M. (2022). Genetic analysis of the fungicide resistance in *Fusarium oxysporum* associated to *Vanilla planifolia*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 40(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2203-3>
- Hamzah, N., Singhal, N., Padhye, L., & Swift, S. (2018). Effect of surfactants on *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 physicochemical properties. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 3392-3398. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.068>
- Hanif, A., & Dawar, S. (2015). Fungicidal effects of homeopathic drugs in the control of root rot fungi and growth of leguminous and non leguminous crops. *International Journal of Biology and Biotechnology*, 12(1), 97-105. <https://tehqeeqat.org/downloadpdf/29264>

- Hanif, A., & Dawar, S. (2015). Use of homeopathic drugs in combination with fertilizers for the control of root rot fungi. *Revista de Botánica de Pakistán*, 47(6), 2455-2462. [https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/47\(6\)/54.pdf](https://www.pakbs.org/pjbot/PDFs/47(6)/54.pdf)
- Henry, M. (2017). Física y química de las altas diluciones. *Revista Médica de Homeopatía*, 10(2), 41-52. <https://doi.org/10.1016/j.homeo.2017.04.003>
- Jabar, A. A., Faraj, J. A., & Talib, M. M. (2020). Antifungal activity of *Tagetes erecta* extract and *Trichoderma harzianum* on the pathogenic fungus *Fusarium verticilloides*. *Plant Archives*, 20(1), 185-188. https://www.plantarchives.org/SPECIAL_%20ISSUE_%2020-1/36_185-188_.pdf
- Jahani, M., Beheshti, M., Aminifard, M. H., & Hosseini, A. (2020). Effects of essential oils to control *Penicillium* sp. *in vitro* and *in vivo* on grapevine (*Vitis vinifera* L.) fruit. *International Journal of Fruit Science*, 20(sup2), 812-826. <https://doi.org/10.1080/15538362.2020.1769526>
- Jakubczyk, K., Tuchowska, A., & Janda-Milczarek, K. (2021). Plant hydrolates- Antioxidant properties, chemical composition and potential applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*, 142, 112033. <https://doi.org/10.1016/j.biopha.2021.112033>
- Jiang, N., Wang, L., Jiang, D., Wang, M., Liu, H., Yu, H., & Yao, W. (2021). Transcriptomic analysis of inhibition by eugenol of ochratoxin A biosynthesis and growth of *Aspergillus carbonarius*. *Food Control*, 135, 108788. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108788>
- Kaur, J., & Kaur, K. (2023). Essential oils: Extraction, characterization and applications. In N. G. Ahmad, & A. M. Javed (Eds.), *Peppermint essential oil*. Academic Press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-91740-7.00010-4>
- Khadiri, M., Boubaker, H., Lahmamsi, H., Taoussi, M., Ezzouggari, R., Askarne, L., Farhaoui, A., Barka, E. A., & Lahlali, R. (2024). Challenges in apple preservation: Fungicide resistance and emerging biocontrols. *Physiological*

and *Molecular Plant Pathology*, 129, 102205.
<https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2023.102205>

Khuda-Bukhsh, A. (1997). Potentized homoeopathic drugs act through regulation of gene-expression: a hypothesis to explain their mechanism and pathways of action *in vitro*. *Complementary Therapies in Medicine*, 5(1), 43-46.
[https://doi.org/10.1016/s0965-2299\(97\)80090-8](https://doi.org/10.1016/s0965-2299(97)80090-8)

Khuda-Bukhsh, A. R. (2003). Towards understanding molecular mechanisms of action of homeopathic drugs: an overview. *Molecular and Cellular Biochemistry*, 253(1/2), 339-345. <https://doi.org/10.1023/a:1026048907739>

Khuda-Bukhsh, A. R., & Pathak, S. (2008). Homeopathic drug discovery: theory update and methodological aspect. *Expert Opinion on Drug Discovery*, 3(8), 979-990. <https://doi.org/10.1517/17460441.3.8.979>

Kumar, D., Biswas, S. K., Kumar, S., Jaisval, G. K., Singh, D., Kumar, R., Tiwari, R. K., Lal, M. K., & Kumar, R. (2023). Homeopathic medicines as new strategy against plant pathogenic fungi. *Annals of Phytomedicine an International Journal*, 12(1), 873-887. <https://doi.org/10.54085/ap.2023.12.1.19>

Kumar, R., Pandey, A., & Varshney, V. (2019). Antifungal activity of the essential oil of *Tagetes minuta* against some fungi of forestry importance. *Journal of Biologically Active Products from Nature*, 9(1), 67-72.
<https://doi.org/10.1080/22311866.2019.1576542>

Larios-Palacios, O. E., López-Vázquez, É. Y., Curiel Rodríguez, A., Ruíz-Espinoza, F. J., Solano-Vidal, R., & Serrato-Cruz, M. A. (2020). Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(3), 593-606.
<https://doi.org/https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.2077>

Lee, L. T., Costa, L. M. A. S., Alves, E., Pfenning, L. H., Pecchia, J. A., Zied, D. C., & Dias, E. S. (2023). Inhibitory effect of DMSO, Tween 80 and Triton X-100 on *Agaricus bisporus* and *Lecanicillium fungicola*. *Revista Brasileira de Meio Ambiente*, 11(2), 99-112. <http://hdl.handle.net/11449/250018>

- Lima, B., Agüero, M. B., Zygadlo, J., Tapia, A., Solis, C., De Arias, A. R., Yaluff, G., Zacchino, S., Feresin, G. E., & Schmeda-Hirschmann, G. (2009). Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. *Journal of the Chilean Chemical Society*, 54(1). <https://doi.org/10.4067/s0717-97072009000100016>
- López López, E., Peña Ortega, M. G., Colinas León, M. T. B., Díaz Cedillo, F., & Serrato Cruz M. A. (2018). Fungistasis del aceite esencial extraído de una población de *Tagetes lucida* de Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(2), 329-341. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1075>
- López, S. B., López, M. L., Aragón, L. M., Tereschuk, M. L., Slanis, A. C., Feresin, G. E., Zygadlo, J. A., & Tapia, A. A. (2011). Composition and anti-insect activity of essential oils from *Tagetes* species (Asteraceae, Helenieae) on *Ceratitis capitata* Wiedemann and *Triatoma infestans* Klug. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 59(10), 5286-5292. <https://doi.org/10.1021/jf104966b>
- Lucia, A., & Guzmán, E. (2021). Emulsions containing essential oils, their components or volatile semiochemicals as promising tools for insect pest and pathogen management. *Advances in Colloid and Interface Science*, 287, 102330. <https://doi.org/10.1016/j.cis.2020.102330>
- 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 Applied Sciences*, 3(44). <https://doi.org/10.1007/s42452-020-04102-1>
- Mares, D., Tosi, B., Poli, F., Andreotti, E., & Romagnoli, C. (2004). Antifungal activity of *Tagetes patula* extracts on some phytopathogenic fungi: ultrastructural evidence on *Pythium ultimum*. *Microbiological Research*, 159(3): 295-304. <https://doi.org/10.1016/j.micres.2004.06.001>

- Marotti, I., Betti, L., Bregola, V., Bosi, S., Trebbi, G., Borghini, G., Nani, D., & Dinelli, G. (2014). Transcriptome profiling of wheat seedlings following treatment with ultrahigh diluted arsenic trioxide. *Evidence-based Complementary and Alternative Medicine*, 2014(1). <https://doi.org/10.1155/2014/851263>
- Mazón-Suástegui, J. M., Ojeda-Silvera, C. M., García-Bernal, M., Avilés-Quevedo, M. A., Abasolo-Pacheco, F., Batista-Sánchez, D., Tovar-Ramírez, D., Arcos-Ortega, F., Murillo-Amador, B., Nieto-Garibay, A., Ferrer-Sánchez, Y., Morelos-Castro, R. M., Alvarado-Mendoza, A., Díaz-Díaz, M., & Bonilla-Montalvan, B. (2019). Multifunctionality and impacts of organic and conventional agriculture. In J. Moudrý, K. M. Ferreira, J. Bernas, R. T. da Silva, & R. S. Nogueira (pp. 1-18), *Agricultural homeopathy: A new insights into organics*. IntechOpen Books. <https://doi.org/10.5772/intechopen.84482>
- Medeleanu, M. L., Fărcaș, A. C., Coman, C., Leopold, L., Diaconeasa, Z., & Socaci, S. A. (2023). Citrus essential oils based nano-emulsions: Functional properties and potential applications. *Food Chemistry X*, 20, Article 100960. <https://doi.org/10.1016/j.fochx.2023.100960>
- Meneses. M. N. (2017). Agrohomeopatía como alternativa a los agroquímicos. *Revista Médica de Homeopatía*, 10(1), 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.homeo.2017.04.004>
- Mwamburi, L. A., Laing, M. D., & Miller, R. M. (2015). Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 67-74. <https://doi.org/10.1590/s1517-838246120131077>
- Nazarov, P. A., Baleev, D. N., Ivanova, M. I., Sokolova, L. M., & Karakozova, M. V. (2020). Infectious plant diseases: etiology, current status, problems and prospects in plant protection. *Acta Naturae*, 12(3), 46-59. <https://doi.org/10.32607/actanaturae.11026>

- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), Article 86. <https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Palacios, M. (2013). Las tinturas madre homeopáticas de *Calendula officinalis* y *Echinacea angustifolia* como antiséptico oral. *Revista Médica de Homeopatía*, 6(3), 112-126. <https://doi.org/10.1016/j.homeo.2013.07.005>
- Pandita, D., & Pandita, A. (2021). Secondary metabolites in medicinal and aromatic plants (maps): Potent molecules in nature's arsenal to fight human diseases. In T. Aftab, & K. R. Hakeem (Eds.), *Medicinal and aromatic plants* (pp. 41-84). Springer. https://doi.org/10.1007/978-3-030-58975-2_2
- Parikh, L., Agindotan, B. O., & Burrows, M. E. (2021). Antifungal activity of plant-derived essential oils on pathogens of pulse crops. *Plant Disease*, 105(6), 1692-1701. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-20-1401-re>
- Poromarto, S. H., Hadiwiyono, N., Supyani, N., Supriyadi, N., & Permatasari, F. I. (2023). Fungicide resistance of *Fusarium oxysporum* f.sp. cepae isolated from shallot in Brebes. *IOP Conference Series Earth and Environmental Science*, 1180(1), 012033. <https://doi.org/10.1088/1755-1315/1180/1/012033>
- Rajeswara, B. R. R., Kaul, P. N., Bhattacharya, A. K., Rajput, D. K., Syamasundar, K. V., & Ramesh, S. (2006). Comparative chemical composition of steam-distilled and water-soluble essential oils of South American marigold (*Tagetes minuta* L.). *The Journal of Essential Oil Research*, 18(6), 622-626. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699184>
- Ramírez, G. S. I., López, B. O., Espinosa, Z. S., & Wong, V. A. (2017). Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum* y *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(8), 1879-1891. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i8.99>
- Reyes, C. D. G., Alejo-Jacuinde, G., Sanchez, B. P., Reyes, J. C., Onigbinde, S., Mogut, D., Hernández-Jasso, I., Calderón-Vallejo, D., Quintanar, J. L., & Mechref, Y. (2024). Multi omics applications in biological systems. *Current*

Issues in Molecular Biology, 46(6), 5777-5793.
<https://doi.org/10.3390/cimb46060345>

Reyes-Tena, A., Rodríguez-Alvarado, G., Fernández-Pavía, S. P., Pedraza-Santos, M. E., Larsen, J., & Vázquez-Marrufo, G. (2020). Morphological characterization of *Phytophthora capsici* isolates from Jalisco and Michoacán, Mexico. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 39(1), 75-93.
<https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2007-5>

Rocha, C. H., Agostinetto, L., Boff, P., Silmara, W. S., Soldi, C., & Carissimi, B. M. I. (2019). Óleo essencial de *Psidium cattleianum* no controle de fitopatógenos em sementes de feijão. *Revista Verde*, 15(1), 14-19.
<https://doi.org/10.18378/rvads.v15i1.7365>

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(1-2), 57-65.
<https://doi.org/10.1007/s00709-005-0084-8>

Saha, S., Walia, S., Kundu, A., Kumar, B., & Joshi, D. (2013). Antifungal acetylinic thiophenes from *Tagetes minuta*: potential biopesticide. *Journal of Applied Botany and Food Quality*, 85(2), 207-211.
<https://ojs.openagrar.de/index.php/JABFQ/article/download/2323/2668>

Sanam, T., Nagaraju, U. S. B. P., Nerella, S. G., R. J., G. K. G., & Srii, S., V. (2024). Evaluation of phytoconstituents in marigold effluent for their antifungal activity against plant pathogens. *Frontiers in Fungal Biology*, 5, 1345543.
<https://doi.org/10.3389/ffunb.2024.1345543>

Sanogo, S., Lamour, K., Kousik, C. S., Lozada, D. N., Parada-Rojas, C. H., Quesada-Ocampo, L. M., Wyenandt, C. A., Babadoost, M., Hausbeck, M. K., Hansen, Z., Ali, E., McGrath, M. T., Hu, J., Crosby, K., & Miller, S. A. (2023). *Phytophthora capsici*, 100 years later: research mile markers from 1922 to 2022. *Phytopathology*, 113(6), 921-930. <https://doi.org/10.1094/phyto-08-22-0297-rvw>

- Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Leal, A. L. A. B., Coutinho, H. D. M., Vitalini, S., Kręgiel, D., Antolak, H., Sharifi-Rad, M., Silva, N. C. C., 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*, 23(11), Article 2847. <https://doi.org/10.3390/molecules23112847>
- Şenkal, B. C. (2020). The role of secondary metabolites obtained from medicinal and aromatic plants in our lives. *ISPEC Journal of Agricultural Sciences*, 4(4), 1071-1079. <https://doi.org/10.46291/ispecjasvol4iss4pp1069-1077>
- Serrato Cruz, M. A., Bautista Reyes, F., & Monroy Sais, A. S. (2014). *Guía para conocer el germoplasma mexicano de cempoalxóchitl (Tagetes spp.)*. Universidad Autónoma Chapingo. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225099/Guia_para_conocer_el_germoplasma_mexicano_de_cempoalxochitl_tagetes_spp.pdf
- Shao, W., Zhao, Y., & Ma, Z. (2021). Advances in understanding fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in China. *Phytopathology*, 111(3), 455-463. <https://doi.org/10.1094/phyto-07-20-0313-ia>
- Siraj, M. A., Medha, M. M., Nahar, A. U., Islam, M. A., & Seidel, V. (2023). *Mangrove endophytes and their natural metabolites: role in promoting plant health*. Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-90620-3.00015-5>
- Surekha, T., & Maniprasad, G. (2023). Agrohomoepathy: Bridging nature and agriculture for sustainable crop health. *Galore International Journal of Health Science and Research*, 8(3), 6-11. <https://doi.org/10.52403/gijhsr.20230302>
- Teodorescu, G., Sumedrea, M., Marin, F., & Murariu, F. (2009). Use of vegetal extracts in control of *Monilia* spp. *Acta Horticulturae*, 825, 363-370. <https://doi.org/10.17660/actahortic.2009.825.57>

- Thind, T. S. (2021). Changing trends in discovery of new fungicides: a perspective. *Indian Phytopathology*, 74(4), 875-883. <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00411-6>
- Vailati-Riboni, M., Palombo, V., & Loor, J. J. (2017). *What are omics sciences?* Springer eBooks. https://doi.org/10.1007/978-3-319-43033-1_1
- Van Wassenhoven, M., Goyens, M., Henry, M., Cumps, J., & Devos, P. (2020). Verification of nuclear magnetic resonance characterization of traditional homeopathically manufactured metal (Cuprum metallicum) and plant (*Gelsemium sempervirens*) medicines and controls. *Homeopathy*, 110(01), 042-051. <https://doi.org/10.1055/s-0040-1710022>
- Wang, Z., Ni, X., Peng, Q., Hou, Y., Fang, Y., Mu, W., Liu, C., Liu, P., & Liu, X. (2018). The novel fungicide SYP-14288 acts as an uncoupler against *Phytophthora capsici*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 147, 83-89. <https://doi.org/10.1016/j.pestbp.2018.01.014>
- Wu, N., Zhang, J., Ou, W., Chen, Y., Wang, R., Li, K., Sun, X., Li, Y., Xu, Q., & Huang, H. (2021). Transcriptome analysis of *Rhizopus oryzae* seed pellet formation using triethanolamine. *Biotechnology for Biofuels*, 14(1), 230. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02081-y>
- Wu, P., Chang, H., & Shen, Y. (2023). Effects of synthetic and environmentally friendly fungicides on powdery mildew management and the phyllosphere microbiome of cucumber. *PloS One*, 18(3), Article e0282809. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0282809>
- Xu, J., Shao, X., Li, Y., Wei, Y., Xu, F., & Hongfei, W. (2017). Metabolomic analysis and mode of action of metabolites of tea tree oil involved in the suppression of *Botrytis cinerea*. *Frontiers in Microbiology*, 8, 1017. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.01017>

Artículo enviado a la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas

CAPÍTULO III: Destilados y aceite homeopático de *Tagetes remotiflora*: efecto en *Botrytis cinerea*

Miguel Ángel Ruíz-González; Roney Solano-Vidal; Ernestina Valadez-Moctezuma y Miguel Ángel Serrato-Cruz*.

Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Chapingo, Estado de México. (miguelruiz93@live.com.mx, roneysv@hotmail.com, nestty56@yahoo.com.mx y serratocruz@gmail.com)

*Autor de correspondencia: serratocruz@gmail.com

3.1 Resumen

Tagetes remotiflora Kunze es un recurso fitogenético de México con potencial en el control de enfermedades fungosas. El objetivo fue describir la composición del aceite esencial de *T. remotiflora* y evaluar destilados (aceite e hidrolato) y aceite esencial homeopático en el control de *Botrytis cinerea in vitro*. Por hidrodestilación de plantas en floración se obtuvo aceite esencial e hidrolato, el aceite esencial también se preparó en su modalidad homeopática; el aceite se analizó mediante la técnica GC-MS. Los tratamientos evaluados fueron: medio PDA (39 g L⁻¹), fungicida Cabrio C (1 g L⁻¹), Tween 20 (0.1 mL L⁻¹), aceite esencial (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1 y 2 %), hidrolato (25, 50, 75 y 100 %)

y aceite esencial homeopático (1, 2, 3, 4, 5, 6, 60 y 200 CH). Los datos de porcentaje de inhibición y velocidad de crecimiento micelial fueron sometidos a un análisis de varianza y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) y mediante análisis probit se determinó concentración mínima inhibitoria 50 (DMI₅₀) y 90 % (DMI₉₀). Se identificaron 37 compuestos químicos, cuatro mayoritarios: trans- β -Ocimeno, 2-Careno, Ciclohexeno, 1-metil-4-(1-metiletilideno)- y 5,7-Octadien-4-ona, 2,6-dimetil-, (E)-. Con el aceite esencial al 0.5 % se inhibió en 92 % el crecimiento micelial y con 1 y 2 % se inhibió en 100 %, al igual que el fungicida; con el aceite homeopático 6 CH la inhibición fue de 19.20 %; y, con hidrolato al 75 o 100 % la inhibición fue de 74 a 85 %. El análisis probit confirma los efectos biocidas del aceite esencial y fungistático del hidrolato contra *B. cinerea*.

Palabras clave: *Tagetes remotiflora*, enfermedad fungosa, hidrolato, inhibición.

Abstract

Tagetes remotiflora Kunze is a phylogenetic resource from Mexico with potential in the control of fungal diseases. The objective was to describe the composition of the essential oil of *T. remotiflora* and to evaluate distillates (oil and hydrolate) and homeopathic essential oil in the control of *Botrytis cinerea in vitro*. By hydrodistillation of flowering plants, essential oil and hydrosol were obtained, the essential oil was also prepared in its homeopathic form; the oil was analyzed by GC-MS technique. The treatments evaluated were: PDA medium (39 g L⁻¹), Cabrio C fungicide (1 g L⁻¹), Tween 20 (0.1 mL L⁻¹), essential oil (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1 and 2 %), hydrosol (25, 50, 75 and 100 %)

and homeopathic essential oil (1, 2, 3, 4, 5, 6, 60 and 200 CH). Percent inhibition and mycelial growth rate data were subjected to analysis of variance and Tukey's test ($p \leq 0.05$) and through probit analysis the minimum inhibitory concentration 50 (DMI₅₀) and 90 % (DMI₉₀) was determined. 37 chemical compounds were detected, four major ones: trans- β -Ocimene, 2-Carene, Cyclohexene, 1-methyl-4-(1-methylethylidene)- and 5,7-Octadien-4-one, 2,6-dimethyl-, (E)-. With the 0.5 % essential oil mycelial growth was inhibited in 92 % and with 1 and 2 % it was inhibited in 100 %, as well as the fungicide; with the homeopathic oil 6 CH the inhibition was 19.20 %; and, with hydrolate at 75 or 100 % the inhibition was 74 to 85 %. The probit analysis confirms the biocidal effects of the essential oil and the fungistatic effects of the hydrolat against *B. cinerea*.

Keywords: *Tagetes remotiflora*, fungal disease, hydrolate, inhibition.

3.2 Introducción

Una de las vertientes para el aprovechamiento de plantas aromáticas en agricultura es someterlas a procesos de destilación para obtener los compuestos, la mayoría de ellos son metabolitos secundarios con actividad biológica. Durante la extracción de aceites esenciales por hidrodestilación se generan tres sustancias (aceite esencial, hidrolato y agua residual o infusión) con potencial de aprovechamiento como biocontroladores de plagas y enfermedades (Proto *et al.*, 2022), aunque el aceite esencial es lo que más se utiliza.

En México, los recursos genéticos aromáticos son numerosos, sobresalen los relacionados con las familias botánicas Asteraceae, Burseraceae, Lauraceae, Fabaceae, Rubiaceae, Euphorbiaceae, Solanaceae, Lamiaceae y Verbenaceae; se estima que existen alrededor de 450 a 600 especies aromáticas (Calvo-Irabien, 2018). Asteraceae en México se compone de 3,113 especies (Villaseñor, 2018). *Tagetes* (Asteraceae) es un género con amplia distribución en México y es considerado un recurso natural alternativo para control de plagas y enfermedades (Serrato, 2014).

La actividad antimicrobiana y antioxidante que posee el aceite esencial de *Tagetes* ya se ha estudiado (Salehi *et al.*, 2018). Sin embargo, la investigación sobre su actividad antifúngica aún es limitada (Mutlu-Ingok *et al.*, 2020). *T. remotiflora* es una herbácea anual con distribución regional en México, de condición ruderal (Serrato, 2014), con actividad antibacteriana (Rincón *et al.*, 2012) y actualmente sin explorar su composición química ni sus propiedades contra hongos fitopatógenos.

El hidrolato suele contener de 0.05 a 0.20 g L⁻¹ de aceite esencial y otros compuestos (Jakubczyk *et al.*, 2021), característica que le confiere propiedades antioxidantes (Jakubczyk *et al.*, 2021), organolépticas, antimicrobiano, antifúngico, medicinal y en la industria alimenticia (Aćimović *et al.*, 2020); sobre su uso en el control de enfermedades fungosas son pocos los estudios, sobresale la aplicación de hidrolatos de ajo (*Allium sativum* L.) y cebolla (*Allium fistulosum* L.) que inhiben el desarrollo de *Botrytis alli* Munn y *Sclerotium cepivorum* Berk. (Lozano *et al.*, 2000); sin embargo, hasta ahora la exploración de hidrolatos de *Tagetes* contra hongos no se ha planteado

Hay plantas aromáticas con propiedades fungicida o fungistática, pero su bajo rendimiento de aceite esencial limita su viabilidad económica como ingrediente activo para control de hongos fitopatógenos. Por tal motivo, se contempla la exploración de aceites esenciales homeopáticos que, además de representar un insumo barato, de elaboración personal y sin efecto contaminante al ambiente o al humano (Toledo *et al.*, 2011), es una vía coadyuvante para obtención de alimentos sanos, de aquí que resulte estratégico verificar su efecto biológico.

La experimentación sobre homeopatía incluye pocos estudios sobre aceites esenciales homeopáticos contra hongos fitopatógenos (Larios-Palacios *et al.*, 2020; Teixeira *et al.*, 2017). El aceite esencial en forma homeopática de *Eucalyptus citriodora* Hook. y *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf controlan *Alternaria solani* Sorauer y *Corynespora cassiicola* (Berk. & M.A. Curtis) (Oliveira *et al.*, 2017) y el “nosode” de *B. cinerea* (elaborado homeopático a partir del propio hongo que causa la enfermedad) en la dilución 7 CH y arsénico 6 CH inhiben de forma parcial el crecimiento micelial de *B. cinerea in vitro* (Larios-Palacios *et al.*, 2020).

Aunque los aceites esenciales de *T. lemmonii* A. Gray. (Larios-Palacios *et al.*, 2020) y *T. patula* L. (Romagnoli *et al.*, 2005) tienen efecto inhibitorio contra *B. cinerea*, todavía no se dispone de antecedentes sobre aceites esenciales homeopáticos de *Tagetes* en el modelo de *B. cinerea*, de ahí la importancia de generar información básica sobre *T. remotiflora* para su aprovechamiento como insumo orgánico contra *B. cinerea*, que ocasiona pérdidas económicas estimadas entre 10 a 100 mil millones de dólares, es difícil de controlar y de naturaleza adaptativa a entornos cambiantes; lamentablemente la aplicación de fungicidas

químicos para su control deriva en problemas de contaminación al ambiente y al humano (Boddy, 2016; Romanazzi y Feliziani, 2014).

El objetivo del estudio fue describir la composición del aceite esencial de *T. remotiflora* y evaluar destilados (aceite e hidrolato) y aceite esencial homeopático en el control de *B. cinerea in vitro*. Se espera que algunos compuestos en el aceite esencial de *T. remotiflora* coincidan con otras especies de *Tagetes*, pero otros podrían resultar específicos, y que, tanto destilados y homeopáticos, tendrán efecto sobre el crecimiento micelial de *B. cinerea*.

3.3 Materiales y métodos

3.3.1 Muestro del material vegetal

Durante el mes de octubre de 2021 se muestrearon ejemplares de *T. remotiflora* (3.25 kg en peso seco) en etapa de floración en el municipio de San Martín Itunyoso, Oaxaca (17° 11' 58.37'' N/ 97° 52' 40.13 O), esta especie se distribuye principalmente en áreas de transición climática, no hacia los climas templados frío o los cálidos. Los sitios muestreados fueron georreferenciados con un geoposicionador UTM Geo Map 3.1.7. La caracterización botánica y depósito de especímenes con número de registro 35880 se realizó en el Herbario-Hortorio-JES Jorge Espinosa Salas del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México.

3.3.2 Extracción de aceite esencial e hidrolato

Se recolectaron plantas completas (raíz, tallo, hojas y flores) y fueron trituradas con tijeras de poda de 8", la extracción de aceite esencial e hidrolato se hizo mediante hidrodestilación (Rodríguez *et al.*, 2012) durante 45 min en un destilador de cristal tipo italiano con capacidad de 6 kg. El hidrolato (600 mL) y aceite esencial (1.6 mL) se conservaron durante cinco meses en frascos de cristal hasta su uso.

3.3.3 Identificación de compuestos químicos en aceite esencial

En un frasco ámbar se agregó 1 mL de aceite esencial y se colocó una fibra de microextracción (PALsystem Ingenious Simple Handling) de fase sólida durante 1 min. Después, la muestra fue inyectada mediante el inyector del cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS) durante 45 min (Bicchi, 2000); se realizaron dos repeticiones. Para la caracterización química de la muestra, se empleó un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS Agilent Technologies 7890 A GC System). Se utilizó una columna capilar GC column VF-5ms, de 30 x 0.25 (0.25). La temperatura del horno de la columna se inició en 60 °C por 2 min y posteriormente a 120 °C durante 15 min y una temperatura final de 250 °C, se usó helio como gas acarreador a un flujo constante de 0.5 mL min⁻¹. La identificación de los compuestos se hizo al comparar el tiempo de retención y el espectro de masas con la biblioteca espectral de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST).

3.3.4 Aislamiento de *Botrytis cinerea*

Durante enero de 2022, en el municipio de Acaxochitlán, Hidalgo, se recolectaron muestras de flores de *Rosa* sp. con síntomas de *Botrytis cinerea*. Las muestras se etiquetaron y colocaron en bolsas de polietileno. En cajas Petri con medio de cultivo PDA (BD Bioxon) se aisló el hongo al pasar fragmentos de 3-4 mm de pétalos de rosa previamente desinfestados con hipoclorito de sodio al 1 %, luego lavados tres veces con agua bidestilada y secados en papel filtro.

Las cajas se dejaron a temperatura ambiente y cada 24 h se registró el crecimiento del hongo y transcurridos tres días, con un sacabocado estéril de 3.5 mm de diámetro se obtuvo un disco de PDA con micelio y se pasó a nuevo medio de cultivo PDA para purificar el hongo. Para corroborar la identidad del hongo, se hicieron pruebas de patogenicidad en frutos de fresa variedad “CP ZAMORANA” obtenidos de un invernadero del campo experimental Chapingo.

Se eligieron frutos maduros e inmaduros; las muestras se sumergieron durante 1 min en hipoclorito de sodio al 1 %, enseguida se lavaron tres veces con agua bidestilada y secadas en papel filtro, después, en una caja Petri estéril se colocaron los frutos maduros e inmaduros por separado, se hicieron tres repeticiones. Los frutos se inocularon por contacto con un hisopo estéril que contenía micelio de siete días de edad. Como testigo se consideraron muestras solo desinfestadas. Las muestras se dejaron a temperatura ambiente hasta observar crecimiento del hongo (3 días).

3.3.5 Identificación de *B. cinerea*

En un portaobjetos se agregó una gota de lactofenol, con una aguja de disección se hizo un raspado en las cajas Petri con crecimiento del hongo (colonia) para obtener micelio y se colocó en la gota de lactofenol, enseguida se cubrió con el cubreobjetos para observar al microscopio Olympus CX31 (40x). Para la identificación morfológica del hongo se observaron estructuras como: micelio gris y conidióforos largos y ramificados, cuyas células apicales redondeadas producen racimos de conidios ovoides, unicelulares, incoloros o de color gris (Brandhoff *et al.*, 2017); se usaron claves de identificación del color de la colonia y la forma de los conidios, micelio y formación de esclerocios (Abata *et al.*, 2016). También, se consultó el documento: Taxonomy and Identification in Illustrated Genera of Imperfect Fungi (Barnett y Hunter, 1986).

3.3.6 Preparación de tratamientos

Para el bioensayo se empleó el método de agar envenenado que consistió en integrar al medio de cultivo las sustancias tratamiento (Balouiri *et al.*, 2016). En matraces Erlenmeyer de 250 mL se prepararon 100 mL de medio PDA (39 g L^{-1}) por cada tratamiento. Con aceite esencial de *T. remotiflora*, agua bidestilada y Tween 20 (0.1 %) se preparó una emulsión para obtener siete concentraciones (0.0001, 0.001, 0.01, 0.1, 0.5, 1 y 2 %) de aceite esencial, hidrolato en cuatro concentraciones (100, 75, 50 y 25 %) preparado con agua bidestilada.

Las sustancias homeopáticas (1, 2, 3, 4, 5, 6, 60 y 200CH) las elaboró el Dr. Felipe de Jesús Ruíz Espinoza del Centro Regional Universitario del Anáhuac de la Universidad Autónoma Chapingo de acuerdo con el protocolo de Larios-Palacios *et al.* (2020). El

fungicida fue Cabrio® C (BASF, 2023) (Boscalid 25.20 % + Pyraclostrobin 12.80 %) (1 g L⁻¹). Cabrio® C y Tween® 20 (Thermo Fisher Scientific, 2023) (0.1 L⁻¹) se usaron como testigos de referencia; en el caso de Tween 20 (Tw20), en ensayos previos se observó efecto biológico y se quiso confirmar. PDA 39 g L⁻¹ fue el testigo absoluto.

De los aceites homeopáticos se agregó 1 gota en cada matraz y se hizo una succusión durante 2 min. Los matraces con las sustancias tratamiento se esterilizaron durante 20 min en autoclave (AESA modelo CV 300) a 120 °C y se vertieron en cajas Petri de vidrio estériles de 90 mm. El medio de cultivo se dejó gelificar a temperatura ambiente por 24 h. Después, con un sacabocado estéril de 3.5 mm de diámetro se obtuvo un disco de PDA con el inóculo del micelio del hongo de siete días de edad y con una aguja de disección se colocó el disco invertido en el centro de la caja Petri. Las cajas Petri con las sustancias tratamiento e inóculo se incubaron en oscuridad a 18 ± 2 °C en estufa de cultivo.

3.3.7 Diseño experimental

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con ocho tratamientos homeopáticos y 14 más, resultado del aceite esencial, hidrolato, testigo, Tween 20 y fungicida comercial, cada uno con cinco repeticiones y un testigo absoluto, la unidad experimental fue una caja Petri con medio de cultivo PDA con los tratamientos a evaluar.

3.3.8 Registro de datos

Con un vernier digital se midió el crecimiento radial del hongo cada 24 h hasta que el testigo cubrió completamente la caja Petri con micelio (5 días). La velocidad de

crecimiento (VC) y porcentaje de inhibición (% I) se calcularon con las fórmulas que se muestran en el Cuadro 2:

Cuadro 2. Fórmulas para calcular las variables evaluadas.

Velocidad de crecimiento (VC)	Porcentaje de inhibición (% I)
$VC = \frac{Df - Di}{Tf - Ti}$	$\% I = \frac{D1 - D2}{D1} (100)$

Df: diámetro final de crecimiento (mm), Di: diámetro inicial de crecimiento (mm), Ti: tiempo inicial de crecimiento (días), Tf: tiempo final de crecimiento (días), D1: diámetro del crecimiento micelial del testigo (mm), D2: diámetro del crecimiento micelial del influenciado (mm).

3.3.9 Análisis de datos

Los datos registrados se sometieron a análisis de varianza y prueba de comparación de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) mediante el software SAS OnDemand for Academics (SAS Institute Inc, 2024). El análisis se hizo por grupos de tratamientos: aceite, hidrolato al considerar la variable de porcentaje de inhibición y sustancias homeopáticas con las variables porcentaje de inhibición y velocidad de crecimiento.

3.3.10 Análisis Probit

Las estimaciones de regresión y la concentración que produjo inhibición (Dosis Mínima de Inhibición) del 50 (DMI₅₀) y del 90 % (DMI₉₀), se generaron mediante análisis probit en SAS OnDemand for Academics (SAS Institute Inc, 2023). La DMI permite conocer la

concentración de la sustancia-tratamiento con la que es posible inhibir, en porcentaje, al crecimiento del micelio.

3.4 Resultados y discusión

El tiempo de retención de compuestos con el equipo CG-EM fluctuó entre 8.38 y 36.05 min, periodo en el que se detectaron 37 compuestos químicos, cuatro mayoritarios: trans- β -Ocimeno (6.98 %), 2-Careno (4.98 %), Ciclohexeno, 1-metil-4-(1-metiletilideno)- (4.87 %) y 5,7-Octadien-4-ona, 2,6-dimetil-, (E)- (4.22 %) (Figura 1). Los compuestos encontrados en el aceite de *T. remotiflora*, que por primera vez se identifican, especialmente el mayoritario trans- β -Ocimeno, se ha encontrado en otras especies de *Tagetes* (Xu *et al.*, 2012), mientras que 2-Careno parece específico de esta especie (Figura 1).

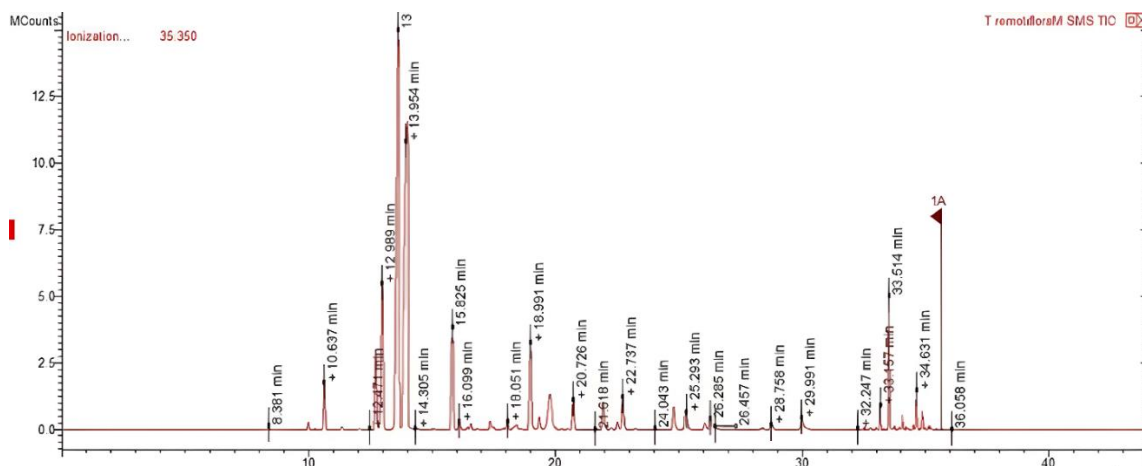


Figura 1. Cromatograma que muestra los picos y tiempos de retención de compuestos identificados en muestras de aceite esencial de *T. remotiflora*.

La morfología de estructuras reproductivas permitió confirmar la identidad de *B. cinerea*, misma que se comprobó mediante pruebas de patogenicidad que mostraron crecimiento del hongo que es causante del moho gris en frutos de fresa (Brandhoff *et al.*, 2017). Los aislados produjeron esclerocios con color negro, las colonias eran de color gris oscuro, micelio aéreo y conidios de forma ovalada.

En la evaluación toxicológica se observó que, al reducir la concentración del aceite, la inhibición disminuyó (100 a 3.45 %) y aumentó la velocidad de crecimiento (0 a 10.13 mm día⁻¹) (Figura 2). El aceite esencial 1 y 2 % y el fungicida comercial (FC) inhibieron totalmente el crecimiento micelial (Figura 2) con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.0001$). La variabilidad de esporulación de *B. cinerea* puede explicarse por las complejas interacciones entre las condiciones climáticas y la carga de inóculo, la germinación de esporas y el crecimiento de hongos en el medio de cultivo (Fedele *et al.*, 2019) resultado que concuerda con otros obtenidos para el mismo hongo al aplicarse aceite de *T. lemmonii* en 1 % (Larios-Palacios *et al.*, 2020) y *T. patula* en 1 % y 0.1 % (Romagnoli *et al.*, 2005).

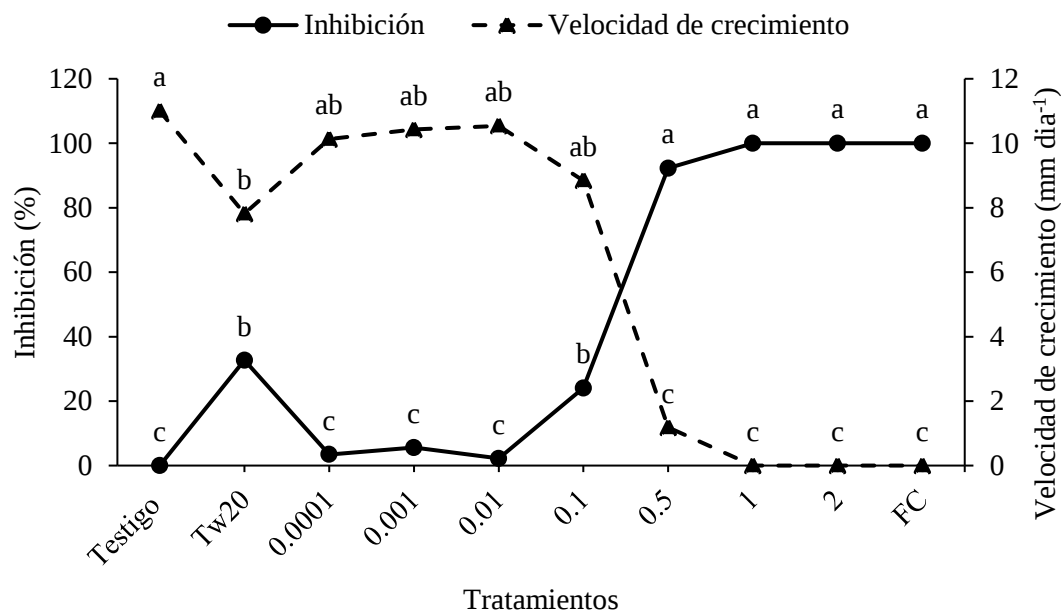


Figura 2. Efecto del aceite esencial de *T. remotiflora* en el crecimiento micelial de *B. cinerea* a los cinco días. FC: fungicida comercial, Tw20: Tween 20 0.1 %, 2: aceite esencial 2 %, 1: aceite esencial 1 %, 0.5: aceite esencial 0.5 %, 0.1: aceite esencial 0.1 %, 0.01: aceite esencial 0.01 %, 0.001: aceite esencial 0.001 %, 0.0001: aceite esencial 0.0001 %. Medias con letras iguales en cada variable no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Con las concentraciones 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 % la inhibición del micelio fue mayor (24.05 a 3.45 %) que la registrada en el testigo (0 %); con 0.1 % de aceite, la velocidad de crecimiento fue de 8.84 mm día⁻¹, menor que el testigo (11 mm día⁻¹). Con aceite esencial de *T. remotiflora* también se reporta actividad inhibitoria en el crecimiento de bacterias como *Dikeya dadantii* y *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola* (Rincón *et al.*, 2012). Los aceites esenciales y sus componentes actúan sobre la membrana y el citoplasma, y en ciertas situaciones, alteran completamente la morfología de las células; su actividad podría ser causada por las propiedades de los terpenos/terpenoides (altamente lipofílicos y de

bajo peso molecular) que son capaces de alterar la membrana celular (inhiben síntesis de ergosterol), adelgazamiento, distorsión de la pared hifal, causar la muerte celular o inhibir la esporulación y germinación de hongos (Nazzaro *et al.*, 2017).

Las concentraciones de 0.5, 1 y 2 % no mostraron diferencias estadísticas en el crecimiento micelial (Figura 2), por ello, la concentración de 0.5 % (5 mL L⁻¹) resulta prometedora desde el punto de vista económico, al ser una concentración menor se puede preparar un mayor volumen porque solo se requieren 5 mL L⁻¹, mientras que con la concentración de 1 y 2 % se requieren 10 y 20 mL L⁻¹, respectivamente, por lo que convendría implementar evaluaciones *in vivo*. Sin duda, aislar cada compuesto mayoritario y evaluar su efecto biológico individual será una próxima tarea, como también lo será la evaluación experimental de diferentes concentraciones del surfactante, debido a su efecto inhibitorio sobre el crecimiento micelial y deberá discriminarse su interacción con el aceite esencial.

Con hidrolato al 75 (H75) y 100 % (H100), el porcentaje de inhibición fue 74 y 85 % y la velocidad de crecimiento de 5 y 3.54 mm día⁻¹, respectivamente. Al reducir la concentración, la inhibición en el crecimiento micelial también se redujo, como el caso de hidrolato 25 % (H25) que inhibió 30 %, esta misma tendencia siguió la velocidad de crecimiento micelial (Figura 3). Algunos estudios sobre hidrolatos de varias especies vegetales en la actividad antifúngica *in vitro* e *in situ* destacan efectos biológicos atribuibles a su composición química y a las cantidades muy pequeñas de aceites esenciales que permanecen dispersas (Jakubczyk *et al.*, 2021).

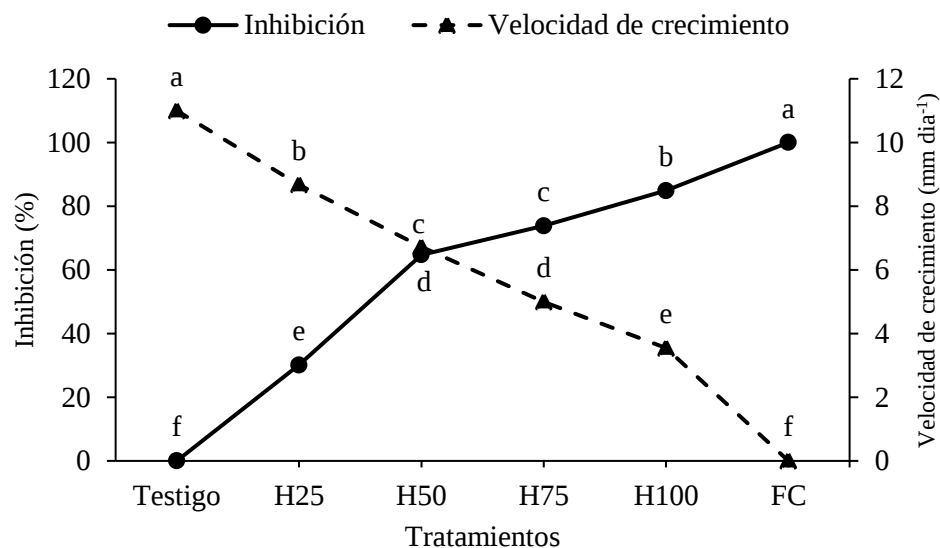


Figura 3. Efecto del hidrolato de *T. remotiflora* en el crecimiento micelial de *B. cinerea* a los cinco días. FC: fungicida comercial, H25: hidrolato 25 %, H50: hidrolato 50 %, H75: hidrolato 75 %, H100: hidrolato 100 %. Medias con letras iguales en cada variable no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

Los componentes activos del hidrolato pueden difundirse mejor en el medio acuoso alrededor de los microorganismos y su actividad aumenta en comparación con los aceites esenciales que necesitan solubilización inicial en un disolvente orgánico antes de su introducción en el medio acuoso (Karampoula *et al.*, 2016); esta situación refuerza la necesidad de explorar el papel del surfactante en bioensayos con aceite esencial que, para disolver en agua, requiere de ese insumo.

El efecto inhibitorio del hidrolato de *T. remotiflora* en el crecimiento del micelio de *B. cinerea* coincide con otros estudios en los que se han utilizado hidrolatos de diferentes especies como *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Sw. y *Zingiber officinale* Roscoe que inhiben en 50 % el desarrollo *in vitro* de *Moniliophthora roreri* H.C. Evans

et al. (Ramírez *et al.*, 2011) y de *Allium sativum* y *Allium fistulosum* que inhiben a *Botrytis alli* y *Sclerotium cepivorum* (Lozano *et al.*, 2000).

El efecto inhibitorio del 74 a 85 % en *B. cinerea* (Figura 3) conforma la primera evidencia sobre hidrolatos de *Tagetes* como sustancia fungistática, por lo tanto, en la perspectiva de su evaluación *in vivo*, es necesaria la descripción del perfil químico mediante cromatografía líquida. En general, los hidrolatos poco se han explorado en su composición (Jakubczyk *et al.*, 2021).

El tratamiento testigo con el surfactante Tween 20 (Tw20), usado solamente para la preparación de los tratamientos de aceite esencial, propició inhibición del crecimiento micelial (32 %) con respecto al testigo (0 %) y de efecto parecido al producido con aceite esencial en 0.0001 a 0.5 % (Figura 2) y al hidrolato 25 % (Figura 3).

Con el análisis probit (Cuadro 3), valores de DMI bajos correspondieron al aceite esencial (0.16 y 0.51 %), mientras que valores altos al hidrolato (41 y 127 %); es decir, se detectaron tendencias de inhibición parcial o completa del crecimiento micelial al aplicar destilados de *T. remotiflora*, se destaca que con dosis de 0.51 % de aceite se puede inhibir 90 % del crecimiento del micelio de *B. cinerea*, un resultado promisorio para establecer evaluaciones *in vivo*.

Cuadro 3. Dosis mínimas de inhibición para *B. cinerea*, estimadas por análisis probit a los cinco días de crecimiento.

Destilados	Dosis	
	DMI 50 (%)	DMI 90 (%)
Aceite esencial	0.16	0.51
Hidrolato	41.15	127.51

DMI: dosis mínima inhibitoria

Con aceite esencial homeopático 6 CH, se logró inhibir el crecimiento micelial de *B. cinerea* con significancia estadística ($p < 0.0001$). A medida que la dilución aumentó, no se observó un comportamiento definido en el crecimiento del micelio; por ejemplo, 1 CH (baja dilución), 4 CH (baja dilución), 60 CH (dilución media) y 200 CH (alta dilución) inhibieron 12.93, 3.8, 6.94 y 5.72 %, respectivamente (Figura 4). El efecto biológico de sustancias homeopáticas se ha observado con azufre homeopático 100 CH (Vargas *et al.*, 2016), *Arnica montana* Hook y *Thuja occidentalis* L. 30 CH (Hanif y Dawar, 2017), calcárea carbónica 1000 CH (Dos Reis y Ottoni, 2021) y “nosode” de *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) de Bary 24 CH (Rissato *et al.*, 2016), los cuales inhiben desde 40 hasta 90 % el crecimiento micelial y producción de esclerocios en: *S. sclerotiorum*, *Phytophthora colocasiae* Racib., *Alternaria solani*, *Aspergillus niger* Tiegh., *Fusarium* spp., *Rhizoctonia solani* Kühn y *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid.

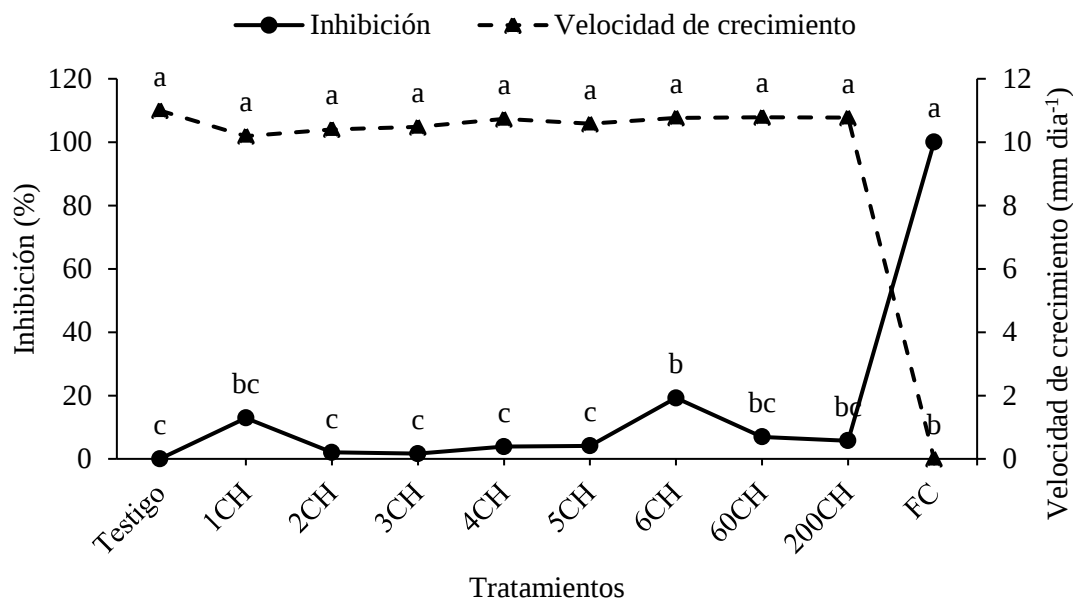


Figura 4. Efecto de aceite esencial homeopático de *T. remotiflora* en el crecimiento micelial de *B. cinerea* a los cinco días. CH: escala de dilución centesimal Hahnemanniana. Medias con letras iguales en cada variable no son estadísticamente diferentes (Tukey, $p \leq 0.05$).

En *B. cinerea* únicamente se ha evaluado “nosode” de *B. cinerea* 7 CH y arsénico 6 CH, inhibitorios en 31.2 y 11.8 %, respectivamente (Larios-Palacios *et al.*, 2020); dentro de esos porcentajes de inhibición se ubicó la respuesta de inhibición (19.20 %) derivada del uso de aceite homeopático 6 CH de *T. remotiflora* (Figura 4). El efecto de las sustancias homeopáticas se debe a que con el proceso de dilución y sucusión se generan nanopartículas (del material de origen, en este caso, del aceite esencial) con mayor actividad biológica que con macromoléculas (Rajendran, 2017).

Es decir, durante este proceso (dilución-sucusión) el solvente puede ser modificado en su estructura física por la presencia, dilución y sucusión de los diferentes solutos, aún cuando estos hayan desaparecido en las progresivas diluciones (Montfort, 2019) y esa transferencia y aplicación de información que se vincula a las moléculas del solvente es la que mantiene el efecto o mecanismo de acción (Liu *et al.*, 1996).

La evaluación del aceite esencial homeopático de *T. remotiflora* en el modelo de *B. cinerea* es el primero con plantas de *Tagetes* y se suma a los escasos trabajos sobre aceites esenciales homeopáticos de especies vegetales aromáticas contra hongos fitopatógenos. La necesidad de reducir el uso de agroquímicos en la agricultura de México ha incrementado el interés por la posible aplicación de extractos vegetales, aceites esenciales y sustancias homeopáticas en el control de fitopatógenos, de ahí que la atención al estudio y aprovechamiento de las especies aromáticas del país, como en el caso de *Tagetes*, podría ser fuente de soluciones promisorias, por lo que la evaluación *in vivo* de los resultados de este trabajo es necesaria, misma que está en proceso.

3.5 Conclusiones

El aceite de *T. remotiflora* contiene 37 compuestos químicos, cuatro de ellos mayoritarios. En función de la concentración, tanto del aceite esencial del taxón como de su hidrolato, es posible inhibir parcial o completamente el crecimiento micelial y esporulación de *B. cinerea*; el análisis probit confirma los efectos biocidas del aceite esencial y fungistático del hidrolato contra *B. cinerea*. El aceite esencial homeopático tiene efecto fungistático

menor. La evaluación *in vivo* de los destilados de *T. remotiflora* y del aceite esencial homeopático es importante para confirmar su efectividad como insumos de biocontrol contra *B. cinerea* y el mecanismo de acción de estas sustancias requiere investigación para comprender su efecto a nivel molecular.

3.6 Literatura citada

Abata, L. K.; Izquierdo, A. R.; Viera, W. and Flores, F. J. 2016. First report of botrytis rot caused by *Botrytis cinerea* on Peach in Ecuador. *Journal of Plant Pathology*. 98(3):677-697.

Aćimović, M. G.; Tešević, V. V.; Smiljanić, K. T.; Cvetković, M. T.; Stanković, J. M.; Kiprovska, B. M. and Sikora, V. S. 2020. Hydrolates by products of essential oil distillation: chemical composition, biological activity and potential uses. *Advanced Technologies*. 9(2):54-70.

Balouiri, M.; Sadiki, M. and Ibnsouda S. K. 2016. Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A review. *Journal of Pharmaceutical Analysis* 6(2):71-79.

Barnett, H. L. and Hunter B. B. 1986. Taxonomy and identification in illustrated genera of imperfect fungi. 4th ed. American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 234 p.

BASF. 2023. Cabrio® C, fungicida para el cultivo de vegetales: Informaciones. Ciudad de México. <https://www.basf.com/mx/es.html>

- Bicchi, C. 2000. Gas chromatography, essential oils. Reference module in chemistry, molecular sciences and chemical engineering. 158-168.
- Boddy, L. 2016. Pathogens of autotrophs. *In*: The fungi. 3rd ed. Watkinson, S. C.; Boddy, L. and Money N. P. (eds.). Academic Press. Cambridge, Massachusetts, USA. 245-292 pp.
- Brandhoff, B.; Simon, A.; Dornieden, A. and Schumacher, J. 2017. Regulation of conidiation in *Botrytis cinerea* involves the light-responsive transcriptional regulators bcltf3 and bcreg1. Current Genetics. 63(5): 931-949.
- Calvo-Irabien, L. M. 2018. Native Mexican aromatic flora and essential oils: current research status, gaps in knowledge and agro-industrial potential. Industrial Crops and Products. 111:807-822.
- Dos Reis, A. C. B. and Ottoni, O. J. R. 2021. Antifungal activity of homeopathic medicines against the white mold causing agent *Sclerotinia sclerotiorum*. Acta Scientiarum, Biological Sciences. 43(1):e56548.
- Fedele, G.; Gonzalez-Dominguez, E.; Si Ammour, M.; Languasco, L. and Rossi, V. 2019. Reduction of *Botrytis cinerea* colonization of and sporulation on bunch trash. Plant Disease. 104(3): 808-816.
- Hanif, A. and Dawar, S. 2017. Antifungal activity of homeopathic drugs treated seeds against root decay pathogens and improvement of growth on crop plants. Pakistan Journal of Botany. 49(S1):355-362.

- Jakubczyk, K.; Tuchowska, A. and Janda-Milczarek, K. 2021. Plant hydrolates- Antioxidant properties, chemical composition and potential applications. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 142:112033.
- Karampoula, F.; Giaouris, E.; Deschamps, J.; Doulgeraki, A. I.; Nychas, G. J. and Dubois-Brissonnet, F. 2016. Hydrosol of *Thymbra capitata* is a highly efficient biocide against *Salmonella enterica* Serovar Typhimurium biofilms. *Applied and Environmental Microbiology*. 82(17):5309-5319.
- Larios-Palacios, O. E.; López-Vázquez, E. Y.; Curiel, R. A.; Ruíz-Espinoza, F. J.; Solano-Vidal, R. y Serrato-Cruz, M. A. 2020. Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 11(3):593-606.
- Liu, K.; Cruzan, J. and Saykally, R. 1996. Water clusters. *Science* 271(5251):929-933.
- Lozano, C.; Cordoba, N.; Avila-De-Moreno, C. y Velosa, M. 2000. Evaluación del efecto de hidrolatos de ajo (*Allium sativum*) y cebolla junca (*Allium fistulosum*) en el desarrollo de los hongos fitopatógenos *Botrytis alli* y *Sclerotium cepivorum*. *Fitopatología Colombiana*. 24(1/2):29-32.
- Montfort, C. H. 2019. De la naturaleza y los mecanismos de acción de las ultra diluciones homeopáticas (UDH). *Contribuciones teórico-experimentales realizadas en México. La Homeopatía de México*. 88(718):20-26.
- Mutlu-Ingok, A.; Devecioglu, D.; Dikmetas, D. N.; Karbancioglu-Guler, F. and Capanoglu, E. 2020. Antibacterial, antifungal, antimycotoxigenic, and antioxidant activities of essential oils: an updated review. *Molecules*. 25(20):4711.

- Nazzaro, F.; Fratianni, F.; Coppola, R. and Feo, V. 2017. Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*. 10(4):86.
- Oliveira, J. S. B.; Schwan-Estrada, K. R. F.; Bonato, C. M. e Carneiro, S. M. T. P. G. 2017. Homeopatas de óleos essenciais sobre a germinação de esporos e indução de fitoalexinas. *Revista Ciência Agronômica*. 48(1):208-215.
- Proto, M. R.; Biondi, E.; Baldo, D.; Levoni, M.; Filippini, G.; Modesto, M. and Mattarelli, P. 2022. Essential oils and hydrolates: potential tools for defense against bacterial plant pathogens. *Microorganisms*. 10(4):702.
- Rajendran, E. S. 2017. Nano pharmacological aspect of homeopathic drugs-A comparative study of different scales of ultra-high dilutions based on HRTEM analysis and NP characterization of homeopathic drug natrum muriaticum 6C-CM and LM1-LM30. *Saudi Journal of Medical and Pharmaceutical Sciences*. 3(2):89-106.
- Ramírez, G. S.; López, B. O.; Guzmán, H. T.; Munguía, U. S. y Espinosa, Z S. 2011. Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par). *Tecnología en Marcha*. 24(2):3-17.
- Rincón, E. G.; Quiñones, E. E.; Serrato, C. M. A. y Qui, Z. J. A. 2012. Efectividad biológica de extractos de *Tagetes* spp. sobre bacterias fitopatógenas. SNICS-SINAREFI, CIATEJ, México, D. F. 44 p.

- Rissato, B.; Stangarlin, J.; Coltro, S.; Dildey, O.; Goncales, E. and Lorenzetti, E. 2016. *In vitro* activity of homeopathic drugs against *Sclerotinia sclerotiorum*. Scientia Agraria Paranaensis. 15(3):320-323.
- Rodríguez, A. M.; Alcaraz, M. L. y Real, C. S. R. 2012. Procedimientos Para la Extracción de Aceites Esenciales en Plantas Aromáticas. SAGARPA-CONACYT 126183. México. 47 p.
- Romagnoli, C.; Bruni, R.; Andreotti, E.; Rai, M. K.; Vicentini, C. B. and Mares, D. 2005. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of capitula from wild Indian *Tagetes patula* L. Protoplasma. 225(1-2):57-65.
- Romanazzi, G. and Feliziani, E. 2014. *Botrytis cinerea* (Gray Mold). En Elsevier eBooks (pp. 131-146). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-411552-1.00004-1>
- Salehi, B.; Valussi, M.; Morais-Braga, M.; Carneiro, J.; Leal, A.; Coutinho, H... and Sharifi-Rad, J. 2018. *Tagetes* spp. essential oils and other extracts: chemical characterization and biological activity. Molecules 23(11):2847.
- SAS Institute Inc. 2024. SAS® OnDemand for Academics. <https://welcome.oda.sas.com/>
- SAS Institute Inc. 2023. SAS® OnDemand for Academics. https://www.sas.com/es_mx/software/on-demand-for-academics.html
- Serrato, C. M. A. 2014. El Recurso genético cempoalxóchitl (*Tagetes* spp.) de México (Diagnóstico). Universidad Autónoma Chapingo SAGARPA-SNICS-SINAREFI. Chapingo, Estado de México. 183 p.

- Teixeira, M. Z.; Solange, M. T. and Carneiro, P. G. 2017. Effects of homeopathic high dilutions on plants: literature review. *Revista de Homeopatía*. 80(3/4):104-120.
- Thermo Fisher Scientific. 2023. Ficha de datos de seguridad. Ciudad de México. extension://elhekieabhbkmcefcobjddigjcaadp/https://www.fishersci.es/store/msds?partNumber=10113103&productDescription=100ML+Tween*+20&countryCode=ES&language=es. (Enero 2023).
- Toledo, M. V.; Stangarlin, J. R. and Bonato, C. M. 2011. Homeopathy for the control of plant pathogens. *In: Science Against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances*. Méndez-Vilas, A. (ed.). Formatex Research Center. Badajoz, España. 1063-1067 pp.
- Vargas, T. M.; Jose, R.; Stangarlin, J. R.; Moacir, B. C.; Muriel, M. T.; Anghinoni, M. M... and Assi, L. 2016. Fungitoxicity activity of homeopathic medicines on *Alternaria solani*. *African Journal of Agricultural Research*. 11(39):3824-3838.
- Villaseñor, J. L. 2018. Diversity and distribution of the Asteraceae family in Mexico. *Botanical Sciences* 96(2):332-358.
- Xu, L.; Chen, W. J.; Qi, H. and Shi, Y. P. 2012. Phytochemicals and their biological activities of plants in *Tagetes* L. *Chinese Herbal Medicine*. 4(2):103-117.

Artículo publicado en la Revista Mexicana de Fitopatología

CAPÍTULO IV: Composición química de hidrolatos de *Tagetes* y evaluación *in vitro* e *in vivo* contra hongos asociados a enfermedades en fresa (*Fragaria x ananassa*)

Miguel Angel Ruiz-Gonzalez¹, Miguel Ángel Serrato-Cruz^{1*}, Ernestina Valadez-Moctezuma¹, Roney Solano-Vidal¹, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Chapingo, Estado de México.

*Autor de correspondencia: serratocruz@gmail.com

4.1 Resumen

Objetivo / Antecedentes. Las plantas aromáticas contienen compuestos químicos con potencial para formular productos antifúngicos. El objetivo de esta investigación fue caracterizar la composición química en hidrolatos de especies de *Tagetes* y evaluar su efecto *in vitro* e *in vivo* contra hongos asociados a enfermedades en fresa.

Materiales y métodos. Los hidrolatos de *T. coronopifolia*, *T. minuta*, *T. parryi* y *T. terniflora* fueron analizados mediante cromatografía de gases acoplado a detector selectivo de masas. Se evaluaron *in vitro* hidrolatos al 100, 75, 50 y 25 % y fungicidas comerciales Promyl contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y Ridomil Gold contra *Phytophthora capsici*. En la evaluación *in vivo* las plantas de fresa se asperjaron con hidrolatos y 24 h después fueron inoculadas con suspensión de esporas 1×10^6 . Los datos se analizaron mediante análisis de varianza y pruebas de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Resultados. Los monoterpenos fueron los compuestos mayoritarios en las cuatro especies. El hidrolato de *T. parryi* *in vitro* inhibió totalmente el crecimiento de *B. cinerea* y fue efectivo como tratamiento preventivo en la evaluación *in vivo*. *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* fueron menos susceptibles a todos los hidrolatos.

Conclusión. El hidrolato de *T. parryi* se puede aplicar como preventivo contra *B. cinerea* en plantas de fresa.

Palabras clave: Enfermedades fungosas, *Fragaria*, inhibición, antifúngico

4.2 INTRODUCCIÓN

En México, la superficie sembrada de fresa (*Fragaria x ananassa*) en el año 2018 fue de 13,562 ha y en 2022 se redujo a 7,872 ha (SIAP, 2022), esta disminución se debe a problemas fitosanitarios que afectan su producción, asociados con diferentes especies de hongos, entre ellos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* spp. (Golzar *et al.*, 2007), *Phytophthora* spp. (Serret-López *et al.*, 2016) y *Botrytis cinerea* (Boddy, 2016), esta situación repercute en pérdidas de hasta 50 % de la producción (Bárcenas-Santana *et al.*, 2019). Para el control de estos hongos, se ha recurrido principalmente al uso de agroquímicos, sin embargo, el uso y dosis inadecuadas de estos ha generado efectos negativos en el ambiente y en el humano, también los hongos han desarrollado resistencia a fungicidas, aún así, su uso se intensifica y se han vuelto indispensables para la seguridad alimentaria mundial (Zubrod *et al.*, 2019). Esta situación ha motivado a investigadores y productores a explorar alternativas, como los extractos de plantas o compuestos derivados de las mismas que se han utilizado con éxito en el control de hongos fitopatógenos. Los extractos vegetales tienen la ventaja de contener más de un compuesto antifúngico, por lo que el desarrollo de resistencia del patógeno es menos probable si los diferentes compuestos afectan a un proceso metabólico diferente (Shuping y Eloff, 2017). Es importante considerar que en los extractos el rendimiento y la composición química es variable y depende de las condiciones climáticas, el sitio de cultivo y el tiempo de cosecha (Santos-Gomes *et al.*, 2001; Bhat *et al.*, 2016). Además, debido a su naturaleza volátil y a la termolabilidad de sus componentes, son muy susceptibles a la degradación (Odak *et al.*, 2018). Por lo anterior, el conocimiento científico previo de los recursos naturales o de las condiciones de manejo, tanto en campo como en almacenamiento, resulta indispensable para el aprovechamiento sustentable local de plantas y su transformación a insumos de

biocontrol de hongos fitopatógenos como una vía de sustitución de pesticidas en sistemas de producción agrícola.

Tagetes (Asteraceae) es un recurso vegetal que en México está representado por 35 especies aproximadamente, varias con potencial en el control de hongos (Serrato, 2014), los extractos acuosos de algunas especies de *Tagetes* se han evaluado mostrando resultados promisorios, por ejemplo, *T. erecta* o cempasúchil es efectivo en el control de *Fusarium oxysporum* (Wang *et al.*, 2022) y *Rhizoctonia solani* (Espejo *et al.*, 2010), en tanto que *in vitro*, el aceite esencial de *T. lemmoni* o rudilla inhibe totalmente el crecimiento micelial de *B. cinerea* (Larios-Palacios *et al.*, 2020). Durante el proceso de hidrodestilación de plantas aromáticas se obtiene un extracto acuoso conocido como hidrosol, agua aromática, hidroflorato o hidrolato, su obtención es rápida, barata y se caracteriza por contener aceite esencial en concentraciones bajas ($< 1 \text{ mL L}^{-1}$), además de algunos componentes de aceite polares, oxigenados e hidrófilos que forman enlaces de hidrógeno con el agua (Tisserand y Young 2014; Labadie *et al.*, 2016; Taglienti *et al.*, 2022). Los hidrolatos se utilizan en perfumería, cosmética, como saborizantes de alimentos, aromaterapia y terapias tradicionales (Rajeswara, 2013). Los estudios sobre el efecto biológico de los hidrolatos aún son limitados en comparación con los realizados con aceites esenciales (Yann-Olivier *et al.*, 2018). En el área agrícola, se han usado con éxito hidrolatos de *Ocimum basilicum*, *Cuminum cyminum*, *Echinophora tenuifolia*, *Daucus carota* subsp. *sativus*, *Rosmarinus officinalis* y *Satureja hortensis* para controlar algunos hongos fitopatógenos como *Alternaria citri*, *Alternaria mali*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*, *Penicillium expansum* y *Rhizoctonia solani* (Boyraz y Özcan, 2005; Boyraz y Özcan, 2006; Zatlá *et al.*, 2017). Por mucho tiempo, a los hidrolatos se les ha definido como productos de desecho de la hidrodestilación, pero en la actualidad se empiezan a utilizar como una alternativa para controlar hongos fitopatógenos. Por ello, la exploración y evaluación de otras especies aromáticas en el control de hongos de alta incidencia en cultivos como la fresa es indispensable. Considerando que *Tagetes* es un recurso natural abundante en México y, por lo tanto, fuente potencial de hidrolato como insumo para el biocontrol de hongos fitopatógenos, el objetivo de esta investigación fue caracterizar la composición química en hidrolatos de

especies de *Tagetes* y evaluar su efecto *in vitro* e *in vivo* contra hongos asociados a enfermedades en fresa.

4.3 MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo vegetal. En el campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (19.491733, -98.873179), en el mes de mayo de 2022 bajo condiciones de invernadero se cultivaron plantas de *Tagetes*: *T. coronopifolia*, *T. minuta*, *T. parryi* y *T. terniflora*, las cuales en etapa de floración fueron recolectadas en el mes de octubre y con tijeras de poda se cortaron en segmentos de 2 cm aproximadamente. La cantidad de 4 kg de una mezcla de flores (25 %), hojas (35 %) y tallos (40 %) se introdujo en matraz de destilador tipo italiano y posteriormente se agregaron 2 L de agua potable, se encendió el termostato (135 ± 5 °C) y durante 40 min se hizo la hidrodestilación (Uddin *et al.*, 2023). Se obtuvieron 400 mL kg⁻¹ de hidrolato fresco, se depositó en frascos de plástico y se conservó a una temperatura de 4 °C hasta su uso. Tres especímenes de cada especie fueron ingresados al Herbario Jorge Espinoza Salas de la Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo con números de registro 36282, 36280, 33299 y 36281, respectivamente.

Identificación de compuestos químicos. Los hidrolatos se analizaron en un Cromatógrafo de Gases (CG) Agilent 7890B acoplado a Detector Selectivo de Masas (MSD) Agilent 5977A (CRO-E-003) y equipado con una columna DB-WAX Ultra Inert 60 m x 250 µm x 0.25 µm. La rampa de temperatura fue 40 °C por 1 min hasta 240 °C a una velocidad de 9 °C min⁻¹. Se utilizó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL min⁻¹ durante los 24 min que duró la corrida. Los hidrolatos se filtraron en un microfiltro de PTFE de 45 µm, enseguida, se disolvieron 100 µL de la muestra en 400 µL de diclorometano grado HPLC, el extracto se concentró hasta un volumen de 1 mL y se inyectó 1 µL al cromatógrafo de gases en modo splitless. Los compuestos se identificaron con base en los patrones de fragmentación de los espectros de masas, los cuales se compararon con los espectros de masas depositados en la base de datos del NIST 14 (National Institute of Standards and Technology) y la base de datos de fragancias Flavor

(Agilent Technologies). Se realizó la determinación de los índices de retención de Kovats con alcanos C7-C40 (Sigma-Aldrich). Los índices de retención de Kovats experimentales se compararon con los índices de Kovats de la literatura (NIST:webbok.nist.gov/chemistry/) considerando que el índice de Kovats experimental coincidiera (± 50 unidades) con el de la literatura para la identificación correcta del compuesto. La abundancia relativa de cada compuesto se estimó con base en el área de los picos.

Procedencia de los hongos. *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* fueron aislados a partir muestras de chile manzano (*Capsicum pubescens*) recolectadas en una plantación de chile manzano ubicado en el campo experimental agrícola Chapingo y *Botrytis cinerea* se aisló a partir de muestras de flores de rosa silvestre (*Rosa* sp.) recolectadas en el municipio de Acaxochitlán, Hidalgo. El tejido vegetal fue desinfestado con hipoclorito de sodio al 1 % y lavado tres veces con agua bidestilada, después, en medio de cultivo Agar Dextrosa y Papa (PDA) (BD Bioxon) se colocaron fragmentos de 5 mm del tejido vegetal para aislar los hongos y el oomiceto se aisló en medio de cultivo que contenía 20 g de harina de maíz, 18 g de agar-agar, 0.8 mL de pimaricina, 0.02 g de rifamicina y 0.25 g L⁻¹ de ampicilina diluida en agua destilada. Las cajas Petri se dejaron a temperatura ambiente y fueron monitoreadas cada 24 h hasta observar crecimiento micelial. A las 72 h, se observó crecimiento y se transfirió inóculo a nuevo medio de cultivo para obtener cultivos puros. Después, *F. oxysporum*, *R. solani* y el oomiceto *P. capsici* fueron identificados mediante su morfología (Nelson *et al.*, 1983; Gutiérrez *et al.*, 2006; Leslie y Summerell, 2006; Plancarte *et al.*, 2017). *B. cinerea* también se identificó mediante su morfología y con pruebas de patogenicidad en frutos de fresa (Barnett and Hunter, 1986; Terrones-Salgado *et al.*, 2019); además, se hizo extracción de ADN con método SDS (Dodecil Sulfato Sódico), después se hizo amplificación en PCR utilizando iniciadores NL4 y ITS5HP (Raja *et al.*, 2017), el programa térmico se fijó a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 – 56 – 72 °C durante 1 – 1 – 2.3 s, respectivamente y una extensión final a 72 °C durante 10 min. Los productos amplificados de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis utilizando geles de agarosa al 1.2 %. Los fragmentos amplificados y purificados se

enviaron a Macrogen para la secuenciación. Las secuencias en formato FASTA se compararon con la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), con lo cual se corroboró la identidad del patógeno y el número de acceso en GenBank para *B. cinerea* es PP401673.1. Para la identificación molecular de los otros organismos, la extracción de ADN se hizo con el método CTAB (Weising *et al.*, 2005) con modificaciones, el micelio se obtuvo de cajas Petri con crecimiento de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* y se colocó en morteros, se agregó nitrógeno líquido y el micelio se maceró con pistilo estéril. En tubos Eppendorf de 2 mL se agregó 1 mL de CTAB 2 % + 0.2 % β -mercaptoetanol y se agregó el micelio macerado, se agitó por inmersión, se incubó a 55 °C en termoblok durante 20 min con agitación cada 5 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 5 min a 12,000 x g, con micropipetas se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se agregaron 1.2 volumen de isopropanol al 100 %, se agitó por inmersión y se llevaron a centrifugar durante 10 min a 12,000 x g, se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado con etanol al 70 %, los tubos con el ADN precipitado se centrifugaron durante 10 min a 12,000 x g y al final se decantó el etanol, los tubos se colocaron invertidos sobre papel absorbente hasta que el pellet se secó, finalmente a cada tubo se le adicionaron 50 μ L de TE y se mantuvieron a -20 durante 24 h. La concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro a 260 nm en un Nanodrop V3.5.2 (Coleman Technologies Inc. For Nanodrop Technologies). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L, se usaron iniciadores NL4-ITS5SHP, ITS4-ITS5HP, ITS1-NL4, ITS1-ITS4B para amplificar la región ITS, los iniciadores NMSI-NMS2 para amplificar la subunidad pequeña del ribosoma y los iniciadores EF1-EF2 para amplificar el gen TEF (Raja *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2022). Las condiciones de PCR para la región ITS y subunidad pequeña del ribosoma fueron las siguientes: un primer ciclo de pre-desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, alineamiento a 58 °C durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 1 min y finalmente con una extensión a 72 °C durante 10 min. Las condiciones de PCR para TEF fueron: un primer ciclo de pre-desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, alineamiento a 55 °C durante 45 s y extensión a 72 °C durante 1.5 min y finalmente con una extensión a 72 °C durante 10 min. El producto de amplificación por PCR se visualizó en electroforesis, se

preparó un gel de agarosa al 1.2 % con buffer TAE 1x, corrido a 100 volts durante 1 h, para el revelado de bandas, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15 min, después se visualizó con software Qwanty One (BioRad). El tamaño de las bandas se estimó tomando como referencia los marcadores de peso molecular 1 kb (Invitrogen) que fueron colocadas en los extremos. Los productos amplificados se conservaron a 4 °C para su análisis. Los fragmentos amplificados y purificados se enviaron a Macrogen para la secuenciación. Las secuencias en formato FASTA se compararon con la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), con lo cual se corroboró la identidad de los patógenos, después se hizo el registro en la base datos del GenBank. El número de registro para cada hongo es: *F. oxysporum* (PP729638.1), *R. solani* (PP713022.1) y *P. capsici* (PP922286.1).

Evaluación *in vitro*. Se preparó medio PDA mezclado con hidrolato en cuatro concentraciones (100, 75, 50 y 25 % v/v) por cada especie, las concentraciones del hidrolato se prepararon mediante diluciones con agua bidestilada y se obtuvieron 16 tratamientos de hidrolato y el testigo con PDA. Como testigos de referencia se usaron fungicidas comerciales de la Distribuidora Técnica Industrial, S. A. de C. V. y Syngenta Agro, S.A de C.V. distribuidos en Artículos Entomológicos S. A. de C. V. Texcoco. Promyl (Benomilo: Metil 1-(butilcarbamoil) bencimidazol-2-il-carbamato) se usó para *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Vega-López y Granados-Montero, 2023) y Ridomil Gold (N-(metoxiacetil)-N-(2,6-xilil)-D-alaninato de metilo) para *Phytophthora capsici* (Pons-Hernández *et al.*, 2020). De cada fungicida se usó 1.5 g L⁻¹. Después de preparar el medio de cultivo, en el centro de cada caja Petri que contenía el medio de cultivo combinado con hidrolato se colocó un disco (3.5 mm) con micelio de cada hongo (colonias de 10 días de edad) y después se incubaron en condiciones de oscuridad con las siguientes temperaturas: *B. cinerea* a 20 °C, *P. capsici* a 27 °C, *F. oxysporum* y *R. solani* a 30 °C. Cada 24 h se midió el crecimiento radial con un vernier digital.

Evaluación *in vivo*. Solo los tratamientos que tuvieron el mayor efecto de inhibición en condiciones *in vitro* se retomaron para su evaluación *in vivo*. La evaluación se hizo en un

invernadero y se usaron plantas de fresa var. “FESTIVAL” provenientes de Zamora, Michoacán de cinco meses de edad en fase de floración mantenidas en maceta con tezontle rojo; la fertilización se hizo con solución Steiner al 100 % con riegos semanales y con aplicación semanal de fertilizante foliar PEKA® (1 mL L⁻¹) (Producto elaborado por Química Sagal y distribuido en Agroquímicos Texcoco S.A. de C. V.). Cuando las plantas estaban en fructificación, se seleccionaron cuatro frutos maduros a los que se les hizo solo una perforación de 0.2 cm de profundidad con aguja de disección esterilizada con alcohol y a cada planta se le asperjaron 20 mL de hidrolato con atomizador, 24 h después de la aplicación de hidrolatos se inocularon las plantas con una suspensión de esporas 1×10^6 de *F. oxysporum* y *B. cinerea* preparada con agua bidestilada y 1 mL L⁻¹ de Tween 20, la aplicación de las esporas se hizo con atomizador, *P. capsici* y *R. solani* se inocularon mediante micelio. Las plantas inoculadas se cubrieron con una bolsa de polietileno durante 48 h para mantener la humedad, posteriormente, las hojas, frutos maduros, frutos inmaduros y flores fueron monitoreadas cada 24 h hasta las 72 h para la detección de síntomas causados por los patógenos (*B. cinerea*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani*).

Diseño experimental y análisis de datos. El experimento *in vitro* se analizó bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cinco repeticiones cada uno, una caja Petri fue una unidad experimental. Con los datos del crecimiento radial se calculó el porcentaje de inhibición (Kagezi *et al.*, 2015). El experimento *in vivo* se hizo con un DCA, se usaron cuatro macetas por tratamiento, una maceta fue considerada una unidad experimental, con los datos registrados sobre los frutos y flores enfermos y no enfermos se estimó la incidencia de la enfermedad (Macías *et al.*, 2016). Los datos se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) en Software académico SAS.

4.4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuestos químicos. En el hidrolato de *T. parryi* se identificaron 14 compuestos, en *T. minuta* 13, en *T. coronopifolia* 11 y un total de 9 en *T. terniflora* (Figura 5). En el hidrolato de *T. parryi*, los compuestos mayoritarios fueron el 3-Hexen-1-ol (25.5 %), isopiperitanona (14.9 %), 1,3-Di-terc-butilbenceno (6.1 %) y α -terpineol (5.9 %) (Cuadro

4). Al realizar una comparación con compuestos encontrados en aceite esencial de la misma especie, Díaz-Cedillo y Serrato-Cruz (2011) identificaron siete compuestos principales: canfeno, 3, 6, 6-trimetil-2-norpinanol, anisol, 4-isopropil-1-metil-2-ciclohexenol, cineol, eugenol y α -terpineol y González-Velasco *et al.* (2022) registraron 21 compuestos, entre ellos, verbenona, dihidrotagetona, tagetona, eugenol y α -terpineol, la mayoría de estos compuestos son monoterpenos y sesquiterpenos. En el hidrolato de *T. parryi* únicamente el α -terpineol y la dihidrotagetona fueron similares a lo reportado en aceite esencial, por lo que gran parte de los compuestos resultaron diferentes de lo consignado para el aceite esencial.

En el hidrolato de *T. coronopifolia* se encontró dihidrotagetona (53.9 %), cis-tagetona (11.9 %), (Z)-tagetenona (9.7 %) y trans-tagetona (5.9 %) (Cuadro 4); ningún compuesto encontrado en la muestra de hidrolato coincidió con lo reportado para el aceite esencial por Díaz-Cedillo *et al.* (2013): (1S)-6,6-dimetil-2-metilen-biciclo [3.1.1] heptan-3-ona, verbenona, 2-oxo-decanoato de metilo y crisantenona.

En hidrolato de *T. terniflora* la dihidrotagetona (45 %), eucaliptol (13.2 %), trans-3-Hexen-1-ol (10.8 %) y cis-tagetona (4.5 %) (Cuadro 4) fueron los mayoritarios. Solo el compuesto cis-tagetona fue común en el aceite esencial e hidrolato analizado (Lizarraga *et al.*, 2017).

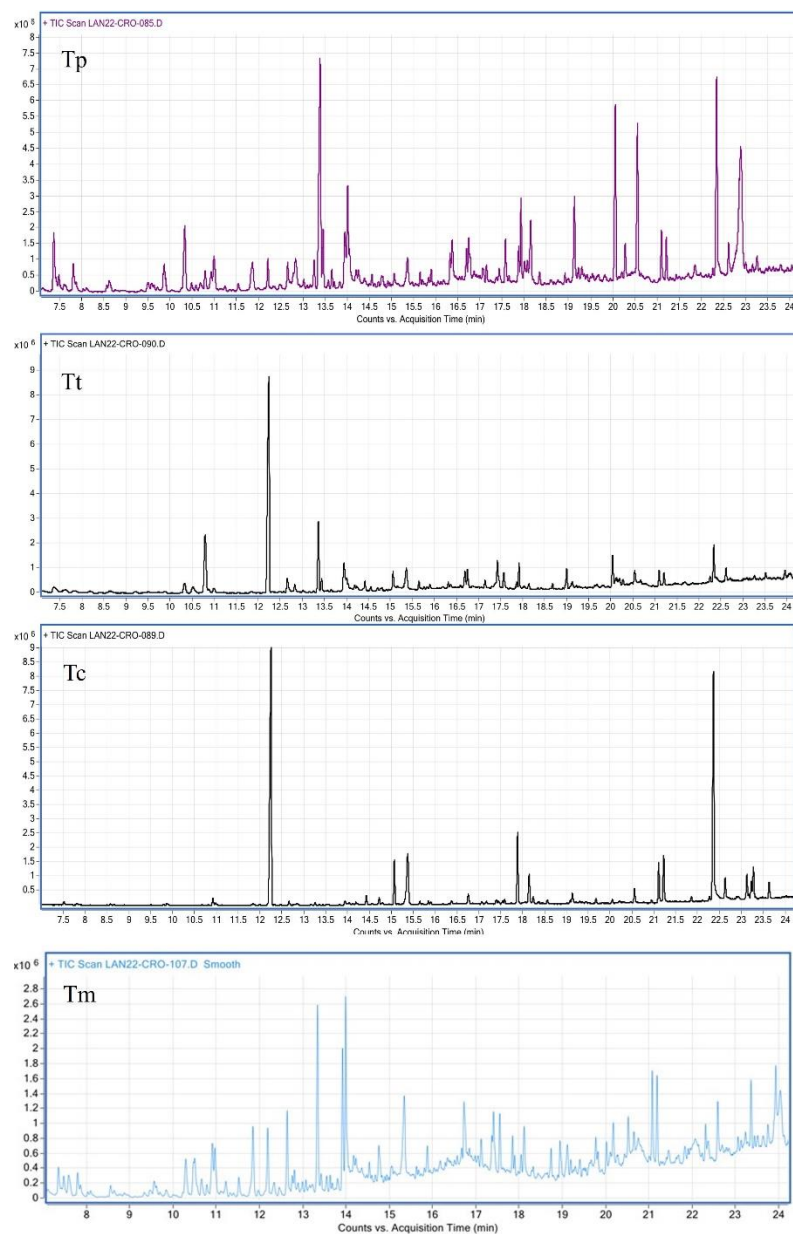


Figura 5. Cromatogramas de hidrolatos de *Tagetes parryi* (Tp), *T. terniflora* (Tt), *T. coronopifolia*, (Tc) y *T. minuta* (Tm), donde se observan los picos de los compuestos identificados.

Cuadro 4. Abundancia relativa (%) e índices de Kovats (IK) $\pm$ desviación estándar de compuestos químicos encontrados en hidrolatos de *Tagetes coronopifolia*, *T. minuta*, *T. parryi* y *T. terniflora* analizados por GC/MSD.

<i>T. parryi</i>	%	IK	<i>T. coronopifolia</i>	%	IK
------------------	---	----	-------------------------	---	----

°	3-Hexen-1-ol, (E)-	25.5	1370	±	+	Dihidrotagetona	53.9	1319	±
			18.5					3.3	
+	Isopiperitenona	14.9	1833	±	+	Cis-tagetona	11.9	1500	±
			41.9					23.1	
-	1,3-Di-terc-butylbenceno	6.1	1426	±	+	(Z)-tagetenona	9.7	1704	±
			9.5					9.5	
+	α-terpineol	5.9	1700	±	+	Trans-tagetona	5.9	1522	±
			14.8					8.2	
+	(Z)-tagetenona	4.5	1704	±	*	10,11-tetradecadianoato de metilo	1.6	1663	±
			24.4					19.8	
+	Cis-tagetona	3.2	1517	±	*	Cariofileno	1.2	1585	±
			10.7					33.5	
*	10,11-tetradecadianoato de metilo	2.3	1663	±	+	2-(3-metil-2-ciclopens-1-il)-2-metilpropionaldehído	0.8	1442	±
			19.8					31.5	
+	Dihidrotagetona	2.2	1319	±	*	β-bisaboleno	0.7	1715	±
			1.3					21.7	
+	Terpinen-4-ol	1.9	1619	±	+	Estragol	0.6	1676	±
			6.4					12.3	
˘	Benceno, 1-etil-2-metil-	1.7	1254	±	+	Isopiperitenona	0.6	1833	±
			9.1					41.5	
+	Eucaliptol	1.5	1199	±	+	Ipsenona	0.3	1444	±
			23.5					5.4	
	3-Hexen-1-ol, propanoato, (Z)-	1.1	1380	±					
°	2-ciclohexeno-1-ona	1	1424	±					
			36.8						
*	Isospathulenol	0.4	2186 ± 0						
<i>T. terniflora</i>		%	IK			<i>T. minuta</i>	%	IK	
+	Dihidrotagetona	45	1319	±	°	3-Hexen-1-ol, (E)-	16.4	1394	±
			3.7					0.28	
+	Eucaliptol	13.2	1212	±	˘	Benceno, 1,3-bis(1,1-dimetiletil)-	14.6	1436	±
			14.6					2.26	
°	3-Hexen-1-ol, (E)-	10.8	1394	±	+	Cis-tagetona	10.1	1517	±
			0.5					10.81	
+	Cis-tagetona	4.5	1517	±	+	Dihidrotagetona	5.6	1319	±
			10.6					1.2	
+	α-Terpineol	3.1	1680	±	°	2 - Clorociclohexanol	4.7	1659	±
			28.7					24.25	
+	Trans-tagetona	2.2	1501	±	+	Trans-tagetenona	4.3	1726	±
			6.2					8.2	
+	Terpinen-4-ol	2.2	1606	±	+	Isopiperitenona	2.8	1833 ± 41	
			15.4						
°	Alcohol feniletílico	0.5	1923	±	*	10,11-tetradecadianoato de metilo	2.5	1663	±
			15.8					19.8	

°	2-ciclohexeno-1-ona	0.5	1412 45.4	±	1-Pentanona, furanil)-p-xileno	1-(2-	1.3	1747 10.5	±
				-			1.2	1142 11.1	±
				+	α-terpineol		1	1697 16.4	±
				+	Terpinen-4-ol		1	1635 4.8	±
				´	Etilbenceno		0.3	1146 2.9	±

+: monoterpenos, *sesquiterpenos, -: compuestos fenólicos, °: alcoholes, ´: compuesto de benceno

En el hidrolato de *T. minuta* el compuesto mayoritario fue el 3-Hexen-1-ol (16.4 %), benceno, 1,3-bis(1,1-dimetiletil)- (14.6 %), cis-tagetona (10.1 %) y dihidrotagetona (5.6 %) (Cuadro 4). Solo la dihidrotagetona fue común con lo que reportan Karimian *et al.* (2014) para esta especie cuyo aceite esencial contiene compuestos como: dihidrotagetona, E-ocimeno, tagetona, cis-β-ocimeno, Z-ocimeno, limoneno y epoxiocimeno.

Los compuestos 3-Hexen-1-ol, (E)-, dihidrotagetona y cis-tagetona fueron comunes en los hidrolatos de las especies de *Tagetes* en estudio (Cuadro 4), mientras que, al comparar la composición química de los hidrolatos con la de aceites esenciales, estos no coinciden en compuestos ni en abundancia, por lo que la composición química de hidrolatos y aceites esenciales siempre es diferente, cuantitativa y cualitativamente (D'Amato *et al.*, 2018). En otros estudios se ha encontrado que tanto en hidrolatos como en los aceites esenciales los monoterpenos y los monoterpenos oxigenados son abundantes, pero no se encuentran los mismos compuestos (Vuko *et al.*, 2021). Inouye *et al.* (2008) compararon 43 hidrolatos con aceites esenciales obtenidos de mismo proceso de destilación al vapor y encontraron que 18 de los 43 hidrolatos analizados mostraron un componente mayoritario diferente al del aceite.

Los aceites esenciales de *Tagetes* son ricos en monoterpenos, además de cantidades bajas de sesquiterpenos y compuestos oxigenados (Salehi *et al.*, 2018). En este estudio, los compuestos mayoritarios en las cuatro especies pertenecen a monoterpenos y en menor cantidad a sesquiterpenos, compuestos fenólicos y algunos alcoholes (Cuadro 4). Aunque ya se tenía información sobre la composición de hidrolatos de dos especies de América

del Sur (Rajeswara *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2009), la identificación de los compuestos en hidrolatos de las cuatro especies de *Tagetes* de México constituyen otro antecedente importante para avanzar en el conocimiento fitoquímico del género.

Evaluación *in vitro*. Los tratamientos evaluados mostraron efectos inhibitorios significativos sobre *B. cinerea* ($p < 0.0001$), *F. oxysporum* ($p < 0.0053$), *P. capsici* ($p < 0.0001$) y *R. solani* ($p < 0.0001$) (Cuadro 5). El hidrolato al 100 % de *T. parryi* inhibió el crecimiento micelial de *B. cinerea* en 71.3 %, sin diferencia estadística respecto al efecto producido por el fungicida comercial, incluso, diluciones de este hidrolato en 50 y 75 % mostraron diferencias estadísticas con el testigo; mientras que, con hidrolato al 100 % o diluido de las otras especies de *Tagetes*, la inhibición del micelio fue menor a 40 %, en la mayoría, sin diferencia estadística respecto del testigo (Cuadro 5). En *P. capsici*, el hidrolato de *T. coronopifolia* al 75 y al 100 % fue efectivo para inhibir totalmente el crecimiento micelial, al igual que el fungicida; con hidrolatos de *T. minuta*, *T. parryi* y *T. terniflora* en diluciones de 50 y 75 % la inhibición de *P. capsici* fue significativa ($p < 0.0001$) con respecto al testigo, pero no respecto al fungicida. Ninguna concentración de los hidrolatos evaluados mostró un efecto fungistático contra *F. oxysporum* y *R. solani*. Los hidrolatos de *T. minuta*, *T. parryi* y *T. terniflora* inhibieron estos hongos en 26.6 %, en el caso de *T. coronopifolia* al 100 %, se inhibió a *F. oxysporum* y *R. solani* en 25 y 34.4 %, respectivamente (Cuadro 4). El efecto inhibitorio de los aceites esenciales e hidrolatos es debido a los monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos fenólicos (Hu *et al.*, 2019; Hill, 2022). Los monoterpenos son pequeños y pasan entre las moléculas grasas que forman la membrana celular y afectan funciones dentro de la célula, mientras que los sesquiterpenos no son tan pequeños para pasar por la membrana celular, pero tienen formas únicas que les permiten adherirse a los espacios de estructuras proteínicas tridimensionales y afectan la actividad proteínica (Hill, 2022). Hu *et al.* (2019) mencionan que los compuestos fenólicos pueden interferir con las membranas, las paredes celulares y la acción de las enzimas. En el hidrolato de *T. parryi* se encontró una mayor diversidad de grupos de compuestos, entre estos se encontró el compuesto fenólico 1,3-Di-terc-butilbenceno (Cuadro 3). Al respecto, Zatlá *et al.* (2017) mencionan que los compuestos fenólicos de *Daucus carota* subsp. *sativus* tienen actividad antifúngica contra *B. cinerea*. Belabbés *et al.* (2017) atribuyen el efecto antifúngico contra *Penicillium expansum* a los

sesquiterpenos oxigenados encontrados en el hidrolato de *Calendula arvensis*. En *T. parryi*, *T. coronopifolia* y en *T. minuta* se encontró el sesquiterpeno 11-tetradecadianoato de metilo con una abundancia relativa entre 1.6 y 2.5 % (Cuadro 3) y el efecto inhibitorio de estos hidrolatos fue mayor (Cuadro 5) a lo observado con *T. terniflora*, que no contenía este compuesto. También, los aceites con abundancia de monoterpenos inhiben el crecimiento de hongos (Stević *et al.*, 2014), lo que permite resaltar que los hidrolatos de *Tagetes* analizados tienen abundantes monoterpenos (Cuadro 4). Aunque el efecto antifúngico se atribuye a los compuestos mayoritarios, es el efecto sinérgico de todos los compuestos los que causan los efectos antifúngicos y también algunos compuestos son más activos que otros (Dhifi *et al.*, 2016).

Cuadro 5. Porcentaje de inhibición *in vitro* de micelio de hongos después de la aplicación de hidrolatos de especies de *Tagetes*.

Tratamientos	Inhibición (%) del micelio de los hongos			
	<i>B. cinerea</i>	<i>P. capsici</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>
TO	0 ± 0 ^e	0 ± 0 ^f	0 ± 0 ^c	0 ± 0 ^c
FC	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a	100 ± 0 ^a
H100C	40 ± 28.8 _{bcde}	100 ± 0 ^a	25 ± 15.5 ^b	34.4 ± 22.2 ^b
H100M	35 ± 21.6 _{bcde}	54.3 ± 2.5 ^b	21 ± 4.5 ^{bc}	20 ± 11.7 ^{bc}
H100P	71.3 ± 9.7 ^{ab}	55.3 ± 3 ^b	23 ± 4 ^b	26.6 ± 6.8 ^{bc}
H100T	25.3 ± 15 ^{cde}	57 ± 13.1 ^b	16.6 ± 2 ^{bc}	20 ± 2.6 ^{bc}
H75C	22.6 ± 23.5 _{cde}	100 ± 0 ^a	16.6 ± 3.5 ^{bc}	32.6 ± 13.2 ^{bc}
H75M	34 ± 7.9 ^{bcde}	43.3 ± 9 ^{bc}	18.6 ± 7.6 ^{bc}	15.6 ± 6 ^{bc}
H75P	54.6 ± 18.9 _{bc}	38.3 ± 10.4 ^{bcd}	12.3 ± 7 ^{bc}	17 ± 13.5 ^{bc}
H75T	14 ± 17.8 ^{cde}	38.3 ± 3 ^{bcd}	11.3 ± 10.5 ^{bc}	20 ± 11.5 ^{bc}
H50C	22.6 ± 2.3 ^{cde}	61.6 ± 20.4 ^b	9.1 ± 9.4 ^{bc}	19.6 ± 10.4 ^{bc}
H50M	25 ± 4.5 ^{cde}	27 ± 3.6 ^{cde}	16 ± 7.9 ^{bc}	10.6 ± 8.8 ^{bc}
H50P	54 ± 10.5 ^{bcd}	28.3 ± 8.5 ^{cde}	10.6 ± 6.5 ^{bc}	14.3 ± 7.5 ^{bc}
H50T	10.3 ± 24.2 _{de}	17 ± 11.7 ^{def}	6.3 ± 7.57 ^{bc}	10 ± 12.6 ^{bc}
H25C	4.6 ± 5.6 ^e	10.3 ± 11.6 ^{ef}	1 ± 1 ^c	11.6 ± 18 ^{bc}
H25M	3.6 ± 6.3 ^e	16 ± 5 ^{def}	10.6 ± 7.5 ^{bc}	10 ± 10.7 ^{bc}
H25P	33.3 ± 7 ^{bcde}	13 ± 3 ^{ef}	9.3 ± 3 ^{bc}	13 ± 4.5 ^{bc}
H25T	0 ± 0 ^e	4.6 ± 8 ^{ef}	4 ± 4 ^{bc}	8.4 ± 0 ^{bc}

Valor p	0.0001	0.0001	0.0053	0.0001
CV	33	14	21	30
DMS	41	23	39	30

TO: Testigo, FC: Fungicida comercial, H: Hidrolato, 100, 75, 50 y 25: Concentración (%) de hidrolato usada, C: *T. coronopifolia*, M: *T. minuta*, P: *T. parryi*, T: *T. terniflora*, CV: Coeficiente de variación, DMS: Diferencia mínima significativa, Medias con letras diferentes entre las columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Los valores promedio $\pm$ desviación estándar.

Evaluación *in vivo*. Los tratamientos con hidrolatos al 100 % de las cuatro especies de *Tagetes* mostraron la mayor inhibición *in vitro* (Cuadro 5), por ello, se retomaron para su evaluación *in vivo*. Las plantas de fresa no mostraron efecto fitotóxico debido a la aplicación de los hidrolatos de *Tagetes*, lo cual da buena expectativa para futuras evaluaciones en otras especies vegetales. Las plantas testigo inoculadas con *B. cinerea* presentaron síntomas de la enfermedad, tanto en frutos como en flores. Por otro lado, las plantas inoculadas con *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* no mostraron síntomas de enfermedad en las flores, pero sí en el fruto perforado (Figura 6). Los frutos de fresa son muy perecederos, además, si el fruto presenta algún daño mecánico o lesión facilita la infección por patógenos (Ángel-García *et al.*, 2018); la falta de incidencia de la enfermedad en flores posiblemente esté relacionada con la ausencia de lesión y porque estos hongos afectan principalmente las raíces, la corona y frutos (Koike y Gordon, 2015; Awad, 2016; Barboza *et al.*, 2016).

El hidrolato de *T. parryi* fue efectivo como tratamiento preventivo contra *B. cinerea*, debido a que los frutos perforados (Figura 6A) y las flores (Figura 6B) no presentaron incidencia del hongo, por tal motivo, este hidrolato, representa un insumo alternativo a los fungicidas químicos que tienen efectos negativos en el ambiente y han inducido resistencia en este hongo (Leroux, 2004). Zatlá *et al.* (2017) evaluaron el efecto del hidrolato de *Daucus carota subsp. sativus* en frutos de fresa y este fue efectivo como tratamiento preventivo al inhibir totalmente a *B. cinerea* hasta el quinto día, estos autores atribuyen el efecto a la abundancia de compuestos fenólicos. Por ello, el efecto observado con el hidrolato de *T. parryi* también puede atribuirse al compuesto fenólico 1,3-Di-terc-butilbenceno en conjunto con los otros monoterpenos mayoritarios y sesquiterpenos

encontrados en el hidrolato (Cuadro 4). Por otra parte, con la aplicación del hidrolato de *T. terniflora* en los frutos (Figura 6A) no se observaron síntomas de la enfermedad, pero las flores sí se infectaron y con el hidrolato de *T. minuta* se observó un efecto contrario, las flores no se infectaron y los frutos sí fueron infectados por el hongo (Figura 6B); con este resultado se contempla que una aplicación conjunta de estos hidrolatos podría ser efectiva contra este hongo. El hidrolato de *T. coronopifolia* no funcionó como tratamiento preventivo.

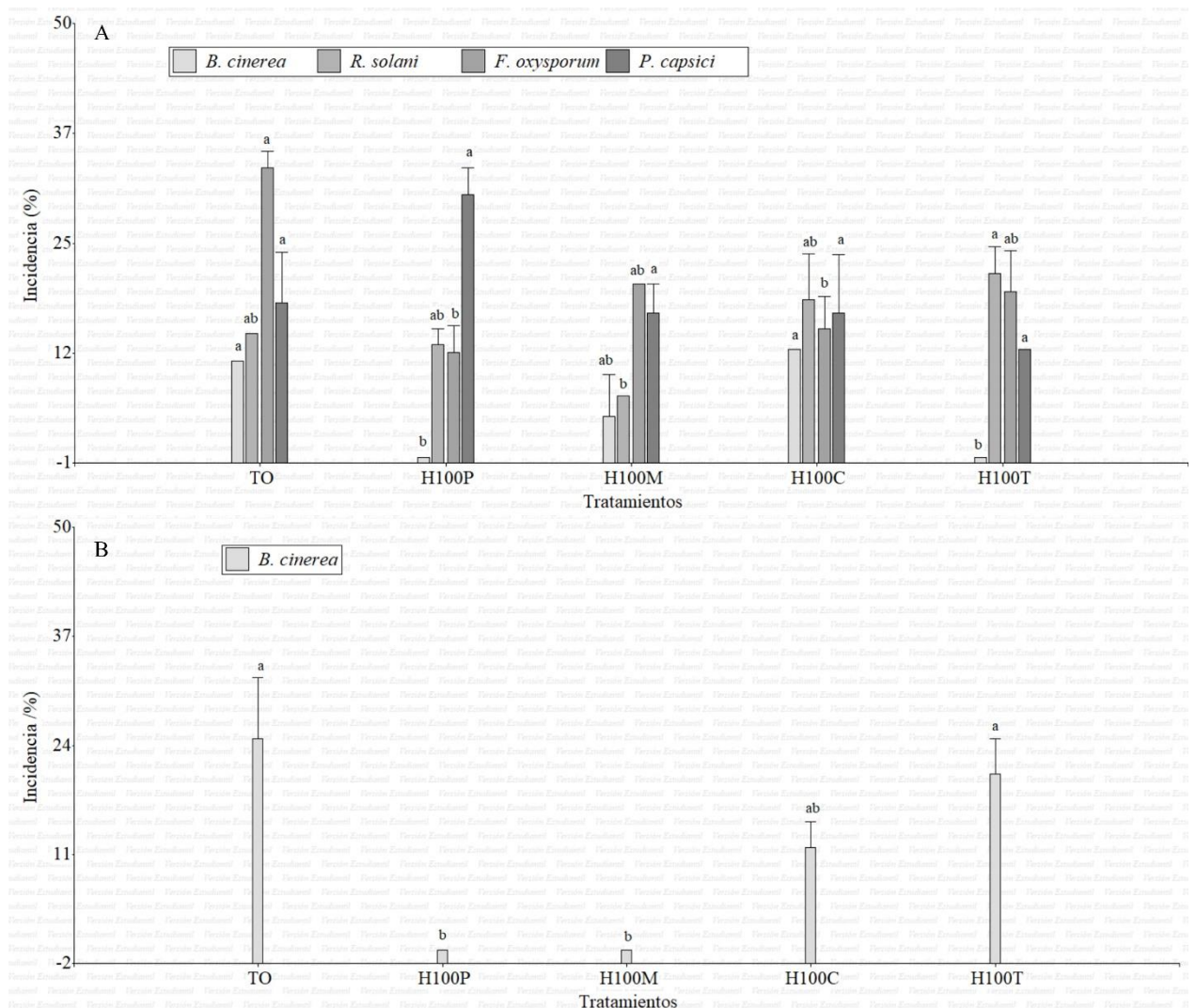


Figura 6. Incidencia de *B. cinerea*, *R. solani*, *F. oxysporum* y *P. capsici* en frutos (A) y flores (B) de fresa a los tres días posteriores a su inoculación en plantas testigo (TO) y sometidas a tratamientos con hidrolatos al 100 % de *Tagetes coronopifolia* (H100C), *T. minuta* (H100M), *T. parryi* (H100P) y *T. terniflora* (H100T).

4.5 CONCLUSIONES

Los hidrolatos de las especies de *Tagetes* ensayadas contienen entre 46 y 72 % de monoterpenos y en menor cantidad algunos alcoholes (0-33 %), sesquiterpenos (0-27 %) y compuestos fenólicos (0-8 %). Aunque en la evaluación *in vitro* se observó efecto fungistático con algunos hidrolatos, este efecto no se mantuvo en la aplicación *in vivo*, solo la aplicación del hidrolato de *T. parryi* es efectivo como tratamiento preventivo contra *B. cinerea* en plantas de fresa en floración y fructificación

4.6 LITERATURA CITADA

- Ángel-García C, Robledo-Buriticá J y Castaño-Zapata J. 2018. Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium solani* F. sp. *passiflorae* en plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis* F. *flavicarpa*). Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica 21(1):23-31. <https://doi.org/10.31910/rudca.v21.n1.2018.659>
- Awad HM. 2016. Integrated management of *Rhizoctonia* root rot disease infecting strawberry in Egypt. Egyptian Journal of Crop Protection 11(1):1-11. <https://doi.org/10.21608/ejcp.2016.229437>
- Barboza EA, Fonseca MEN, Boiteux LS and Reis A. 2016. First worldwide report of a strawberry fruit rot disease caused by *Phytophthora capsici* isolates. The American Phytopathological Society (APS) 101(1). <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0864-PDN>
- Bárcenas-Santana D, Guillén-Sánchez D, Yazmín-Basaldúa C, Ramos-García ML y Valle-La Paz M. 2019. Etiología de la secadera de la Fresa (*Fragaria* spp.) en Morelos, México. Revista Mexicana de Fitopatología 37(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1904-5>
- Barnett HL and Hunter BB. 1986. Taxonomy and Identification in Illustrated Genera of Imperfect Fungi (4th ed). American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 234 p.

- Belabbés R, Dib MEA, Djabou N, Ilias F, Tabti B, Costa J and Muselli A. 2017. Chemical variability, antioxidant and antifungal activities of essential oils and hydrosol extract of *Calendula arvensis* L. from Western Algeria. *Chemistry & Biodiversity* 14(5):e1600482. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600482>
- Bhat GA, Rasool S, Shakeel-u-Rehman, Ganaie, MI, Qazi PH and Shawl AS. 2016. Seasonal variation in chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of leaves of *Salvia officinalis* (Sage) from Kashmir, India. *Journal Of Essential Oil-Bearing Plants* 19(5):1129-1140. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2016.1211491>
- Boddy L. 2016. Pathogens of Autotrophs. Pp: 245-292. *The Fungi* (Third Edition). Academic press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382034-1.00008-6>
- Boyras N and Özcan MM. 2005. Antifungal effect of some spice hydrosols. *Fitoterapia* 76(7-8): 661-665. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.08.016>
- Boyras N and Özcan MM. 2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. *International Journal of Food Microbiology* 107(3):238-242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.002>
- D'Amato S, Serio A, López CC and Paparella A. 2018. Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control* 86:126-137. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.030>
- Deng S, Ma X, Chen Y, Feng H, Zhou D, Wang X, Zhang Y, Zhao M, Zhang J, Daly P and Wei L. 2022. LAMP Assay for Distinguishing *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* in Lotus (*Nelumbo nucifera*) Rhizomes. *Plant Disease* 106(1):231-246. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-21-1223-re>
- Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N and Mnif W. 2016. Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. *Medicines* 3(4):25. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>

- Díaz-Cedillo F y Serrato-Cruz MA. 2011. Composición del aceite esencial de *Tagetes parryi* A. Gray. Revista Fitotecnia Mexicana 34(2):145-148.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802011000200013&script=sci_abstract
- Díaz-Cedillo F, Serrato-Cruz MA, de la Cruz-Marcial J, Sánchez-Alonso MG y López-Morales V. 2013. Compuestos mayoritarios del aceite esencial en órganos de una población de *Tagetes coronopifolia* Willd. Revista Fitotecnia Mexicana 36(4):405-411.
https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000400006
- Espejo QF, Espinosa RR, Puente IM, Cupull SR and Rodríguez GM. 2010. Allelopathic effect of *Tagetes erecta* L. and *Terminalia catappa* L. on *Rhizoctonia solani* (Kühn). Centro Agrícola 37(2):89-92.
<https://biblat.unam.mx/hevila/Centroagricola/2010/vol37/no2/13.pdf>
- Golzar H, Phillips D and Mack S. 2007. Occurrence of strawberry root and crown rot in western Australia. Australasian Plant Disease Notes 2(1):145.
<https://doi.org/10.1071/dn07057>
- González-Velasco HE, Pérez-Gutiérrez MS, Alonso-Castro ÁJ, Zapata-Morales JR, Del Carmen Niño-Moreno P, Campos-Xolalpa N and González-Chávez MM. 2022. Anti-Inflammatory and antinociceptive activities of the essential oil of *Tagetes parryi* A. gray (Asteraceae) and Verbenone. Molecules 27(9):2612.
<https://doi.org/10.3390/molecules27092612>
- Gutiérrez B, González MS y Salih LA. 2006. Caracterización de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn que inducen pudriciones radicales en cultivares de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). Bioagro 18(1):063-072.
<https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2158715>
- Hill DCDK. 2022. Manual de química de aceites esenciales dōTERRA (2da edición). 82 p.
<https://media.doterra.com/us/es/brochures/essential-oil-chemistry-handbook.pdf>

- Hu W, Li C, Dai J, Cui H and Lin L. 2019. Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Industrial Crops and Products* 130:34-41. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.078>
- Inouye S, Takahashi M and Abe S. 2008. Inhibitory activity of hydrosols, herbal teas and related essential oils against filament formation and the growth of *Candida albicans*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 50(4):243-251. <https://doi.org/10.3314/jjmm.50.243>
- Kagezi G, Kucel P, Olal S, Pinard F, Seruyange J, Musoli P and Kangire A. 2015. *In vitro* inhibitory effect of selected fungicides on mycelial growth of ambrosia fungus associated with the black coffee twig borer, *Xylosandrus compactus* Eichhoff (Coleoptera: Curculionidae) in Uganda. *African Journal of Agricultural Research* 10(23):2322-2328. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.1705>
- Karimian P, Kavooosi G and Amirghofran Z. 2014. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. *Asian pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(3):219-227. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(14\)60235-5](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(14)60235-5)
- Koike ST and Gordon TR. 2015. Management of *Fusarium* wilt of strawberry. *Crop Protection* 73:67-72. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.003>
- Labadie C, Cerutti C, and Carlin F. 2016. Fate and control of pathogenic and spoilage micro-organisms in orange blossom (*Citrus aurantium*) and rose flower (*Rosa centifolia*) hydrosols. *Journal of Applied Microbiology* 121(6):1568-1579. <https://doi.org/10.1111/jam.13293>
- Larios-Palacios OE, López-Vázquez ÉY, Rodríguez AC, De Jesús Ruiz-Espinoza F, Solano-Vidal R y Serrato-Cruz MA. 2020. Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11(3):593-606. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.2077>
- Leroux P. 2007. Chemical Control of *Botrytis* and its Resistance to Chemical Fungicides. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N. (eds) *Botrytis: Biology,*

Pathology and Control. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_12

Leslie JF and Summerell BA. 2006. A Brief History of Fusarium Taxonomy: The Fusarium laboratory manual. Pp:79-86. Wiley Online Library <https://doi.org/10.1002/9780470278376.ch8>

Lima B, Agüero MB, Zygadlo JA, Tapia A, Solis CM, De Arias AR, Yaluff G, Zacchino S, Feresín GE and Schmeda-Hirschmann G. 2009. Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. Journal of the Chilean Chemical Society 54(1). <https://doi.org/10.4067/s0717-97072009000100016>

Lizarraga E, Mercado MI, Galvez C, Ruiz AI, Ponessa GI and Catalan CAN. 2017. Morpho anatomical characterization and essential oils of *Tagetes terniflora* and *Tagetes minuta* (Asteraceae) growing in Tucumán (Argentina). Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica 52(1):55-68. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722017000100006

Macías DR, Grijalva CRL, Núñez RF, Robles CF y López CA. 2016. Eficiencia de diferentes fungicidas en el control de la pudrición rosada en cebolla. Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas 7(8):1933-1943. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000801933

Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University. 193 p. https://books.google.com.mx/books/about/Fusarium_Species.html?id=qJIMAQAAMAAJ&redir_esc=y

Odak I., Lukic T and Talić S. 2018. Impact of storage conditions on alteration of juniper and immortelle essential oils. Journal of Essential Oil Bearing Plants 21(3):614-622. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2018.1489309>

- Plancarte AS, Alvarado GR, Pavía YLF, Pedraza-Santos ME, Pérez LL, Celaya MD y Pavía SPF. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp.: enfoque aplicado a la investigación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(8):1867-1880. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i8.708>
- Pons-Hernández JL, Guerrero-Aguilar BZ, González-Chavira MM, González-Pérez E, Villalobos-Reyes S y Muñoz-Sánchez CI. 2020. Variabilidad fenotípica de aislados de *Phytophthora capsici* en Guanajuato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11(8):1891-1901. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i8.2618>
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ and Oberlies NH. 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal Of Natural Products* 80(3):756-770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rajeswara RBR, Kaul PN, Bhattacharya AK, Rajput DK, Syamasundar KV and Ramesh S. 2006. Comparative chemical composition of steam-distilled and water-soluble essential oils of South American marigold (*Tagetes minuta* L.). *Journal of Essential Oil Research* 18(6):622-626. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699184>
- Rajeswara RBR. 2013. Hydrosols and water-soluble essential oils: their medicinal and biological properties. In: *Recent progress in medicinal plants: Essential oils I*. Studium Press LLC, Houston, USA. 25 p. https://www.researchgate.net/publication/270281550_Hydrosols_and_Water-Soluble_Essential_Oils_Their_Medicinal_and_Biological_Properties
- Salehi B, Valussi M, Morais-Bragam MFB, Carneiro JNP, Leal ALAB, Coutinho HDM, Vitalini S, Kręgiel D, Antolak H, Sharifi-Rad M, Silva NCC, Yousaf Z, Martorell M, Iriti M, Carradori S and Sharifi-Rad J. 2018. *Tagetes* spp. essential oils and other extracts: chemical characterization and biological activity. *Molecules* 23(11):2847. doi: 10.3390/molecules23112847
- Santos-Gomes PC and Fernandes-Ferreira M. 2001. Organ- and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two

- different sites. Journal of Agricultural and Food Chemistry 49(6):2908-2916. doi:10.1021/jf001102b
- Serrato CMA. 2014. El Recurso genético cempoalxóchitl (*Tagetes* spp.) de México (Diagnóstico). Universidad Autónoma Chapingo SAGARPA-SNICS-SINAREFI. Chapingo, Estado de México. 183p. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225091/El_recurso_gen_tico_d_el_cempoalxochitl_tagetes_spp_de_mexico_diagnostico_.pdf
- Serret-López M, Espinosa-Victoria D, Gómez-Rodríguez O y Delgadillo-Martínez J. 2016. Tolerancia de plantas de fresa (*Fragaria* × *ananassa* Duch.) premicorrizadas con *Rhizophagus intraradices* e inoculadas con PGPR's a *Phytophthora capsici*. Agrociencia 50(8):1107-1121. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952016000801107&script=sci_abstract
- Shuping DSS and Eloff JN. 2017. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: a review. African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines 14(4):120-127. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i4.14>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2022. Avance de siembras y cosechas. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119> (consulta, septiembre 2023).
- Stević T, Berić T, Šavikin K, Soković M, Godevac D, Dimkić I and Stanković S. 2014. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. Industrial Crops And Products 55:116-122. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.011>
- Taglienti A, Donati L, Ferretti L, Tomassoli L, Sapienza F, Sabatino M, Di Massimo G, Fiorentino S, Vecchiarelli V, Nota P and Ragno R. 2022. *In vivo* antiphytoviral activity of essential oils and hydrosols from *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, and *Rosmarinus officinalis* to control zucchini yellow mosaic virus and tomato leaf curl New Delhi virus in *Cucurbita pepo* L. Frontiers in Microbiology 13:840893. doi: 10.3389/fmicb.2022.840893

- Terrones-Salgado J, Nieto-Ángel D, Nava-Díaz C, Téliz-Ortíz D, García-Velasco R, Vallejo-Pérez MR y Sánchez-García P. 2019. *Botrytis cinerea* causante del moho gris en frutos de zarzamora en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(3):365-382. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-1>
- Tisserand R and Young R. 2014. Essential Oil Safety. Pp: 5-22. In: Essential oil composition. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-06241-4.00002-3>
- Uddin J, Humam A, Yahya IA, Ghulam MK and Syed GM. 2023. Ginger essential oil: Chemical composition, extraction, characterization, pharmacological activities, and applications. *Essential Oils, Extraction, Characterization and Applications* 345-376. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91740-7.00014-1>
- Vega-López M y Granados-Montero M. 2023. Eficacia de benomil y folpet sobre *Fusarium oxysporum* patógeno de la fresa. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 14(3):485-490. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i3.3253>
- Vuko E, Dunkić V, Rušćić M, Nazlić M, Mandić N, Soldo B, Šprung M and Fredotović Ž. 2021. Chemical composition and new biological activities of essential oil and hydrosol of *Hypericum perforatum* L. ssp. *veronense* (Schrank) H. Lindb. *Plants (Basel)* 10(5):1014. doi: 10.3390/plants10051014
- Wang X, Li K, Xu S, Duan Y, Wang H, Yin C, Chen X, Mao Z and Kong X. 2022. Effects of different forms of *Tagetes erecta* biofumigation on the growth of apple seedlings and replanted soil microbial environment. *Horticulturae* 8(7):633. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070633>
- Weising K, Nybom H, Wolff K and Kahl. 2005. DNA Fingerprinting In Plants: Principles, Methods And Applications (2nd edn). Boca Raton: CRC Press. doi: 10.1093/aob/mcj057
- Yann-Olivier H, Abril-Sierra MA, Sequeda-Castañeda LG, Bonnaïfous C and Raynaud C. 2018. Evaluation of combinations of essential oils and essential oils with hydrosols on antimicrobial and antioxidant activities. *Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research* 6(3):216-230. <https://jppres.com/jppres/>

- Zatla AT, Dib MEA, Djabou N, Ilias F, Costa J and Muselli A. 2017. Antifungal activities of essential oils and hydrosol extracts of *Daucus carota* subsp. *Sativus* for the control of fungal pathogens, in particular gray rot of strawberry during storage. *Journal of Essential Oil Research* 29(5):391-399. <https://doi.org/10.1080/10412905.2017.1322008>
- Zubrod JP, Bundschuh M, Arts G, Brühl CA, Imfeld G, Knäbel A, Payraudeau S, Rasmussen JJ, Rohr JR, Scharmüller A, Smalling KL, Stehle S, Schulz R and Schäfer RB. 2019. Fungicides: an overlooked pesticide class? *Environmental Science & Technology* 53(7):3347-3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>

Artículo enviado a la Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas

**CAPÍTULO V: Compuestos químicos y actividad antifúngica de aceite
esencial de *Tagetes lucida* contra *Botrytis cinerea***

**Chemical compounds of *Tagetes lucida* essential oil and effect against
*Botrytis cinerea***

Miguel Ángel Ruíz-González¹

Roney Solano-Vidal¹

Ernestina Valadez-Moctezuma

Miguel Ángel Serrato-Cruz^{1*}

¹Universidad Autónoma Chapingo. Km 38.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Chapingo, Estado de México. (miguelruiz93@live.com.mx, roneysv@hotmail.com, nestty56@yahoo.com.mx y serratocruz@gmail.com)

*Autor de correspondencia: serratocruz@gmail.com

5.1 Resumen

El ambiente influye en la composición química del aceite esencial de las plantas y también con su efecto biológico. El propósito del estudio fue: describir el perfil químico del aceite esencial de *Tagetes lucida* y evaluar el efecto biológico *in vitro* contra *B. cinerea*. El estudio se realizó en Texcoco, México durante octubre de 2021. Por hidrodestilación se obtuvo aceite esencial de plantas en floración; la identificación de compuestos químicos se realizó mediante la técnica GC-MS. Para el bioensayo *in vitro* se empleó el método de agar envenenado y micelio de *B. cinerea* de tres días de crecimiento. Se evaluaron doce tratamientos: aceite esencial 0.1, 0.5, 1 y 2 %, Tween 20 al 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1 y 2 %, fungicida comercial y testigo absoluto (solo con agua bidestilada estéril). Cada 24 h se midió crecimiento radial del hongo con un vernier digital y se estimó la velocidad de crecimiento y la inhibición del crecimiento micelial. Se identificaron treinta y un compuestos químicos, (1S)-(-)- β -Pino (36.4 %), 1, 3, 5, 7-Ciclooctatetraeno (12.7 %), Eucaliptol (10.6 %) y o-Cimeno (6.1 %). Con las concentraciones de 0.1, 0.5, 1 y 2 % se inhibió el crecimiento micelial y la esporulación de *B. cinerea*. El fungicida comercial y la concentración del 2 % inhibieron totalmente el crecimiento del hongo. Tween 20 también inhibió el crecimiento micelial. La CL₅₀ fue de 0.06 % y la CL₉₅ fue de 1.69 %. La abundancia de terpenos en el aceite esencial de *T. lucida* mostró efecto fungicida contra *B. cinerea*. El surfactante tuvo efectos menores.

Palabras clave: *Tagetes lucida*, *B. cinerea*, aceite esencial.

Abstract

The environment influences the chemical composition of plant essential oil and also its biological effect. The purpose of the study was: to describe the chemical profile of the essential oil of *Tagetes lucida* and to evaluate the *in vitro* biological effect against *B. cinerea*. The study was conducted in Texcoco, Mexico during October 2021. Essential oil was obtained by hydrodistillation from flowering plants; the identification of chemical compounds was performed by GC-MS technique. For the *in vitro* bioassay, the method of poisoned agar and mycelium of *B. cinerea* of three days of growth was used. Twelve treatments were evaluated: essential oil 0.1, 0.5, 1 and 2 %, Tween 20 at 0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1 and 2 %, commercial fungicide and absolute control (only with sterile distilled water). Every 24 h, radial growth of the fungus was measured with a digital vernier and growth rate and mycelial growth inhibition were estimated. Thirty-one chemical compounds were identified, (1S)-(-)- β -Pinene (36.4 %), 1, 3, 5, 7-Cyclooctatetraene (12.7 %), Eucalyptol (10.6 %) and o-Cymene (6.1 %). At the concentrations of 0.1, 0.5, 1 and 2 %, mycelial growth and sporulation of *B. cinerea* were inhibited. The commercial fungicide and the 2 % concentration totally inhibited fungal growth. Tween 20 also inhibited mycelial growth. The LC₅₀ was 0.06 % and the LC₉₅ was 1.69 %. The abundance of terpenes in the essential oil of *T. lucida* showed fungicidal effect against *B. cinerea*. The surfactant had minor effects.

Key words: *Tagetes lucida*, *B. cinerea*, essential oil.

5.2 Introducción

Yiahutli, pericón o hierba de Santa María (*Tagetes lucida* Cav.) es una planta con distribución en zonas templadas y transicionales, en altitudes de 1,400 a 2,800 m s. n. m. (Serrato, 2014), crece en vegetación de pino, encino, pino-encino y bosque latifoliado (Turner, 1996). Su altura es de 40 cm hasta 1.8 m, su floración inicia a mediados de agosto hasta octubre (Serrato, 2014).

El actual conocimiento tradicional sobre *T. lucida* revela diversos usos: como relajante en situaciones de cáncer, limpieza de heridas por cesárea, remedio contra picadura de alacrán y de serpiente, para disminuir dolor reumático, controlar garrapatas en aves, suavizar el efecto de la resaca, aromatizar ropa lavada, eliminar huevos de piojos y de pulgas, elaborar alcohol de caña con sabor de anís y saborizante de varios alimentos (Serrato, 2014). Tiene efecto biocida contra patógenos que afectan a humanos (Céspedes *et al.*, 2006; Torres-Martínez *et al.*, 2022) y otros efectos biológicos contra nematodos (Omer *et al.*, 2015) y algunos hongos fitopatógenos (López *et al.*, 2018).

Todos estos efectos se atribuyen a los compuestos químicos que contiene *T. lucida* tales como: terpenoides, cumarinas y flavonoides (Gutiérrez *et al.*, 2018). En el aceite esencial se han detectado alrededor de 40 a 44 metabolitos secundarios, de la clase de monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanoides (Regalado *et al.*, 2011; Zarate-Escobedo *et al.*, 2018), lo que significa una amplia variabilidad en tipos y cantidad de moléculas. En el aceite esencial de *T. lucida* la abundancia de monoterpenos y fenilpropanoides se relaciona con la variabilidad climática y del suelo (Zárate-Escobedo *et al.*, 2018).

En los estudios realizados con aceite esencial de *T. lucida* contra hongos se usaron poblaciones vegetales de climas templado frío y semifrío (Céspedes *et al.*, 2006; Barajas *et al.*, 2011; López *et al.*, 2018) en las que los fenilpropanoides

(anetol y estragol) son componentes mayoritarios y los responsables de efectos biológicos contra hongos.

El aceite de *T. lucida* que tiene esa procedencia inhibe el crecimiento micelial, la esporulación y formación de esclerocios en *Sclerotium rolfsii* y *Monilinia fructicola* (Barajas *et al.*, 2011). También, inhibe el crecimiento micelial de *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* y *Rhizoctonia solani* (López *et al.*, 2018). En el clima cálido los metabolitos secundarios en el aceite esencial corresponden mayoritariamente a terpenos (Zárate-Escobedo *et al.*, 2018). Por ello, la evaluación del efecto biológico del aceite esencial de esta especie crecida en clima templado cálido es importante.

La variación en la composición química de aceites esenciales depende de diversos factores, entre ellos, genéticos, así como ambientales (Acero-Godoy *et al.*, 2019). Por lo tanto, los estudios toxicológicos con el aceite de *T. lucida* deben considerar las características del hábitat en el que se desarrollan las poblaciones de esta especie en forma natural.

La evaluación de terpenos de *T. lucida* en el crecimiento fúngico complementará la información disponible sobre los efectos fúngicos de los fenilpropanoides que contiene la misma especie crecida en ambientes templados de subtipos fríos. La distribución de las poblaciones naturales de *T. lucida* en pisos altitudinales (Serrato, 2014), asociados con temperaturas que son contrastantes, representa una rica diversidad ambiental para *T. lucida* y también de biomoléculas.

Aunque varios aceites esenciales se han evaluado contra *B. cinerea* (Tančinová *et al.*, 2022), el aceite esencial de *T. lucida* aún no se ha evaluado contra este hongo. El propósito de este trabajo fue describir el perfil químico del aceite esencial de *T. lucida* y evaluar el efecto biológico *in vitro* contra *B. cinerea*. Se espera que la composición del aceite esencial sea específica y que este aceite tenga efecto biológico contra el hongo fitopatógeno referido.

5.3 Materiales y métodos

5.3.1 Material biológico

En octubre de 2021 se recolectaron muestras de *Tagetes lucida* Cav. en etapa de floración (tallos, flores y hojas) en el municipio de Pilcaya, Cacahuamilpa, Guerrero (18°40'42.6"N 99°32'31.3"W), a 1,479 m de altitud y en clima templado con lluvias en verano (Cw₁) (Köppen, 1948). El corte de tallos florales se hizo a 10 cm encima del suelo para evitar la pérdida de plantas en su hábitat, esta planta es perenne y vuelve a retoñar. Especímenes de estas muestras se depositaron en el Herbario-Hortorio-JES "Jorge Espinosa Salas" del Departamento de Preparatoria Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, Estado de México (registro 35872).

5.3.2 Extracción de aceite esencial

En un destilador de cristal tipo italiano, con capacidad de 6 kg, se agregaron 2 L de agua potable, después, 2 kg de plantas frescas se metieron al matraz de balón previamente trituradas con tijera de poda; por un periodo de 45 min se hizo extracción de aceite esencial por hidrodestilación (Rodríguez *et al.*, 2012). El aceite esencial se conservó en frascos de vidrio ámbar en refrigeración hasta su uso; se obtuvo 1.6 mL de aceite esencial por kilogramo de peso seco de tejido vegetal.

5.3.3 Identificación de compuestos químicos

Con la técnica de microextracción en fase sólida (Zhao *et al.*, 2022) se analizaron las muestras de aceite esencial; para ello, en un frasco ámbar se agregaron 5 µL de aceite esencial y se colocó una fibra de microextracción (PALsystem

Ingenious Simple Handling) de fase sólida durante 1 min; después, la muestra fue inyectada en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas (GC-MS Agilent Technologies 7890 A GC System); se realizaron dos repeticiones y se utilizó una columna capilar GC column VF-5ms, de 30 × 0.25 (0.25).

La temperatura del horno de la columna se inició en 60 °C; posteriormente, a 120 °C durante 15 min y temperatura final de 230 °C. El incremento de la temperatura fue de 15 °C min⁻¹, se usó helio como gas acarreador a un flujo constante de 0.5 mL min⁻¹. La identificación de los compuestos se hizo al comparar el tiempo de retención y el espectro de masas con la biblioteca espectral NIST y corroborado con índices de Kovats y R match mayor a 800. Como referencias en el cálculo de los índices de Kovats se usaron *n*-alcanos.

5.3.4 Bioensayo *in vitro*

La evaluación se hizo en medio de cultivo Agar Dextrosa y Papa (PDA 39 g L⁻¹) con el método de agar envenenado (Dikshit y Husain, 1984); se preparó una emulsión con 100 mL de agua bidestilada, 100 µL de Tween 20 y aceite esencial de *T. lucida* para obtener cuatro concentraciones (0.1, 0.5, 1 y 2 % v/v). Por separado se prepararon seis concentraciones con Tween 20 (0.1, 0.3, 0.5, 0.8, 1 y 2 % v/v) y se usó un fungicida comercial (1 g L⁻¹): Cabrio C (Boscalid 25.2 % + Pyraclostrobin 12.8 %).

La esterilizaron fue durante 20 min en autoclave a 120 °C. Después, el medio PDA se vertió en cajas Petri de vidrio estériles de 90 mm. Transcurridas 24 h, se inoculó *B. cinerea* obtenido del Laboratorio de Resistencia Genética de la Universidad Autónoma Chapingo (UACH). La cepa de *B. cinerea* utilizada cuenta con identificación molecular con indicadores NL4 e ITS5HP (Toju *et al*, 2012) y registro GenBank PP401673.1.

5.3.5 Diseño experimental y análisis de datos

El experimento se estableció con un diseño completamente al azar (DCA) con 12 tratamientos: cuatro concentraciones de aceite esencial, seis concentraciones de Tween 20, 1 g L⁻¹ de fungicida Cabrio C (Boscalid 25.2 % + Pyraclostrobin 12.8 %) y un testigo; cada tratamiento con cinco repeticiones. Con un vernier digital se midió el crecimiento radial del hongo cada 24 h durante cinco días. Se evaluaron velocidad de crecimiento (VC) (Sinclair y Cantero, 1989) y la inhibición del crecimiento micelial (%I) (Kagezi *et al.*, 2015).

En un microscopio estereoscópico se observó si se presentaba esporulación desde el quinto hasta el octavo día después de la siembra del hongo. Se utilizó una escala de medición nominal. Los datos se analizaron con pruebas de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) mediante el software académico SAS (SAS Institute Inc, 2023). Con los resultados de las concentraciones de aceite esencial evaluada *in vitro* se determinaron las concentraciones Probit (CL₅₀ y CL₉₅) en software académico SAS (Finney, 1971; Castillo, 2007; SAS Institute Inc, 2023).

5.4 Resultados y discusión

5.4.1 Compuestos químicos

En el aceite esencial se identificaron treinta y un compuestos, cuatro de ellos mayoritarios: (1S)-(-)- β -Pineno (36.4 %), 1, 3, 5, 7-Ciclooctatetraeno (12.7 %), Eucaliptol (10.6 %) y o-Cimeno (6.1 %) (Cuadro 6); de todos los compuestos, los sesquiterpenos representaron el 40 %, monoterpenos 30 %, otros terpenos 3 % y el resto correspondieron a alcoholes menos abundantes. Compuestos como

estragol, anetol, metil eugenol (Bicchi *et al.*, 1997), β -ocimeno, β -cubebeno, β -mirceno, germacreno, cariofileno, nerolidol (Regalado *et al.*, 2011) y acetato de geranilo (Zarate-Escobedo *et al.*, 2018) se han reportado como compuestos mayoritarios en *T. lucida*, lo cual significa que los metabolitos secundarios que resultaron mayoritarios en la población Pilcaya (Cuadro 6), distintos de los reportados previamente en otros estudios (Cuadro 7), amplían el conocimiento de la fitoquímica de esta especie.

Cuadro 6. Abundancia relativa (%) de compuestos químicos en aceite esencial de *Tagetes lucida*, mediante Cromatografía de Gases/Espectrometría de Masas (GC/MS) e índice de Kovats (IK).

Compuesto	%	IK	Compuesto	%	IK
(1S)-(-)- β -Pineno	36.4	961	2-Furanmetanol, 5-eteniltetrahydro- $\alpha,\alpha,5$ -trimetil-, cis-	0.4	1070
1,3,5,7-ciclooctatetraeno	12.7	880	5-Hepten-2-one, 6-metil-	0.4	958
Eucaliptol	10.6	1032	Ácido acético, éster hexílico	0.4	1010
o-Cimeno	6.1	1024	δ -Elemeno	0.4	1361

(-)- β -Bourboneno	2.4	139 0	Ciclosativo	0.4	137 9
Cubenol	2.1	165 1	Ciclotrisiloxano, hexametil-	0.4	825
Ciclohexeno, 1-metil-4-(1- metiletenil)-, (S)-	1.7	102 9	2- furancarboxaldehí do, 5-metil-	0.2	913
4-Hexen-1-ol, (4E)-, acetato	1.6	100 3	α -Amorfeno	0.1	145 3
trans- β -Ocimeno	1.5	104 4	α -Muuroleno	0.1	150 4
α -acorenol	1.3	159 8	1,3,5- cicloheptatrieno	0.1	771
(1S)-2,6,6-Trimetilbiciclo [3.1.1]hept- 2-eno	1.2	931	3-Penten-2-ona, 4-metil-	0.1	778
Dihydroedulan II (cis)	1.1	119 3	Trans- calameneno	0.1	153 7
Isovalerato de n-amilo	0.8	110 3	Gleenol	0.1	163 0

Óxido de cariofileno	0.7	159 8	γ-Muuroleno	0.0	152 9 2
Ciclotetrasiloxano, octametil-	0.7	100 4	Aromandendreno	0.0	143 5 9
2-Butenal, 3-metil-	0.5	748			

Cuadro 7. Compuestos químicos mayoritarios encontrados en el aceite esencial de *T. lucida* evaluada por Zarate-Escobedo *et al.* (2018)

Compuesto	Abundancia relativa (%)
β-Ocimeno	24.0
Acetato de geraniol	19.2
Nerolidol	12.5
β-Cubebeno	7.3
Cariofileno	6.7
1,3,6,10-Dodecatetraeno,3,7,11-trimetil-, (E,E)-	4.3
Verbenona, (L)-	3.5

Óxido de cariofileno	2.6
β -pineno-(1S)-(-)	1.1

Al comparar los compuestos encontrados en la población de estudio (Cuadro 6), denominada Pilcaya (1,479 m s. n. m.), con los encontrados por Zarate-Escobedo *et al.* (2018) en la localidad denominada El Mogote-Pilcaya (1,493 m s. n. m.), ambos puntos cercanos, los compuestos mayoritarios en el aceite esencial de ambas poblaciones no coinciden (Cuadro 7). El compuesto (-)- β -pineno que, en Pilcaya presentó 36.4 % de abundancia (Cuadro 6) en el Mogote-Pilcaya la abundancia fue 1.1 % (Cuadro 7) (Zarate-Escobedo *et al.*, 2018).

El sitio Pilcaya es más cálido, posiblemente en 2 °C y de menor altitud (1,479 m s. n. m.), respecto del sitio El Mogote-Pilcaya. En otras especies se ha registrado que la temperatura, régimen hídrico y otros factores influyen la síntesis de metabolitos secundarios (Karalija *et al.*, 2022; Valkovszki *et al.*, 2023). El resultado es valioso para seleccionar áreas de recolección y de posible cultivo, debido a la importancia que pueden tener los cambios en la temperatura y altitud en el tipo y cantidad de compuestos químicos.

5.4.2 Bioensayo *in vitro*

En cuanto al efecto biocida del aceite esencial, se encontró que, con 1 y 2 % se inhibió el crecimiento micelial de *B. cinerea* con diferencias estadísticas con respecto a la concentración de 0.1 % (Cuadro 8) y no hubo esporulación del hongo. Por ello, la concentración de 1 % es adecuada para verificar si el efecto observado a nivel *in vitro* también se podría reproducir a nivel *in vivo* con el debido cuidado de no conllevar efectos de fitotoxicidad.

Cuadro 8. Valores de medias de las variables porcentaje de inhibición y velocidad de crecimiento.

Tratamientos	Inhibición (%)	Velocidad de crecimiento (mm)
Testigo absoluto	0.00 e	10.54 a
FC	100.00 a	0.00 e
TL2	100.00 a	0.00 e
TL1	94.00 ab	2.83 d
TL0.5	72.46 bc	4.90 cd
TL0.1	66.15 c	6.33 bc
Tween 20 (2 %)	24.02 d	6.51 bc
Tween 20 (1 %)	21.65 de	6.58 bc
Tween 20 (0.8 %)	15.14 de	6.76 bc
Tween 20 (0.5 %)	14.74 de	6.86 bc
Tween 20 (0.3 %)	12.68 de	7.20 bc
Tween 20 (0.1 %)	5.15 de	8.03 ab

CV	18.28	20.40
DMS	23.72	2.69

Medias con letras iguales no son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05), CV: Coeficiente de variación, DMS: Diferencia mínima significativa, *: nivel de significancia ($p \leq 0.05$), TL2: Aceite esencial 2 %, TL 1: Aceite esencial 1 %, TL 0.5: Aceite esencial 0.5 %, TL 0.1: Aceite esencial 0.1 %, FC: Fungicida comercial Cabrio C.

El aceite esencial de *T. lucida* también inhibe a *Penicillium notatum*, *Fusarium moniliforme*, *Fusarium sporotrichum*, *Trichophyton mentagrophytes* (Céspedes et al., 2006), *Sclerotium rolfii* y *Monilinia fructicola* (Barajas et al., 2011), *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* y *Rhizoctonia solani* (López et al., 2018). En el presente trabajo por primera vez se presentan resultados contra *B. cinerea* (Cuadro 8). Se destaca el efecto biológico del aceite de *T. lucida* al 1 %, estadísticamente iguala al fungicida comercial y con ello, se abren posibilidades técnico-económicas para analizar un posible aprovechamiento del mencionado recurso natural.

El efecto inhibitorio ocasionado por el aceite esencial contra hongos se debe a que causan daños en la membrana citoplasmática, interrumpen varias capas de polisacáridos, ácidos grasos y fosfolípidos (Helal et al., 2006; Rammanee y Hongpattarakere, 2011). También, dañan las hifas, vacuolaciones, fuga de protoplastos o destrucción mitocondrial (Rasooli et al., 2006). Soyly et al. (2010) revelan alteraciones morfológicas en las hifas de *B. cinerea* causadas por la aplicación de aceites esenciales de *Origanum syriacum*, *Lavandula stoechas* y *Rosmarinus officinalis*.

El tratamiento con Tween 20 (2 %) mostró inhibición de 24.02 % (Figura 7) con una velocidad de crecimiento del micelio de 6.51 mm d⁻¹, mientras que con la menor concentración (0.1 %) la inhibición fue de 5.15 % y la velocidad de crecimiento se incrementó a 8.03 mm d⁻¹ (Cuadro 8); las concentraciones 0.1, 0.5, 0.8 y 1 % que se probaron del surfactante, no fueron estadísticamente diferentes al testigo.

Aparentemente, el efecto de Tween es antifúngico dependiente y podría estar relacionado con la solubilidad del antifúngico en el medio utilizado, por ello, es importante estandarizar la concentración de surfactante para su uso en la preparación del inóculo o al hacer la emulsión con la finalidad de asegurar resultados confiables (Gómez-López *et al.*, 2005), se ha observado que Tween 20 (0.1 %) inhibe la germinación de conidios de *Beauveria bassiana* en un 20 % (Mwamburi *et al.*, 2015). En el presente experimento, el uso de Tween 20 al 0.1 % prácticamente no tuvo efecto inhibitorio. Sin embargo, las concentraciones mayores (>0.1 %) si inhibieron a *B. cinerea*.

En los tratamientos con aceite esencial y con fungicida comercial, no hubo esporulación de *B. cinerea* (Figura 7), mientras que, en el testigo y el tratamiento con Tween 20 hubo esporulación hasta el octavo día, lo que refuerza la actividad biológica que tiene el aceite de *T. lucida* que se evaluó.

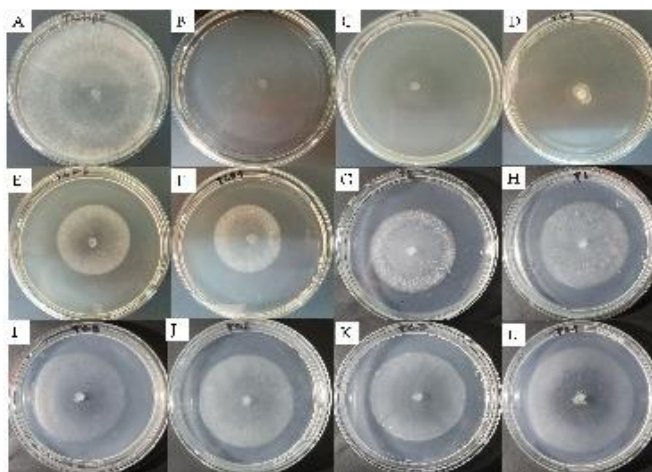


Figura 7. Crecimiento micelial de *B. cinerea* a los cinco días en cajas Petri con los tratamientos. A: Testigo, B: Fungicida comercial, C: Aceite esencial 2 %, D: Aceite esencial 1 %, E: Aceite esencial 0.5 %, F: Aceite esencial 0.1 %, G: Tween 20 2 %, H: Tween 20 1 %, I: Tween 20 0.8 %, J: Tween 20 0.5 %, K: Tween 20 0.3 %, L: Tween 20 0.1 %.

Con la aplicación *in vitro* de aceites esenciales de *Thymus vulgaris*, *Origanum vulgare*, *Origanum dictamnus* y *Origanum majorana* también se disminuyó la producción y germinación de conidios en *Penicillium digitatum* (Daferera *et al.*, 2000). El efecto antiesporulante en *Aspergillus fumigatus* se relacionó con la actividad inhibidora de la respiración debido al efecto de los aceites esenciales (Inouye *et al.*, 1998)

Las concentraciones Probit del aceite esencial de *T. lucida* proveniente de Pilcaya, fueron de 0.06 % (v/v) para CL₅₀ y de 1.69 % (v/v) para CL₉₅ (Cuadro 9), referencias que permiten sugerir que el aceite de *T. lucida* es una sustancia vegetal candidata para el biocontrol de *B. cinerea*. En perspectiva se contempla la evaluación *in vivo* del mejor tratamiento considerando la referencia del análisis Probit, así como verificar el efecto biológico de cada compuesto mayoritario.

Cuadro 9. Concentraciones letales (CL) y límites de confiabilidad obtenidos con el aceite esencial de *T. lucida* evaluado en *B. cinerea*.

Aceite esencial (v/v)	Concentraciones letales		Límites de confiabilidad (95 %)
<i>T. lucida</i>	CL ₅₀	0.06	0.02704-0.09868
	CL ₉₅	1.69	1.07514-3.55460

Las poblaciones naturales de *T. lucida* en Pilcaya, Cacahuamilpa, Guerrero, son abundantes y constituyen un recurso natural promisorio para su aprovechamiento sustentable a nivel de las comunidades propietarias de esas tierras, sobre todo si la exploración sobre efectos biológicos se amplía a plagas insectiles, diversos hongos fitopatógenos, ácaros, bacterias y otros organismos de importancia en medicina humana y veterinaria, arrojará resultados favorables.

Desde luego, conviene evaluar la viabilidad financiera del proceso de destilación del aceite para tener un panorama real del potencial de aprovechamiento del recurso fitogenético en cuestión. Hay que considerar que el rendimiento de 1.6 mL se obtiene de 1 kg de tejido seco, entonces para lograr la obtención de 1 L de aceite se ocuparía 625 kg de tejido seco, lo que equivaldría aproximadamente a un volumen de 5 t de planta fresca, un escenario que orienta a reflexionar sobre posible manejo agroecológico de las poblaciones nativas o llevarlas a cultivo convencional.

5.5 Conclusiones

El aceite esencial de *T. lucida* contiene treinta y un compuestos químicos. Los compuestos mayoritarios son terpenos y su abundancia se asocia con el clima templado cálido de donde proviene el material vegetal. El aceite esencial evaluado tiene efecto fungicida *in vitro* contra *B. cinerea* y validado con la evaluación Probit. Tween 20 inhibe el crecimiento de forma parcial, entonces, la cantidad de surfactante para disolver el aceite debe ajustarse.

5.6 Bibliografía

- Acero-Godoy, J.; Guzmán-Hernández, T. y Muñoz-Ruíz, C. 2019. Revisión documental de uso de los aceites esenciales obtenidos de *Lippia alba* (Verbenaceae), como alternativa antibacteriana y antifúngica. *Tecnología en Marcha*. 32(1):3-11. <https://doi.org/10.8845/tm.v32.i1.4114>
- Barajas, P. J. S.; Montes-Belmont, R.; Castrejón, F. A.; Flores-Moctezuma, H. E. y Serrato, C. M. A. 2011. Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. *Revista Mexicana de Micología*. 34:83-88.
- Bicchi, C.; Fresia, M.; Rubiolo, P.; Monti, D.; Franz, C. and Goehler, I. 1997. Constituents of *Tagetes lucida* Cav. ssp. *lucida* essential oil. *Flavour and Fragrance Journal*. 12:47-52.
- Castillo, M. L. E. 2007. Introducción al SAS para Windows. Universidad Autónoma Chapingo. 3 edición. 295 p.
- Céspedes C. L.; Avila, J. G.; Martínez, A.; Serrato, B.; Calderón-Mugica, J. C. and Salgado-Garciglia, R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54:3521-3527. <https://doi.org/10.1021/jf053071w>
- Daferera, D. J.; Ziogas, B. N. and Polissiou, M. G. 2000. GC-MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 48:2576-2581. <https://doi.org/10.1021/jf990835x>
- Dikshit, A. and Husain, A. 1984. Antifungal action of some essential oils against animal pathogens. *Fitoterapia* LV. 171-176.

- Finney, D. J. 1971. Probit analysis. Third edition. Cambridge University Press. Cambridge. 333 p.
- Gómez-López, A.; Aberkane, A.; Petrikou, E.; Mellado, E.; Rodríguez-Tudela, J. L.; Cuenca-Estrella, M. 2005. Analysis of the influence of Tween concentration, inoculum size, assay medium, and reading time on susceptibility testing of *Aspergillus* spp. *Journal of Clinical Microbiology*. 43:1251-1255, <https://doi.org/10.1128/jcm.43.3.1251-1255.2005>
- Gutiérrez, G. Y.; Scull, L. R.; García, S. G. y Montes, A. A. 2018. Evaluación farmacognóstica, fitoquímica y biológica de un extracto hidroalcohólico de *Tagetes lucida* Cavanilles. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*. 23:2.
- Helal, G. A.; Sarhan, M. M.; Shahla, A. N. K. A. and El-Khair, E. K. A. 2006. Effects of *Cymbopogon citratus* L. essential oil on the growth, lipid content and morphogenesis of *Aspergillus niger* ML2-strain. *Journal Of Basic Microbiology*. 46:456-469. <https://doi.org/10.1002/jobm.200510106>
- Inouye, S.; Watanabe, M.; Nishiyama, Y.; Takeo, K.; Akao, M. and Yamaguchi, H. 1998. Antisporulating and respiration-inhibitory effects of essential oils on filamentous fungi. *Mycoses*. 41:403-10. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0507.1998.tb00361.x>
- Kagezi, G. H.; Kucel, P.; Olal, S.; Pinard, F.; Seruyange, J.; Musoli, P. and Kangire, A. 2015. In vitro inhibitory effect of selected fungicides on mycelial growth of ambrosia fungus associated with the black coffee twig borer, *Xylosandrus compactus* Eichhoff (Coleoptera: curculionidae) in Uganda. *African Journal of Agricultural Research*. 10:2322-2328. <https://doi.org/10.5897/ajar12.1705>
- Karalija, E.; Dahija, S.; Tarkowski, P. and Zeljković, Z. Ć. 2022. Influence of climate-related environmental stresses on economically important essential oils of mediterranean *Salvia* sp. *Frontiers in Plant Science*. 13:864807. <https://doi: 10.3389/fpls.2022.864807>

- Köppen, W. 1948. Climatología: Con un estudio de los climas de la tierra. Fondo de Cultura Económica: México, D. F. 479 p.
- López, L. E.; Peña M. G. O.; Colinas L. M. T.; Diaz, C. F. y Serrato, C. M. A. 2018. Fungistasis del aceite esencial extraído de una población de *Tagetes lucida* de Hidalgo, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 9:329-341. <https://doi.org/10.29312/remexca.v9i2.1075>
- Mwamburi, L. A.; Laing, M. D. and Miller, R. M. 2015. Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. *Brazilian Journal of Microbiology*. 46:67-74. <https://doi.org/10.1590/s1517-838246120131077>
- Omer, E. A.; Hendawy, S. F.; El-Deen, A. M. N.; Zaki, F. N.; Abd-Elgawad, M. M.; Kandeel, A. M. and Ismail, R.F. 2015. Some biological activities of *Tagetes lucida* plant cultivated in Egypt. *Advances in Environmental Biology*. 9:82-88.
- Rammanee, K. and Hongpattarakere, T. 2011. Effects of tropical citrus essential oils on growth, aflatoxin production, and ultrastructure alterations of *Aspergillus flavus* and *Aspergillus parasiticus*. *Food and Bioprocess Technology*. 4:1050-1059. <https://doi.org/10.1007/s11947-010-0507-1>
- Rasooli, I.; Rezaei, M. B. and Allameh, A. 2006. Growth inhibition and morphological alterations of *Aspergillus niger* by essential oils from *Thymus eriocalyx* and *Thymus x-porlock*. *Food Control*. 17:359-364. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2004.12.002>
- Regalado, E. L.; Fernández, M. D.; Pino, J. A.; Mendiola, J. and Echemendia, O. A. 2011. Chemical composition and biological properties of the leaf essential oil of *Tagetes lucida* Cav. from Cuba. *Journal of Essential Oil Research*. 23:63-67. <https://doi.org/10.1080/10412905.2011.9700485>

- Rodríguez, A. M.; Alcaraz, M. L. y Real, C. S. M. 2012. Procedimientos para la extracción de aceites esenciales en plantas aromáticas. SAGARPA-CONACYT. México, D. F. 47 p.
- SAS Institute Inc. 2023. SAS® OnDemand for Academics. https://www.sas.com/es_mx/software/on-demand-for-academics.html
- Serrato, C. M. A. 2014. El recurso genético cempoalxóchitl (*Tagetes* spp.) de México (Diagnóstico). Mexico. 185 p.
- Sinclair, C. G. and Cantero, D. 1989. Fermentation modelling. In: fermentation a practical approach. McNeil, B. L. and Harvey, M. (Eds.). IRL Press, New York. 65-112 pp.
- Soylu, E. M.; Kurt, Ş. and 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*. International Journal of Food Microbiology. 143:183-189. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015>
- Tančinová, D.; Mašková, Z.; Mendelová, A.; Foltinová, D.; Barboráková, Z. and Medo, J. 2022. Antifungal activities of essential oils in vapor phase against *Botrytis cinerea* and their potential to control postharvest strawberry gray mold. Foods. 11(19):2945. <https://doi.org/10.3390/foods11192945>
- Toju, H.; Tanabe, A. S.; Yamamoto, S. and Sato, H. 2012. High-Coverage ITS primers for the DNA-Based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples. Plos One. 7: e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- Torres-Martínez, R.; Moreno-León, A.; García-Rodríguez, Y. M.; Hernández-Delgado, T.; Delgado-Lamas, G. and Espinosa-García, F. J. 2022. *Tagetes lucida* Cav. essential oil and the mixture of its main compounds are antibacterial and modulate antibiotic resistance in multi-resistant

pathogenic bacteria. Letters in Applied Microbiology. 25:210-223.
<https://doi.org/10.1111/lam.13721>

Turner, B. L. 1996. The compositae of Mexico. A systematic account of the family Asteraceae. Vol. 6. Tageteae and Anthemideae. Phytologia Memoirs. Texensis Publishing. Gruver, Texas, USA. pp.1-93.

Valkovszki, N. J.; Szalóki, T.; Székely, Á.; Kun, Á.; Kolozsvári, I.; Zima, I. S.; Tavaszi-Sárosi, S. and Jancsó, M. (2023). Influence of soil types on the morphology, yield, and essential oil composition of common sage (*Salvia officinalis* L.). Horticulturae. 9:1037.
<https://doi.org/10.3390/horticulturae9091037>

Zarate-Escobedo, J.; Castañeda-González, E. L.; Cuevas-Sánchez, J. A.; Carrillo-Fonseca, C. L.; Ortiz-Torres, C.; Ibarra-Estrada, E. y Serrato-Cruz, M. A. 2018. Aceite esencial de algunas poblaciones de *Tagetes lucida* Cav. de las regiones norte y sur del Estado de México. Revista Fitotecnia Mexicana. 41:199-209. <https://doi.org/10.35196/rfm.2018.2.199-209>

Zhao, J.; Quinto, M.; Zakia, F. and Li, D. 2023. Microextraction of essential oils: a review. Journal of Chromatography A. 1708:464357.
<https://doi.org/10.1016/j.chroma.2023.464357>

Artículo enviado a la Revista Biociencias

**CAPÍTULO VI: Composición química del aceite esencial de *Tagetes linifolia*,
evaluación *in vitro* y en frutos de fresa contra *Botrytis cinerea***

**Chemical composition of *Tagetes linifolia* essential oil, evaluation *in vitro* and in
strawberry fruits against *Botrytis cinerea***

Inhibición de *Botrytis cinerea* Inhibition of *Botrytis cinerea*

Ruíz González, M. A.^{1*}(<https://orcid.org/0000-0002-1703-5651>), Serrato Cruz, M.
A.^{1*}(<https://orcid.org/0000-0002-0029-733X>), Valadez Moctezuma,
E.¹(<https://orcid.org/0000-0002-8765-6613>), Solano Vidal, R.³
(<https://orcid.org/0000-0003-4452-1425>), González Tepale, R. M.²
(<https://orcid.org/0000-0003-2022-0943>)

¹Dpto de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carr. Federal México-Texcoco, km 38.5. C.P. 56230, Texcoco, Estado de México.

²Laboratorio de naturales. Preparatoria agrícola Chapingo. Carr. Federal México-Texcoco, km 38.5. C.P. 56230, Texcoco, Estado de México.

³Parasitología agrícola. Universidad Autónoma Chapingo. Carr. Federal México-Texcoco, km 38.5. C.P. 56230, Texcoco, Estado de México.

***Corresponding Author:**

Miguel Angel Ruíz-González. Dpto. de Fitotecnia. Universidad Autónoma Chapingo. Carr. Federal México-Texcoco, 38.5. C.P. 56230 Texcoco, México. Teléfono (786) 129 4571. E-mail: miguelruiz93@live.com.mx

6.1 RESUMEN

Los aceites esenciales son eficaces para controlar patógenos, además, son reconocidos como seguros. El objetivo fue caracterizar los compuestos químicos en el aceite esencial de *T. linifolia* y evaluar su efecto *in vitro* y en postcosecha de frutos de fresa contra *B. cinerea*. El aceite esencial se analizó mediante cromatografía de gases-masas. Se evaluaron *in vitro* seis concentraciones de aceite (1, 0.5, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 %), un control y fungicida Cabrio C contra *B. cinerea*. Mediante análisis Probit se estimó la concentración letal CL90 y CL50. Posteriormente, CL90, CL50, Tween 80 al 0.01 % y un control se evaluaron en la germinación *in vitro* de conidios. CL90 y CL50 fueron retomados para su evaluación en frutos de fresa. En el aceite esencial se identificaron veinticinco compuestos químicos. Las concentraciones de 1 y 0.5 % inhibieron a *B. cinerea* sin diferencias estadísticas con respecto al fungicida comercial. Tween 80 promovió la germinación de conidios (89 %) y con la concentración letal CL90 (1.6 %) no hubo germinación. Los frutos tratados con CL90 mostraron menor incidencia y severidad. El aceite esencial tuvo efecto fungistático contra *B. cinerea* y efecto protector en los frutos de fresa.

PALABRAS CLAVE:

Tagetes linifolia, moho gris, incidencia, severidad.

ABSTRACT

Essential oils are effective in controlling pathogens and are recognized as safe. The objective was to characterize the chemical compounds in essential oil of *T. linifolia* and to evaluate their effect *in vitro* and in postharvest strawberry fruits against *B. cinerea*. The essential oil was analyzed by gas-mass chromatography. Six concentrations of oil (1, 0.5, 0.1, 0.1, 0.01, 0.001 and 0.0001 %), a control and Cabrio C fungicide were evaluated *in vitro* against *B. cinerea*. The lethal concentration LC90 and LC50 were estimated by Probit analysis. Subsequently, LC90, LC50, Tween 80 0.01 % and a control were evaluated in the *in vitro* germination of conidia. LC90 and LC50 were retaken for evaluation on strawberry fruits. Twenty-five chemical compounds were identified in the essential oil. Concentrations of 1 and 0.5 % inhibited *B. cinerea* without statistical differences with respect to the commercial fungicide. Tween 80 promoted conidial germination (89 %) and with the lethal concentration LC90 (1.6 %) there was no germination. Fruit treated with LC90 showed lower incidence and severity. The essential oil had a fungistatic effect against *B. cinerea* and a protective effect on strawberry fruits.

KEY WORDS:

Tagetes linifolia, gray mold, incidence, severity.

6.2 Introducción

Los hongos tienen un amplio grupo de plantas hospedadoras, infectan cultivos de importancia en la agricultura (Fillinger & Elad, 2016). *B. cinerea*, afecta aproximadamente a 1,400 especies de plantas, causa la enfermedad del moho gris y esto repercute en pérdidas económicas (Elad *et al.*, 2016). La fresa (*Fragaria* × *ananassa*) es un cultivo de importancia mundial, sus frutos son fuente de vitaminas y diversos compuestos bioactivos (Padmanabhan *et al.*, 2016). Sin embargo, son muy susceptibles a daños mecánicos, deshidratación, pudriciones en campo, almacenamiento, transporte y comercialización (Petrasch *et al.*, 2019). El moho gris es de las enfermedades más severas en el manejo postcosecha. Las estrategias actuales de control contra este y otros patógenos incluyen fungicidas sintéticos, pero tienen efectos secundarios en el humano y el ambiente (Anderson *et al.*, 2004; Zubrod *et al.*, 2019).

Por lo anterior, se han buscado otras alternativas que sean eficaces, los aceites esenciales de plantas se han propuesto como una opción para minimizar el uso de estos productos sintéticos. Varios aceites esenciales han mostrado actividad antifúngica tanto *in vitro* como *in vivo* contra diferentes especies de hongos fitopatógenos (Abdi-Moghadam *et al.*, 2023). Debido a su alta volatilidad, naturaleza efímera y porque son biodegradables (Falleh *et al.*, 2020) poseen el estatus GRAS por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Jackson-Davis *et al.*, 2023). Por ello, se usan como conservantes de frutas, estos ralentizan o inhiben el crecimiento de hongos (Freche *et al.*, 2022).

Los aceites esenciales de especies del género *Tagetes* (*T. lemmonii* y *T. patula*) han mostrado potencial antifúngico *in vitro* contra *B. cinerea* (Romagnoli *et al.*, 2005; Larios-Palacios *et al.*, 2020). Sus abundantes compuestos químicos, en su mayoría monoterpenos, sesquiterpenos y fenilpropanoides (Salehi *et al.*, 2018; Serrato, 2014) son los responsables de disminuir el crecimiento micelial y la esporulación en algunos hongos (Achimón *et al.*, 2021).

Aunque se dispone de información sobre los usos de varias especies de *Tagetes* en la industria cosmética y alimenticia, en medicina tradicional, como bactericida y plaguicida (Cornelius & Wycliffe, 2016; Salehi *et al.*, 2018; Serrato *et al.*, 2014). Las propiedades biológicas de algunas de ellas aún se desconocen, tal es el caso de *Tagetes linifolia* Seaton, de distribución regional en México (Turner, 1996). Es una planta perenne arbustiva de 20-40 cm de alto (Turner, 1996) y de la cual hasta ahora no se dispone información sobre su composición química ni de sus efectos biológicos y posibles usos (Serrato *et al.*, 2014). Por ello, el objetivo fue caracterizar

los compuestos químicos en el aceite esencial de *T. linifolia* y evaluar su efecto *in vitro* y en postcosecha de frutos de fresa contra *B. cinerea*.

6.3 Material y Métodos

6.3.1 Extracción y análisis químico del aceite esencial

En Tezontepec, Puebla, México (19.505131, -97.503948) en el mes de octubre de 2022 se recolectaron plantas en floración de *T. linifolia*. El tejido fresco conformado por flores tallos y hojas se trituró y una muestra de 4 kg fue sometida a hidrodestilación en un destilador tipo italiano, se obtuvo un rendimiento de 0.87 mL kg⁻¹. El aceite esencial se vertió en frascos de vidrio ámbar y se conservaron en refrigeración (4 °C). Tres muestras herborizadas se depositaron en el "Herbario-Hortorio JES" de la Universidad Autónoma Chapingo (voucher 35885).

El análisis químico del aceite esencial se hizo en el Laboratorio de Productos Naturales de Preparatoria Agrícola Chapingo con la técnica de microextracción en fase sólida (SPME) de fibra recubierta (Xu & Ouyang, 2018). La fibra fue expuesta a la fase de vapor de la muestra (1 µL) e inyectada en un cromatógrafo de gases acoplado a un espectrómetro de masas de trampa de iones (GC-MS Agilent Technologies 7890 Agilent 240, Agilent Technologies). Se utilizó una columna capilar GC column VF-5ms, de 30 x 0.25 (0.25). La temperatura del inyector se mantuvo a 250 °C, con un modo de inyección split/splitless (1:20), se utilizó una columna VF-5 MS (30 m x 250 µm x 0.25 µm) con gas acarreador de helio y flujo de 0.5 mL min⁻¹ y una presión de 0.5 atm. El horno trabajó con una rampa de calentamiento de 70°C a 120 °C, con velocidad de 2 °C min⁻¹ y de 120 °C a 230 °C a 15 °C min⁻¹ de 0.5 mL min⁻¹. La muestra se analizó por duplicado.

La identificación de los compuestos químicos se hizo al comparar el tiempo de retención y el espectro de masas con la biblioteca espectral de masas del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST) y se confirmó mediante el cálculo del índice de Kovats comparado con la literatura (NIST: <https://webbook.nist.gov/chemistry/>). Se usaron n-alcenos (C8-C20) para calcular dicho índice y una variación de ±40 unidades para identificar los compuestos. La abundancia relativa de cada compuesto se estimó con base en el área de los picos.

6.3.2 Evaluación *in vitro*

El experimento se realizó en el Laboratorio de Resistencia Genética en la Universidad Autónoma Chapingo. *B. cinerea* (registro: PP401673.1) se reactivó en medio de cultivo Agar de Dextrosa y Papa (PDA) con incubación en estufa de cultivo en condiciones de oscuridad a 18 ± 2 °C durante cinco días.

Mediante diluciones, se prepararon emulsiones con Tween 80 (0.01 %), agua bidestilada y aceite esencial en seis concentraciones (1, 0.5, 0.1, 0.01, 0.001 y 0.0001 %), el control fue medio PDA esterilizado en autoclave (120 °C durante 15 min) y el fungicida Cabrio C (1 g L⁻¹) se usó como referencia. La actividad antifúngica se evaluó con la técnica de placa envenenada (Erhonyota *et al.*, 2023). A partir de una colonia de cuatro días de crecimiento se obtuvo un disco de 3.5 mm con micelio y se colocó en el centro de las cajas Petri. Las condiciones de incubación fueron las mismas. Durante cinco días y cada 24 h se midió el crecimiento micelial con un vernier digital. Con los datos obtenidos se estimó la inhibición del crecimiento micelial (Fokkema, 1973). Al finalizar la evaluación *in vitro* se determinó la concentración letal CL50 y CL90 mediante análisis Probit en el programa académico SAS (Castillo, 2007).

6.3.3 Evaluación de concentraciones Probit en conidios

Las concentraciones CL50 y CL90 se evaluaron sobre conidios de *B. cinerea*. En un tubo Falcon de 50 mL se agregaron 100 mL de agua bidestilada estéril y 10 µL de Tween 80. A partir de una colonia de doce días de crecimiento y con esporulación se hizo un raspado para obtener

conidios de *B. cinerea*. El tubo se agitó en vórtex durante 10 s y el conteo de conidios se hizo por triplicado en cámara de Neubauer. Se obtuvo una suspensión de conidios 5×10^5 .

En medio PDA combinado con aceite esencial se prepararon los siguientes tratamientos: a) PDA+CL50, b) PDA+CL90, c) PDA+Tween 80 al 0.01 % y d) control con solo PDA. Previo al vaciado del medio de PDA, en el centro de cada caja Petri se agregaron 2 μ L de la suspensión (100 conidios) y después se vació el medio PDA a temperatura ambiente. Las cajas se movieron con movimientos circulares para distribuir los conidios en el medio de cultivo y se incubaron en las condiciones anteriormente descritas. Cada 24 h se hizo el conteo de conidios germinados, hasta las 96 h.

6.3.4 Evaluación de concentraciones Probit en frutos

Se cosecharon frutos en madurez comercial de plantas de fresa var. "FESTIVAL" y se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 50 ppm durante 3 min. Los frutos se enjuagaron con agua bidestilada estéril y se colocaron en papel absorbente. Se evaluaron tratamientos con frutos inoculados y no inoculados. Los frutos fueron sumergidos durante 15 s en la emulsión de aceite esencial CL50 y CL90 preparada con Tween 80 (0.01 %) y agua bidestilada estéril.

En contenedores de plástico transparente tipo bisagra fueron colocados cinco frutos y transcurridas 6 h, solo los frutos del tratamiento con inoculación fueron inoculados mediante aspersión con 10 mL de una suspensión de conidios (1×10^6) de *B. cinerea*. Los contenedores se refrigeraron a 4 °C y se evaluó el desarrollo de pudrición en los frutos mediante un análisis de incidencia (Ecuación 1) a los cinco, diez y quince días después de la inoculación. Transcurridos quince días, se registró el crecimiento superficial de micelio para estimar la severidad (Ecuación 2) (McKinney, 1923). Se utilizó la escala de Romanazzi *et al.* (2013): 0) fruto sano; 1) 1-20 % de la superficie del fruto infectada; 2) 21-40 % de la superficie del fruto infectada; 3) 41-60 % de la superficie del fruto infectada; 4) 61-80 % de la superficie del fruto infectada; 5) más del 80 % de la superficie del fruto infectada. Se utilizaron como control frutos sin inoculación y frutos con inoculación, sin aplicación de aceites esenciales.

Ecuación 1: estimación de incidencia en frutos

$$\text{Incidencia} = \frac{\text{Número de frutos enfermos}}{\text{Número total de frutos}} * 100$$

Ecuación 2: estimación de severidad en frutos con escala 0-5

$$\text{Severidad} = \frac{\sum(nixi)}{NZ} * 100$$

xi: puntuación de la escala de gravedad

ni: número de frutos con escala xi

N: número total de frutos observados

Z: puntuación más alta.

6.3.5 Análisis de datos

En los experimentos se utilizó un Diseño Completamente al Azar. Los tratamientos *in vitro* con medio PDA tuvieron cinco repeticiones. En la evaluación sobre frutos se hicieron tres repeticiones con cinco frutos en cada repetición. Las variables inhibición, porcentaje de germinación, incidencia y severidad fueron analizadas en software académico SAS mediante análisis de varianza y pruebas de comparación múltiple de Tukey ($p < 0.05$).

6.4 Resultados y Discusión

6.4.1 Compuestos químicos del aceite esencial

Se identificaron 25 compuestos químicos en el aceite esencial de *T. linifolia*, el 40 % fueron terpenoides, 32 % monoterpenos, 12 % sesquiterpenos y algunos ésteres (8 %), cetonas (4 %) y alcoholes (4 %) (Cuadro 10), lo cual coincide con Salehi *et al.* (2018) quienes mencionan que los aceites esenciales de *Tagetes* son ricos en monoterpenos y cantidades bajas de sesquiterpenos. Los compuestos mayoritarios fueron: 1,5-heptadien-4-ol, 3,3,6-trimetil- (34.99 %), (E)-Tagetona (13.47 %) y β -Pineno (3.24 %). El primer compuesto mayoritario se reporta por primera vez en *Tagetes*, mientras que los demás compuestos son comunes en el género (Salehi *et al.*, 2018). Los compuestos presentes en el aceite de *T. linifolia* podrían tener efectos relevantes y de uso diversificado.

Cuadro 10. Chemical compounds and relative abundance (RA) in *T. linifolia* essential oil.

Compound	RA	KIC	Compound	RA	KIC
* 1,5-Heptadien-4-ol, 3,3,6-trimethyl	34.99	1068 $\pm$ 12.8	- 3-Carene	0.15	1005 $\pm$ 3.2
* (E)-Tagetone	13.47	1136 $\pm$ 11.86	* β -Linalool	0.12	1081 $\pm$ 14.3
- β -Pinene	3.24	970 $\pm$ 12.4	= 6-Methyl-5-hepten-2-one	0.09	958 $\pm$ 17
- trans- β -Ocimene	2.55	1034 $\pm$ 0.1	* 2-Isopropylidene-5-methylhex-4-enal	0.09	1151 $\pm$ 9.5
= 1-Pentanol, 5-cyclopropylidene-	2.54	1085 $\pm$ 22.1	* Bicyclo[3.1.1]heptan-3-one, 2,6,6-trimethyl-, (1 α ,2 α ,5 α)-	0.08	1151 $\pm$ 36.7
- α -Thujene	1.54	968 $\pm$ 24.9	/ Cariofileno	0.07	1424 $\pm$ 1.8
- Camphene	0.70	943 $\pm$ 4.6	* Elsholtzia ketone	0.06	1167 $\pm$ 23.9
- o-Cimene	0.60	1025 $\pm$ 0.1	/ α -Bergamotene	0.05	1407 $\pm$ 15.6
* Verbenone, (L)-	0.56	1191 $\pm$ 34.7	- α -Pinene	0.05	931 $\pm$ 4.9
- Limonene	0.52	1014 $\pm$ 10.8	+ cis-3-Hexenyl acetate	0.04	983 $\pm$ 15
- β -Sabinene	0.31	964 $\pm$ 2.7	* endo-Borneol	0.04	1148 $\pm$ 18.2
+ Sorbic acid vinyl ester	0.30	990 $\pm$ 33.4	/ (-)- β -Bourbonene	0.01	1408 $\pm$ 12.2
* 3,6-Dimethyl-2,3,3a,4,5,7a-hexahydrobenzofuran	0.20	1178 $\pm$ 31.4			

IKC: Kovats index calculated $\pm$ standard deviation, $C_{10}H_{16}$ (-): monoterpenes, $C_{15}H_{24}$ (/): sesquiterpenes, (=): ketones, (+): esters, terpenoids (*): terpenes that undergo biochemical modifications through enzymes that add oxygen molecules and move or remove methyl groups.

6.4.2 Evaluación *in vitro*

Las concentraciones de 0.5 y 1 inhibieron el crecimiento micelial en 83 y 86 %, respectivamente, y no hubo diferencias estadísticas con respecto al fungicida comercial (Figura 1). Aún con las bajas diluciones (0.01 y 0.001 %) la inhibición fue de 19 y 28 % con diferencias estadísticas con respecto al control (Figura 8). El efecto inhibitorio sobre *B. cinerea* ya se ha observado en otras especies de *Tagetes* (Romagnoli *et al.*, 2005; Larios-Palacios *et al.*, 2020) y su efecto se atribuye principalmente a los monoterpenos de una manera dependiente de la concentración usada (García *et al.*, 2008). Romagnoli *et al.* (2005) evaluaron el aceite esencial de *T. patula* contra *B. cinerea* y a las 6 h observaron afectación en las hifas, el citoplasma y en las mitocondrias. Esto sucede porque los aceites esenciales se absorben en la superficie lipofílica del micelio (Kiran *et al.*, 2016). Romagnoli *et al.* (2005) también evaluaron dos estándares puros de piperitenona y piperitona sin observar inhibición sobre el hongo, entonces, la sinergia de compuestos en el aceite esencial repercute en la inhibición.

En el aceite esencial de *T. linifolia* se identificaron los compuestos α -pineno, sabineno, limoneno, linalool, (E)-tagetona y endo-borneol (Cuadro 10), lo cual coincide con lo reportado en *T. patula* (Romagnoli *et al.*, 2005). Por ello, el efecto de inhibición también se atribuye a estos compuestos y al compuesto mayoritario β -pineno, que tuvo una abundancia relativa de 3.24 % (Cuadro 10). Se ha evidenciado que este compuesto tiene actividad antifúngica contra *Fusarium circinatum* y *Fusarium temperatum* (Slinski *et al.*, 2015), actúa a través de la interferencia con la pared celular (Andrade *et al.*, 2019).

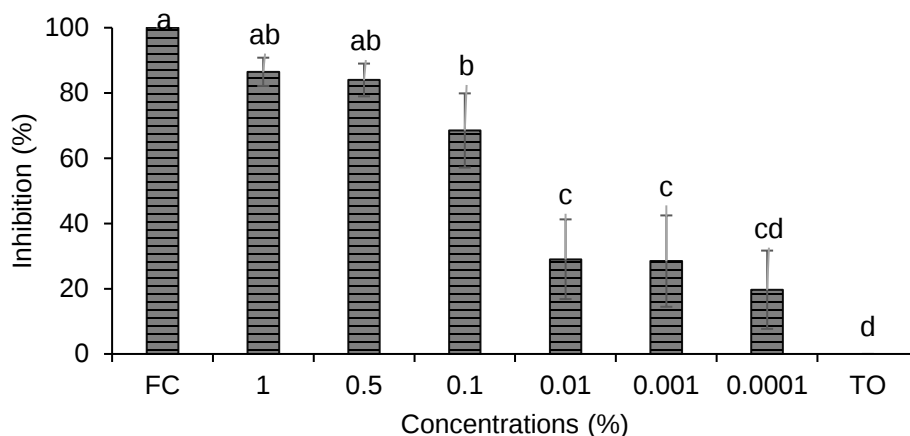


Figure 8. Inhibition of mycelial growth of *B. cinerea* with the essential oil of *T. linifolia*. Means with equal letters are not statistically different (Tukey < 0.05). TO: control, FC: commercial fungicide Cabrio C, concentration of essential oil used (v/v): 1, 0.5, 0.1, 0.01, 0.001, 0.0001.

6.4.3 Análisis Probit

Con el análisis Probit se obtuvieron las concentraciones letales del 50 % (CL50) y 90 % (CL90), para CL50 fue de 0.04 % (v/v) y para CL90 de 1.6 % (v/v) (Cuadro 11). Estas concentraciones fueron retomadas para su evaluación sobre la germinación de conidios y su evaluación en frutos.

Cuadro 11. Lethal concentrations LC50 and LC90 of the essential oil of *T. linifolia* obtained by Probit analysis.

Essential oil (v/v)	LC50	LC90	<i>p</i> -value
<i>T. linifolia</i>	0.04 %	1.6 %	<0.0001

CL50: lethal concentration causing 50 % mortality, CL90: lethal concentration causing 90 % mortality, *p*-value: represents the heterogeneity in the analyzed population.

6.4.4 Evaluación de concentraciones Probit en conidios

Con CL90 (1.6 %) se inhibió totalmente la germinación de conidios con diferencias estadísticas con respecto al control mientras que, con CL50 (0.04 %) la germinación fue del 17 % a las 96 h (Figura 9). En otros estudios, se han evaluado aceites esenciales de *Trachyspermum ammi* (2 $\mu\text{L mL}^{-1}$) y *Ocimum selloi* (1000 ppm) y han inhibido totalmente la germinación de conidios en *Aspergillus niger*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Moniliophthora perniciosa* (Costa *et al.*, 2015; Gemeda *et al.*, 2014). Los compuestos limoneno, sabineno, α -pineno, mirceno, octanal, γ -terpineno, β -ocimeno, linalool, decanal, cariofileno y nootkatone, presentes en cascara de toronja, inhiben la germinación de conidios en *B. cinerea* (Droby *et al.*, 2008) y los compuestos α -pineno, cariofileno y limoneno también se encontraron en el aceite esencial de *T. linifolia* (Cuadro 10).

Por otra parte, el surfactante Tween 80 promovió la germinación de conidios (89 %) incluso más que en el control (79 %). Sin embargo, cuando se usó para preparar la emulsión con el aceite esencial (CL50 y CL90) parece no tener efecto, se observó una fuerte inhibición sobre la germinación (Figura 9). Aunque el uso de surfactantes (Tween 20 y Tween 80) se usa para liberar los conidios de los conidióforos, este puede interferir en la germinación de algunos hongos, en *Pyrenophora tritici-repentis* Tween 20 al 0.02 % retrasó la germinación, sin embargo, en dos horas, todos los conidios germinaron totalmente (Jacques *et al.*, 2021). Mwamburi *et al.* (2015) observaron que Tween 80 inhibe la germinación de *Beauveria bassiana* a una concentración del 0.5 y 1 %, pero estimula la germinación a concentraciones de 0.1 %. Tu *et al.* (2014) observaron que las células de *Aureobasidium pullulans* parecían estar más sueltas y grandes después de la aplicación de Tween 80 al 0.02 %. Debido a los efectos observados con Tween 80, se sugiere estandarizar las concentraciones y hacer su evaluación con hongos benéficos, su efecto de favorecer la germinación de conidios podría tener ventajas.

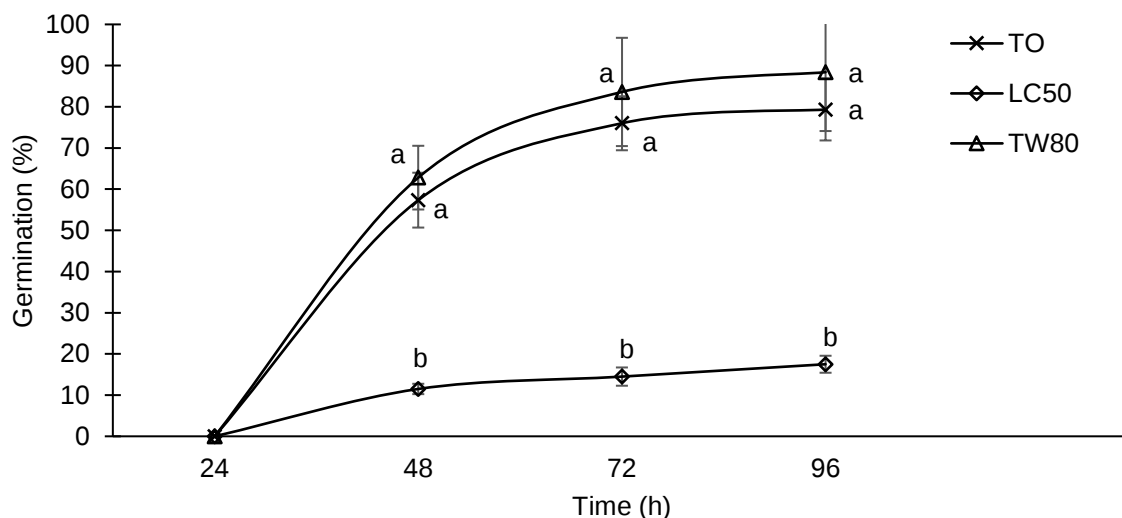


Figure 9. Germination of *B. cinerea* conidia on PDA medium with lethal concentration LC50, Tween 80 (TW80) and control (TO). The treatment with lethal concentration LC90 is not included since there was no germination of conidia.

6.4.5 Evaluación de concentraciones Probit en frutos

La incidencia del moho gris causado por *B. cinerea* fue menor en los frutos no inoculados y tratados con la concentración letal CL90, mientras que, en los frutos con inoculación la incidencia fue mayor (Cuadro 12). Durante cinco días de refrigeración, los frutos tratados con CL90 no mostraron incidencia del patógeno y a los quince días mostraron incidencia del 50 % (Cuadro 12), la superficie del fruto infectada fue de 1-20 % (Figura 10), a diferencia de los tratamientos control inoculado y no inoculado, que mostraron la mayor incidencia a partir del día cinco hasta el día quince. Además, la severidad fue mayor (Cuadro 12), la superficie del fruto infectada fue entre 61 y 81 % (Figura 10), aspecto que hace al fruto no apto para consumo. Los frutos tratados con la concentración media letal (CL50 y CL50I) mostraron incidencia menor al control a los cinco días, pero la severidad hace que sean ineficaces como conservantes de frutos de fresa (Cuadro 12 y Figura 10). El efecto protector contra *B. cinerea* en frutos de fresa ya se ha demostrado con aceites esenciales de *Aloysia citriodora*, *Cymbopogon winterianus*, *Lippia alba*, *Ocimum americanum*, *Citrus×limon* y *Cinnamomum cassia* (Fontana et al., 2021; Freche et al., 2023). Los resultados de este estudio permiten proponer el aceite esencial de *T. linifolia* como un insumo para contrarrestar efectos negativos causados por *B. cinerea*.

Cuadro 12. Incidence and severity of *B. cinerea* in strawberry fruits treated with essential oil LC90 and LC50 and refrigerated for 15 days.

Treatments	Incidence			Severity
	5 d	10 d	15 d	15 d
TO not inoculated	13.3 ± 11.5 ab	46.6 ± 11.5 ab	80 ± 20 a	3.8 ± 0.8 a
TO inoculated	40 ± 20 a	53.3 ± 11.5 a	90 ± 11.5 a	4.8 ± 0.4 a

LC90	0 ± 0 b	6.6 ± 11.5 c	50 ± 20 a	1 ± 0.7 c
LC90I	6.6 ± 11.5 b	13.3 ± 11.5 bc	73.3 ± 23 a	1.8 ± 0.4 bc
LC50	6.6 ± 11.5 b	40 ± 20 abc	73.3 ± 11.5 a	3 ± 1.8 ab
LC50I	0 ± 0 b	46.6 ± 11.5 ab	93.3 ± 11.5 a	4.8 ± 0.4 a
p-value	0.0509	0.0040	0.1762	<.0001
DMS	31.6	36	51.2	1.9

TO: control, LC: lethal concentration, I: inoculated, severity: damage scale 0-5

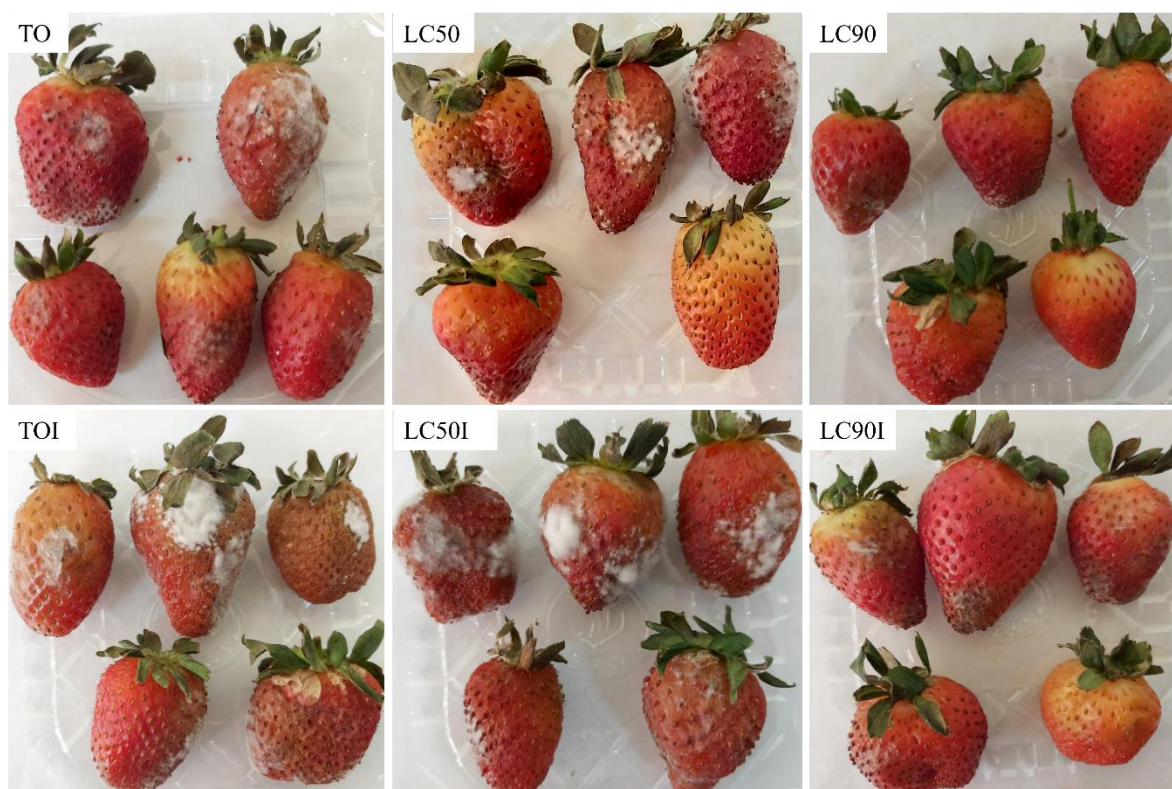


Figure 10. Protective effect of *T. linifolia* essential oil fifteen days after incubation on inoculated and non-inoculated fruits. LC50 and LC90: Probit concentrations, TO: control, I: inoculated fruits.

En este estudio, el tratamiento CL90 de *T. linifolia* resultó efectivo para controlar la enfermedad en postcosecha hasta los cinco días (Cuadro 12 y Figura 10), un antecedente importante para explorar su aplicación en fase de vapor (Tančinová *et al.*, 2022) o preparar biopelículas activas a base de polisacáridos cargadas de aceites esenciales para la conservación de alimentos (Khan *et al.*, 2023). Aún falta estandarizar concentraciones óptimas, porque los aceites esenciales pueden causar efectos organolépticos negativos cuando se agregan en altas concentraciones (Hyldgaard *et al.*, 2012), sin embargo, es una alternativa efectiva y segura para el humano (Taghavi *et al.*, 2018).

6.5 Conclusiones

El aceite esencial de *T. linifolia* contiene abundantes monoterpenos, terpenoides y sesquiterpenos. El aceite esencial es funcional como conservante de frutos de fresa en etapa de maduración comercial, inhibe la germinación de conidios y detiene el crecimiento micelial del

hongo. El aceite esencial de *T. linifolia* podría aplicarse en otros frutos con problemas asociados con *B. cinerea*.

Contribución de los autores

MARG y MASC diseñaron, realizaron la investigación y redacción del escrito; EVM y RSV facilitaron acceso a materiales de laboratorio, el material vegetal, apoyaron en la realización de experimentos y metodología; RMGT y MARG analizaron las muestras en el equipo de cromatografía y la identificación de compuestos químicos. Todos los autores revisaron y aprobaron el escrito.

Financiamiento

Esta investigación fue financiada con fondos propios

Agradecimientos

Se agradece el apoyo del Laboratorio de Naturales ubicado en preparatoria agrícola Chapingo.

Conflicto de interés

Los autores declaran no tener conflicto de interés

6.6 Referencias

- Abdi-Moghadam, Z., Mazaheri, Y., Rezagholizade-Shirvan, A., Mahmoudzadeh, M., Sarafraz, M., Mohtashami, M., Shokri, S., Ghasemi, A., Nickfar, F., Darroudi, M., Hossieni, H., Hadian, Z., Shamloo, E., & Rezaei, Z. (2023). The significance of essential oils and their antifungal properties in the food industry: A systematic review. *Heliyon*, 9(11), Article e21386. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2023.e21386>
- Achimón, F., Brito, V. D., Pizzolitto, R. P., Sánchez, A. R., Gómez, E. A., & Zygadlo, J. A. (2021). Chemical composition and antifungal properties of commercial essential oils against the maize phytopathogenic fungus *Fusarium verticillioides*. *Revista Argentina de Microbiología*, 53(4), 292-303. <https://doi.org/10.1016/j.ram.2020.12.001>
- Anderson, B. D., Sarkar, A., Thompson, J. F., & Singh, R. P. (2004). Commercial-scale forced-air cooling of packaged strawberries. *Transactions of the ASAE*, 47(1), 183-190. <https://doi.org/10.13031/2013.15846>
- Andrade, A. C., Rosalen, P. L., Freires, I. A., Scotti, M. T., De Aquino, S. G., & De Castro, R. D. (2019). Antifungal activity, mode of action, docking prediction and anti-biofilm effects of (+)- β -pinene enantiomers against *Candida* spp. *Current Topics in Medicinal Chemistry*, 18(29), 2481-2490. <https://doi.org/10.2174/1568026618666181115103104>
- Castillo Márquez. L. E. (2007). Introducción al SAS para Windows. Universidad Autónoma Chapingo. 3 edición. 295 p.

- Cornelius, W. W., & Wycliffe, W. (2016). Tagetes (*Tagetes minuta*) oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety*, 791-802. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-416641-7.00090-0>
- Costa, L. C. B., Pinto, J. E. B. P., Bertolucci, S. K. V., Costa, J. C. D. B., Alves, P. B., & Niculau, E. D. S. (2015). *In vitro* antifungal activity of *Ocimum selloi* essential oil and methylchavicol against phytopathogenic fungi. *Revista Ciência Agronômica*, 46(2), 428-435. <https://doi.org/10.5935/1806-6690.20150023>
- Droby, S., Eick, A., Macarasin, D., Cohen, L., Rafael, G., Stange, R., McColum, G., Dudai, N., Ahmed, N., Wisniewski, M., & Shapira, R. (2008). Role of citrus volatiles in host recognition, germination and growth of *Penicillium digitatum* and *Penicillium italicum*. *Postharvest Biology and Technology*, 49(3), 386-396. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2008.01.016>
- Elad, Y., Pertot, I., Cotes Prado, A. M., & Stewart, A. (2016). Plant Hosts of *Botrytis* spp. In: *Botrytis—the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems*. Fillinger, S., & Elad, Y. (pp. 413-486). Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_20
- Erhonyota, C., Edo, G. I., & Onoharigho, F. O. (2023). Comparison of poison plate and agar well diffusion method determining the antifungal activity of protein fractions. *Acta Ecologica Sinica*, 43(4), 684-689. <https://doi.org/10.1016/j.chnaes.2022.08.006>
- Falleh, H., Jemaa, M. B., Saada, M., & Ksouri, R. (2020). Essential oils: A promising eco-friendly food preservative. *Food Chemistry*, 330, Article 127268. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2020.127268>
- Fillinger, S., & Elad, Y. (2016). *Botrytis*-the fungus, the pathogen and its management in agricultural systems. En Springer eBooks. <https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0>
- Fokkema, N. J. (1973). The role of saprophytic fungi in antagonism against *Dreschlera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and rye leaves with pollen. *Physiological Plant Pathology*, 3(2), 195-202. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(73\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0048-4059(73)90082-9)
- Fontana, D. C., Neto, D. D., Pretto, M. M., Mariotto, A. B., Caron, B. O., Kulczynski, S. M., & Schmidt, D. (2021). Using essential oils to control diseases in strawberries and peaches. *International Journal of Food Microbiology*, 338, Article 108980. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2020.108980>
- Freche, E., Gieng, J., Pignotti, G. A., Ibrahim, S. A., & Feng, X. (2022). Applications of lemon or cinnamon essential oils in strawberry fruit preservation: A review. *Journal of Food Processing and Preservation*, 46(9). <https://doi.org/10.1111/jfpp.16526>

- Freche, E., Gieng, J., Pignotti, G. A., Ibrahim, S. A., Tran, H. T., Ahn, D. U., & Feng, X. (2023). Effects of lemon or cinnamon essential oil vapor on physicochemical properties of strawberries during storage. *Han-guksikpumjeojang-yutonghakoeji*, 30(4), 549-561. <https://doi.org/10.11002/kjfp.2023.30.4.549>
- García, R. E., Alves, E. S., Santos, M. P., Aquije, G. M. V., Fernandes, A. A. R., Santos, R. B. D., Ventura, J. A., & Fernandes, P. M. B. (2008). Antimicrobial activity and potential use of monoterpenes as tropical fruits preservatives. *Brazilian Journal of Microbiology*, 39(1), 163-168. <https://doi.org/10.1590/s1517-83822008000100032>
- Gemeda, N., Woldeamanuel, Y., Asrat, D., & Debella, A. (2014). Effect of essential oils on *Aspergillus* spore germination, growth and mycotoxin production: a potential source of botanical food preservative. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 4(Supl 1), S373-S381. <https://doi.org/10.12980/apjtb.4.2014c857>
- Hyldgaard, M., Mygind, T., & Meyer, R. L. (2012). Essential oils in food preservation: mode of action, synergies, and interactions with food matrix components. *Frontiers in Microbiology*, 3, Article 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2012.00012>
- Jackson-Davis, A., White, S., Kassama, L. S., Coleman, S., Shaw, A., Mendonça, A. F., Cooper, B., Thomas-Popo, E., Gordon, K. W., & London, L. (2023). A review of regulatory standards and advances in essential oils as antimicrobials in foods. *Journal of Food Protection*, 86(2), Article 100025. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2022.100025>
- Jacques, S., Lenzo, L., Stevens, K. et al. An optimized sporulation method for the wheat fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Methods* 17, 52 (2021). <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00751-4>
- Jacques, S., Lenzo, L., Stevens, K., Stevens, K., Lawrence, J., & Tan, K. C. (2021). An optimized sporulation method for the wheat fungal pathogen *Pyrenophora tritici-repentis*. *Plant Methods*, 17(52), 4-12. <https://doi.org/10.1186/s13007-021-00751-4>
- Khan, S., Abdo, A. A. A., Shu, Y., Zhang, Z., & Liang, T. (2023). The extraction and impact of essential oils on bioactive films and food preservation, with emphasis on antioxidant and antibacterial activities a review. *Foods*, 12(22), Article 4169. <https://doi.org/10.3390/foods12224169>
- Kiran, S., Kujur, A., & Prakash, B. (2016). Assessment of preservative potential of *Cinnamomum zeylanicum* Blume essential oil against food borne molds, aflatoxin B1 synthesis, its functional properties and mode of action. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 37, 184-191. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2016.08.018>

- Larios-Palacios, O. E., López-Vázquez, E. Y., Rodríguez, A. C., Ruíz-Espinoza, F. J., Solano-Vidal, R., & Serrato-Cruz, M. A. (2020). Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(3), 593-606. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.2077>
- McKinney, H. H. (1923). Influence of soil temperature and moisture on infection of wheat seedling by *Helminthosporium sativum*. *Journal Agricultural Research*, 26, 195-217. <https://eurekamag.com/research/013/404/013404640.php?srltid=AfmBOoro6bjNi4Y4u-fwwzS0faGgRaBlzcP-EFreUWaqKnKBee2VGS6l>
- Mwamburi, L. A., Laing, M., & Miller, R. (2015). Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 67-74. <https://doi.org/10.1590/s1517-838246120131077>
- Padmanabhan, P., Mizran, A., Sullivan, J. A., & Paliyath, G. (2016). Strawberries. En Elsevier eBooks (pp. 193-198). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-384947-2.00667-x>
- Petrash, S., Knapp, S. J., Van Kan, J., & Blanco-Ulate, B. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), 877-892. <https://doi.org/10.1111/mpp.12794>
- 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(1-2), 57-65. <https://doi.org/10.1007/s00709-005-0084-8>
- Romanazzi, G., Feliziani, E., Santini, M., & Landi, L. (2013). Effectiveness of postharvest treatment with chitosan and other resistance inducers in the control of storage decay of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 75, 24-27. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.07.007>
- Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Leal, A. L. A. B., Coutinho, H. D. M., Vitalini, S., Kręgiel, D., Antolak, H., Sharifi-Rad, M., Silva, N. C. C., 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*, 23(11), Article 2847. <https://doi.org/10.3390/molecules23112847>
- Serrato, C. M. A. 2014. El recurso genético cempoalxóchitl (*Tagetes* spp.) de México (Diagnóstico). Chapingo, Estado de México. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225091/El_recurso_gen_tico_del_cempoalxochitl_tagetes_spp_de_mexico_diagnostico_.pdf
- Serrato, C. M. A., Bautista, R. F., & Monroy, S. A. S. (2014). Guía para conocer el Germoplasma Mexicano de Cempoalxóchitl (*Tagetes* spp.). México.

https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225099/Guia_para_conocer_el_germoplasma_mexicano_de_cempoalxochitl__tagetetes_spp_.pdf

- Slinski, S., Negre-Zakharov, F., & Gordon, T. R. (2015). The effect of resin and monoterpenes on spore germination and growth in *Fusarium circinatum*. *Phytopathology*, 105(1), 119-125. <https://doi.org/10.1094/phyto-02-14-0027-r>
- Taghavi, T., Kim, C., & Rahemi, A. (2018). Role of natural volatiles and essential oils in extending shelf life and controlling postharvest microorganisms of small fruits. *Microorganisms*, 6(4), Article 104. <https://doi.org/10.3390/microorganisms6040104>
- Tančinová, D., Mašková, Z., Mendelová, A., Foltinová, D., Barboráková, Z., & Medo, J. (2022). Antifungal activities of essential oils in vapor phase against *Botrytis cinerea* and their potential to control postharvest strawberry gray mold. *Foods*, 11(19), Article 2945. <https://doi.org/10.3390/foods11192945>
- Tu, G., Wang, Y., Ji, Y., & Zou, X. (2014). The effect of Tween 80 on the polymalic acid and pullulan production by *Aureobasidium pullulans* CCTCC M2012223. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 31(1), 219-226. <https://doi.org/10.1007/s11274-014-1779-9>
- Turner, B. L. (1996). The comps of Mexico: A systematic account of the family Asteraceae. Cornell University. https://books.google.com.mx/books/about/The_Comps_of_Mexico_Taget_eae_and_Anthem.html?id=6gZHAAAAYAAJ&redir_esc=y
- Xu, J., & Ouyang, G. (2018). Extraction: Solid-Phase microextraction. En Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-409547-2.14552-4>
- Zubrod, J. P., Bundschuh, M., Arts, G., Brühl, C. A., Imfeld, G., Knäbel, A., Payraudeau, S., Rasmussen, J. J., Rohr, J. R., Scharmüller, A., Smalling, K. L., Stehle, S., Schulz, R., & Schäfer, R. B. (2019). Fungicides: an overlooked pesticide class?. *Environmental Science & Technology*, 53(7), 3347-3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>

CAPÍTULO VII: Perfil transcriptómico de *Botrytis cinerea* en respuesta a la actividad antifúngica del hidrolato de *Tagetes remotiflora*

7.1 Resumen

Los aceites esenciales, los hidrolatos y algunas sustancias homeopáticas derivadas de aceites esenciales son alternativas de control de hongos patógenos. El efecto molecular de varios aceites esenciales aún se desconoce y sobre el efecto de hidrolatos y sustancias homeopáticas no existe investigación. El objetivo fue evaluar *in vitro* el efecto del aceite esencial, hidrolato, y aceite homeopático provenientes de *Tagetes remotiflora* y Tween 20 contra *B. cinerea*; así como determinar la expresión de genes de *B. cinerea* debido al efecto del hidrolato y de Tween 20. Se evaluó el efecto de inhibición *in vitro* de estos insumos en medios de cultivo. El aceite esencial y el hidrolato fueron los tratamientos más efectivos para detener el crecimiento de *B. cinerea*, mientras que el Tween 20 y el aceite homeopático tuvieron un menor efecto. Se utilizó RNA-seq para identificar genes diferencialmente expresados (DEG) en respuesta a los tratamientos evaluados *in vitro*. En respuesta al hidrolato, se encontraron 1,662 DEG, 1,314 sub-expresados y 348 sobre-expresados. Con Tween 20 se encontraron 791 DEG, 456 sub-expresados y 335 sobre-expresados. Con el aceite esencial homeopático no se encontraron DEG. La alta inhibición del aceite esencial sobre el hongo no permitió su secuenciación al no obtener RNA de suficiente cantidad y calidad. El hidrolato afectó rutas relacionadas con los aminoácidos y carbohidratos; mientras que Tween 20 afectó el peroxisoma y metabolismo de ácidos grasos. La evaluación *in vitro* y el análisis transcriptómico confirmaron que el aceite esencial y el hidrolato de *T. remotiflora* tienen potencial de aplicación contra *B. cinerea*, sin desmerecer la importancia del surfactante.

Palabras clave: aceite esencial, aceite homeopático, análisis transcriptómico, inhibición, moho gris, Tween 20.

7.2 Introducción

La enfermedad del “moho gris”, causada por *Botrytis cinerea* (Ascomycota-Sclerotiniaceae), afecta diferentes cultivos y es el segundo patógeno fúngico de importancia científica y económica (Dean et al., 2012). Su genoma completo fue secuenciado durante 2016, estimado en alrededor de 42,630,066 nucleótidos ensamblados (Van Kan et al.,

2016). Este hongo infecta a más de 400 especies de plantas económicamente importantes, como las hortalizas, frutas, árboles y flores (Kuroyanagi et al., 2022). En cultivos de importancia mundial como la fresa (*Fragaria × ananassa* Duch.), el moho gris causa pérdidas de frutos hasta del 40 % (Cano et al., 2023). Por ello, el desarrollo de fungicidas ha sido necesario, sin embargo, los productos de origen químico son una preocupación global por sus efectos tóxicos sobre el humano y el ambiente (Gikas et al., 2022). Las aplicaciones continuas de productos químicos han generado resistencia en *B. cinerea* lo que provoca el aumento de la dosis aplicada y el desarrollo de químicos más potentes y agravan aún más los efectos negativos contra el ambiente y la salud humana (Shao et al., 2020).

Algunas alternativas actuales de control promueven el uso de productos naturales de origen vegetal y agentes de biocontrol (Haq et al., 2024), de los cuales los aceites esenciales e hidrolatos han surgido como alternativa biológica por su actividad protectora y preventiva contra *B. cinerea* (Zatla et al., 2017). Tanto los aceites esenciales como los hidrolatos son alternativas seguras y ecológicas (Almeida et al., 2024). Además, varios aceites esenciales son reconocidos como seguros por la Administración de Alimentos y Medicamentos (FDA) (Jackson-Davis et al., 2022). Por otra parte, los hidrolatos tienen usos en el sector alimentario debido a sus propiedades antimicrobianas o antioxidantes, aspecto que sugiere que son también insumos seguros (Shafie et al., 2022).

El género *Tagetes* (Asteraceae) incluye varias especies que se han estudiado por su actividad biológica contra hongos (Salehi et al., 2018). Únicamente, los aceites esenciales de *Tagetes lemmonii* y *T. patula* han inhibido *in vitro* de forma parcial o total a *B. cinerea* (Larios-Palacios et al., 2020; Şesan et al., 2015). Recientemente, los hidrolatos de *T. coronopifolia*, *T. terniflora*, *T. minuta* y *T. parryi* inhibieron a este hongo *in vitro* (Ruíz-González et al., 2024a).

Los efectos de inhibición observados sobre *B. cinerea* y en otros hongos se relaciona con el mecanismo de acción asociado con la diversidad de compuestos químicos presentes en los aceites esenciales (Nazzaro et al., 2017). Recientemente, se han empleado las ciencias ómicas (genómica, transcriptómica, proteómica y metabolómica) para comprender el efecto que tienen estos compuestos en las células fúngicas (Dai & Shen, 2022). Particularmente, la transcriptómica es de utilidad para investigar genes relacionados con la patogénesis y respuesta a estímulos (Hazra et al., 2023). Por ejemplo, mediante análisis transcriptómicos, se ha investigado el cambio en la expresión de genes en respuesta a las aplicaciones de aceites esenciales contra hongos (Chen et al., 2022; Yuan et al., 2024). También, se ha mostrado el efecto que pueden tener los aceites esenciales sobre rutas específicas de los hongos, por ejemplo, causan daños en la biosíntesis de metabolitos secundarios, el metabolismo de aminoácidos, metabolismo energético, carbohidratos, membranas, ribosoma, pared celular, transporte, lípidos y el procesamiento de la información genética (Hu et al., 2021; Li et al., 2020).

Aunque existen antecedentes de los análisis transcriptómicos sobre el efecto de los aceites esenciales contra hongos, para los hidrolatos aún no se genera información. Solo se sabe que sus efectos se podrían atribuir a la presencia de hidrocarburos, alcoholes, cetonas, aldehídos, ésteres, ácidos o a los compuestos fenólicos (Hu et al., 2019; Shen et al., 2017).

Por otra parte, la homeopatía aplicada en plantas se plantea como otra alternativa para combatir y controlar enfermedades causadas por hongos (Moreno, 2017). Por ejemplo, se ha logrado inhibir la germinación de *Alternaria solani* y

Corynespora cassiicola tratadas con aceites esenciales homeopáticos 6, 12, 30, 60, 100 y 200 CH derivados de *Eucalyptus citriodora*, *Cymbopogon citratus* (Oliveira et al., 2017). También se ha podido inhibir de forma parcial a *B. cinerea* con el nosode 7 CH y arsénico 6 CH (Larios-Palacios et al., 2020).

Sobre el mecanismo de acción de las sustancias homeopáticas, se ha confirmado que funcionan a través de la regulación de la expresión de genes (De et al., 2012). Las altas diluciones podrían afectar algunos niveles sutiles y tempranos de transducción de señales o expresión genética (Bellavite & Betti, 2021).

Los tensioactivos (Tween 20, Tween 40, Tween 80) generalmente se usan para preparar emulsiones con aceites esenciales (Gorjian et al., 2022). Sin embargo, se ha encontrado que tienen efectos de inhibición o son estimulantes del crecimiento de *Beauveria bassiana* y *Cordyceps sinensis* (Liu & Wu, 2012; Mwamburi et al., 2015).

Aunque se ha realizado investigación para el control de patógenos mediante la aplicación de sustancias homeopáticas, existe poca información sobre los mecanismos moleculares y los metabolismos afectados por los homeopáticos, así como del efecto de los hidrolatos. Por ello, el objetivo del estudio fue evaluar *in vitro* el efecto del aceite esencial, hidrolato, y aceite homeopático provenientes de *T. remotiflora* y Tween 20 contra *B. cinerea*; así como determinar el perfil transcriptómico de *B. cinerea* en respuesta a la actividad antifúngica de las sustancias evaluadas

7.3 Materiales y métodos

7.3.1 Pruebas de inhibición *in vitro* contra *B. cinerea*

7.3.1.1 Evaluación en medio PDA

Se utilizó una cepa de *B. cinerea* resguardada en el Laboratorio de Resistencia Genética de la Universidad Autónoma Chapingo (registro PP401673.1). En medio de cultivo PDA (BD Bioxon®) se reactivó el hongo y se incubó en condiciones de oscuridad a 20±2 °C durante cinco días. En cinco matraces Erlenmeyer, se prepararon 100 mL de medio PDA y se esterilizó a 120 °C durante 15 min (Autoclave Felisa^R, México). El medio PDA se dejó enfriar a temperatura

ambiente (17 °C). Se agregaron las sustancias tratamiento (v:v): aceite esencial (AE) de *T. remotiflora* (500 µL), 100 mL de hidrolato (H), 100 µL de Tween 20 (TW), 40 µL de aceite esencial homeopático (AH) y un tratamiento se usó como testigo (TO).

A partir de una colonia de *B. cinerea* de cinco días de crecimiento, se obtuvo inóculo y se transfirió al centro de las cajas Petri. La incubación fue como se indicó anteriormente. Para estimar el porcentaje de inhibición, se midió el crecimiento radial con vernier digital cada 24 h (Fokkema, 1973). Cada tratamiento tuvo cinco repeticiones. Se usó un diseño completamente al azar. El análisis de varianza se realizó en SAS® OnDemand for Academics (SAS OnDemand for Academics, 2024).

7.3.1.2 Evaluación en medio líquida NYDA

Se preparó medio agar nutriente levadura-glucosa (NYDA) con 1.2 g caldo nutritivo, 0.75 g extracto de levadura, 1.5 g de glucosa y 150 mL agua bidestilada. En tubos Falcon de 50 mL, se agregaron 10 mL de medio esterilizado y después las sustancias tratamiento (AE, H, AH y TW). El tratamiento testigo consistió en medio NYDA solo. En el tratamiento hidrolato no se utilizó agua bidestilada. Los tubos se inocularon a partir de una suspensión 1×10^4 esporas μL^{-1} . Se aplicaron tres repeticiones por cada tratamiento. Los tubos inoculados se incubaron a 20 ± 2 °C y agitación constante a 100 rpm en un orbit shaker (ORBIT, Labline instruments) durante 96 h. Cada 24 h se estimó el crecimiento del hongo mediante cambios en la densidad óptica con un espectrofotómetro ND-1000 v3.5 (NanoDrop Technologies, Inc. USA).

7.3.2 Extracción de ARN

Se utilizaron cultivos de 48 h para la extracción de ARN, el cultivo se recuperó con centrifugación en frío a 3 800 rpm durante 17 min (eppendorf^R 5810R, Germany). Se utilizó kit TRIzol™ Reagent (Invitrogen) para la extracción. La calidad y cantidad del ARN se determinó con el RNA Pico Sensitivity Reagent Kit y el LabChipGX Touch PE (PerkinElmer, EE.UU.). Se sintetizaron 24 bibliotecas con TruSeq Stranded mRNA LT Sample Prep Kit. En un bioanalizador Agilent

2100 con chip DNA 1000 se analizó la distribución del tamaño de los fragmentos enriquecidos por PCR. La secuenciación de 101 pb de lecturas de extremos emparejados se realizó en Macrogen (Seúl, Corea del Sur) con NovaSeq6000 (Illumina, EE.UU.). Los archivos de las secuencias se registraron en el National Center for Biotechnology Information, con los números de acceso: BioProject PRJNA1143533 (SRR30421781-SRR30421792).

7.3.3 Secuenciación, mapeo y anotación

El análisis bioinformático se llevó a cabo en Galaxy Europa (<https://usegalaxy.eu/>). Se usaron las herramientas FastQC (v0.74+galaxy0) para crear un informe de calidad de las lecturas. Se utilizó Trimmomatic (v0.39+galaxy2) con los parámetros Slidingwindow:5:25, Avgqual:30 y Minlen:60 para mejorar la calidad de las lecturas mediante el recorte y filtrado. El mapeo se llevó a cabo con la herramienta RNA STAR (v2.7.11a+galaxy0) para asignar las lecturas recortadas al genoma de referencia de *Botrytis cinerea* B05.10. obtenido de <https://genome.ucsc.edu/index.html>. La herramienta featureCounts (v2.0.3+galaxy2) se usó para el conteo de lecturas por gen. La herramienta Limma-Voom v3.58.1+galaxy0 se utilizó para determinar los genes diferencialmente expresados de las comparaciones hidrolato vs. testigo, aceite homeopático vs. testigo y Tween 20 vs. testigo. Para la extracción de los DEG se utilizó un $|\log FC| > 1$ y valor p ajustado < 0.05 . La herramienta heatmap2 (v3.1.3.1+galaxy0) se usó para visualizar los datos.

7.3.4 Análisis de ontología génica (GO) y rutas KEGG

Para el enriquecimiento de los DEG en las rutas KEGG, se utilizó KOBAS 3.0 (Bu et al., 2021). En el análisis GO, se empleó g:Profiler (Kolberg et al., 2023). En ambos programas se utilizó significance threshold: Benjamini-Hochberg FDR=0.05 y el genoma de referencia *B. cinerea* B05.10.

7.4 Resultados

7.4.1 Pruebas de inhibición *in vitro* contra *B. cinerea*

7.4.1.1 Evaluación en medio PDA

Los resultados de inhibición con los tratamientos aceite esencial, hidrolato, aceite homeopático, Tween 20 y testigose reportaron a los 5 días. El aceite esencial inhibió el crecimiento micelial en un 91 % y el hidrolato en 86 % ($p < 0.05$). La inhibición de Tween 20 fue de 28 % ($p < 0.05$). El aceite esencial homeopático inhibió el crecimiento del hongo en 19 %, pero sin diferencias estadísticas comparado con el testigo. El aceite esencial y el hidrolato inhibieron el crecimiento micelial cuatro veces más que el aceite esencial homeopático y tres veces más que el Tween 20 (Figura 11).

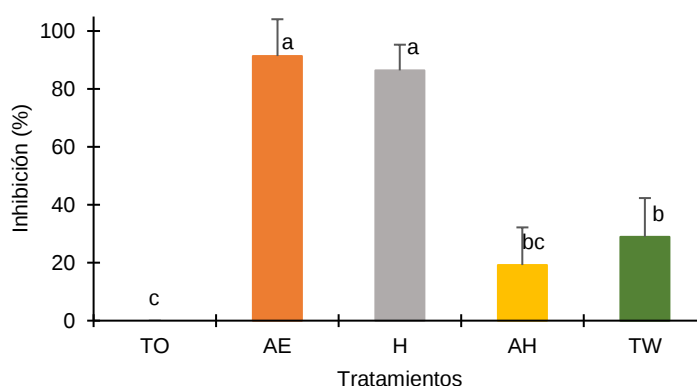


Figura 11. Inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* a los cinco días debido al efecto de los tratamientos aceite esencial 0.5 % (AE), hidrolato 100 % (H), aceite homeopático 6 CH (AH), Tween 20 0.1 % (TW) en comparación con el testigo (TO). Medias $\pm$ desviación estándar ($n=5$) con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

7.4.1.2 Evaluación en medio líquida NYDA

El crecimiento micelial observado en el medio líquido NYDA fue similar a la del medio PDA. El aceite esencial provocó el menor crecimiento de *B. cinerea* en los tiempos de evaluación 24 y 48 h ($p < 0.05$), mientras que, el hidrolato redujo el crecimiento del hongo en ambos tiempos, aunque las diferencias solo fueron significativas a las 24 h. El crecimiento micelial en los tratamientos aceite

homeopático y Tween 20 fue menor al del testigo, pero no hubo diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) (Figura 12).

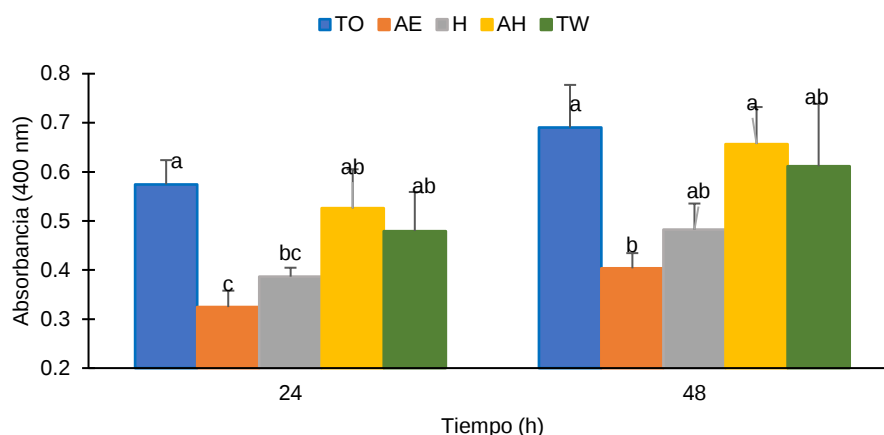


Figura 12. Crecimiento de *Botrytis cinerea* en medio líquido NYDA con los tratamientos de aceite esencial 0.5 % (AE), hidrolato 100 % (H), aceite homeopático 6 CH (AH) y Tween 20 0.1 % (TW) en comparación con el testigo (TO). Medias $\pm$ desviación estándar (n=5) con diferentes letras son estadísticamente diferentes ($p < 0.05$).

7.4.2 Secuenciación y mapeo

Se secuenciaron los RNA totales de los tratamientos hidrolato, aceite homeopático, Tween 20 y el testigo. Debido a la inhibición severa del hongo con el tratamiento aceite esencial (Figuras 11 y 12), no se pudo obtener RNA de suficiente cantidad y calidad para su secuenciación. El número total de las lecturas de las doce librerías fue de 293,555,820 y varió de 20,435,149 (TW3) a 31,220,838 (H2) con un promedio de 24,462,985 lecturas (Cuadro suplementario 1). Después del control de calidad, se conservaron 261,319,701 lecturas limpias, un máximo de 27,696,340 (H2) y un mínimo de 18,294,462 (TW3), con un promedio de 21,776,641 lecturas. Alrededor del 89 % de lecturas se conservaron (Cuadro suplementario 1).

El número total de lecturas limpias mapeadas sobre el genoma de referencia *Botrytis cinerea* B05.10. fue de 252,138,043 que representó 96.5 % del total de las lecturas limpias; y este porcentaje varió de 95 (H3) a 98.4 % (TO2).

Igualmente, el porcentaje de las lecturas mapeadas de manera única osciló entre 94.8 % (H3) y 98.1 % (TO2) (Cuadro suplementario 2).

7.4.3 Expresión diferencial de genes

El método Limma-Voom se utilizó para extraer los DEG ($|\log FC| > 1$ y p ajustado < 0.05) de las comparaciones entre los tres tratamientos y el testigo. El gráfico MDS mostró que los tres primeros ejes recopilaban la mayor parte de la variación de expresión de genes (86 %). El primer eje recogió el mayor porcentaje de la variación (58 %) y sobre el cual se separó el tratamiento hidrolato de los otros tres tratamientos, mientras que, sobre el eje 2 (23 %), se separó el tratamiento Tween 20 de los demás tratamientos (Figura 13). El tratamiento aceite homeopático no se diferenció del testigo (Figura 13).

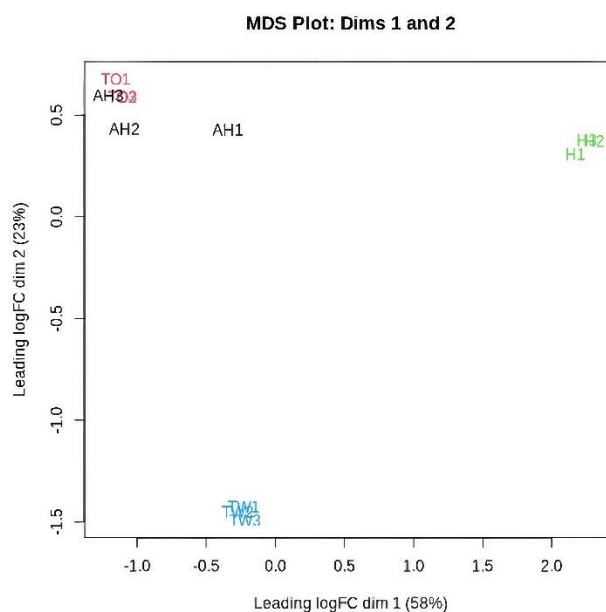


Figura 13. Gráfico MDS que muestra la variación de expresión de genes de *Botrytis cinerea* obtenida a partir de los datos RNA-seq a las 48 h en respuesta a los tratamientos hidrolato 100 % (H1, H2, H3), aceite homeopático 6 CH (AH1, AH2, AH3), Tween 20 0.1 % (TW1, TW2, TW3) y el testigo (TO1, TO2, TO3).

En la comparación hidrolato vs. testigo, se identificaron 1,662 DEG ($|\log FC| > 1$ y p ajustado < 0.05), de los cuales 1,314 fueron sub-expresados y 348 sobre-expresados. En la comparación Tween 20 vs. testigo, se encontraron 791 DEG,

de los cuales 456 fueron sub-expresados y 335 sobre-expresados. Sin embargo, en la comparación aceite esencial homeopático vs. testigo no se encontraron DEG ($|\log FC| > 1$ y p ajustado < 0.05) (Figura 14). Un total de 469 DEG fueron comunes entre el tratamiento hidrolato y el tratamiento Tween 20. Mientras que 1,193 y 322 DEG fueron únicos en el tratamiento hidrolato y Tween 20, respectivamente (Figura suplementaria 1).

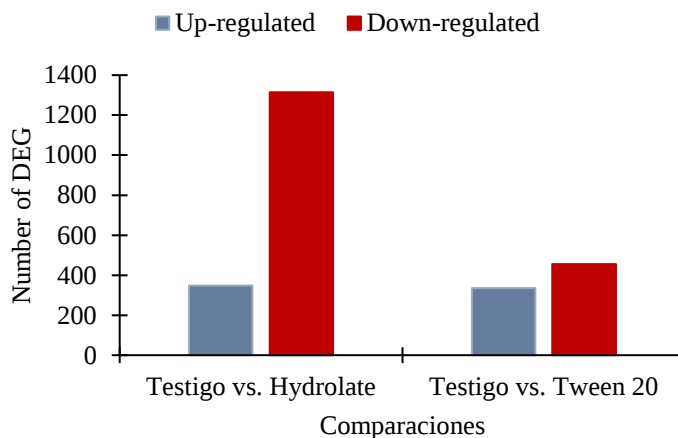


Figura 14. Número de genes diferencialmente expresados (DEG; $|\log FC| > 1$ y valor p ajustado < 0.05) en *Botrytis cinerea* debido al efecto del hidrolato y Tween 20 en comparación con el testigo.

7.4.4 Anotación de los genes diferencialmente expresados

7.4.4.1 Enriquecimiento de las rutas KEGG

Los 1,662 DEG extraídos de la comparación hidrolato vs. testigo permitieron el enriquecimiento de 3 rutas KEGG ($p < 0.05$), a saber: “degradación de valina, leucina e isoleucina”, “metabolismo del propanoato” y “metabolismo del azufre”. Para la ruta: “degradación de valina, leucina e isoleucina”, se encontraron trece genes, de los cuales solo el gen BCIN_01g09170 se sobre-expresó debido al hidrolato, mientras que, los genes BCIN_13g03020, BCIN_01g03020, BCIN_08g05100, BCIN_04g04810, BCIN_02g07690, BCIN_11g04250, BCIN_07g02750, BCIN_08g05050, BCIN_08g05040, BCIN_13g01430, BCIN_03g05840 y BCIN_02g06840 se sub-expresaron (Figura 15A). En la ruta “metabolismo de propanoato”, se encontraron nueve genes (BCIN_13g03020,

BCIN_15g05660, BCIN_01g03020, BCIN_11g04250, BCIN_03g05840, Bcpdh1, BCIN_04g03150, BCIN_13g01430, BCIN_07g03110), todos fueron sub-expresados debido al hidrolato (Figura 15B). En la ruta: “metabolismo del azufre”, se encontraron siete genes, de los cuales seis fueron sobre-expresados (Bcmet5, Bcmet3, BCIN_15g02880, Bcmet10, Bcmet16, Bcsox1) debido al hidrolato, en tanto que y el gen BCIN_12g05950 fue sub-expresado (Figura 15C).

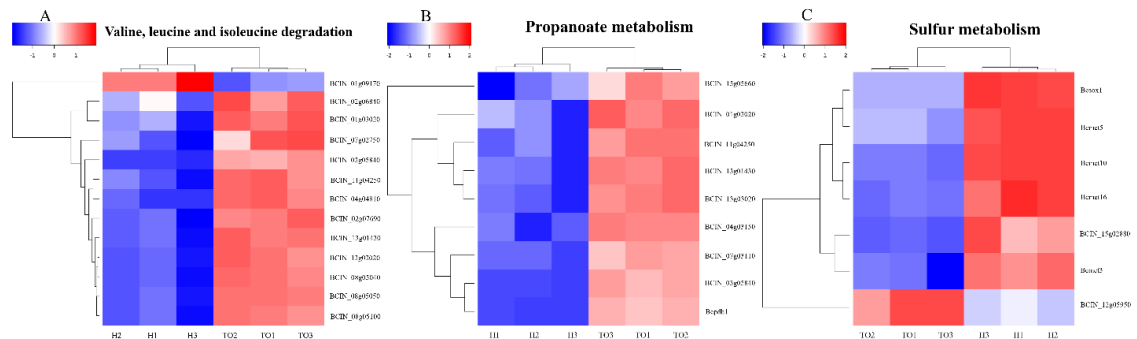


Figura 15. Mapas de calor del perfil de expresión de los genes relacionados con las rutas KEGG enriquecidas en *Botrytis cinerea* en respuesta al hidrolato 100 % (H1, H2, H3) en comparación con el testigo (TO1, TO2, TO3). A: degradación de valina, leucina e isoleucina, B: metabolismo del propanoato, C: metabolismo del azufre. Los mapas de calor fueron contruidos con base en la puntuación Z. El color rojo indica genes sobre-expresados y el color azul indica genes sub-expresados, la intensidad de los colores representa el nivel de expresión.

Los 791 DEG extraídos de la comparación Tween 20 vs. testigo permitieron el enriquecimiento de cinco rutas KEGG ($p < 0.05$): “peroxisoma”, “degradación de ácidos grasos”, “metabolismo de ácidos grasos”, “biosíntesis de ácidos grasos insaturados” y “metabolismo del glioxilato y del dicarboxilato”. Para la ruta: “biosíntesis de ácidos grasos insaturados”, los cuatro genes identificados (BCIN_14g02030, BCIN_03g03940, BCIN_04g06330, BCIN_13g00280) fueron sobre-expresados (Figura 16A). Para la ruta: “metabolismo de ácidos grasos”, se encontraron siete genes (BCIN_14g02030, BCIN_03g03940, Bcfaa2, BCIN_04g06330, BCIN_16g03180, BCIN_11g01810, BCIN_13g00280), todos se sobre-expresaron debido al tratamiento Tween 20 (Figura 16B). Para la ruta: “degradación de ácidos grasos”, se encontraron siete DEG; los genes BCIN_02g04910, BCIN_14g02030, Bcfaa2, BCIN_16g03900, BCIN_16g03180 y

BCIN_03g03940 se sobre-expresaron debido a Tween 20, mientras que el gen BCIN_01g02880 se sub-expresó (Figura 16C).

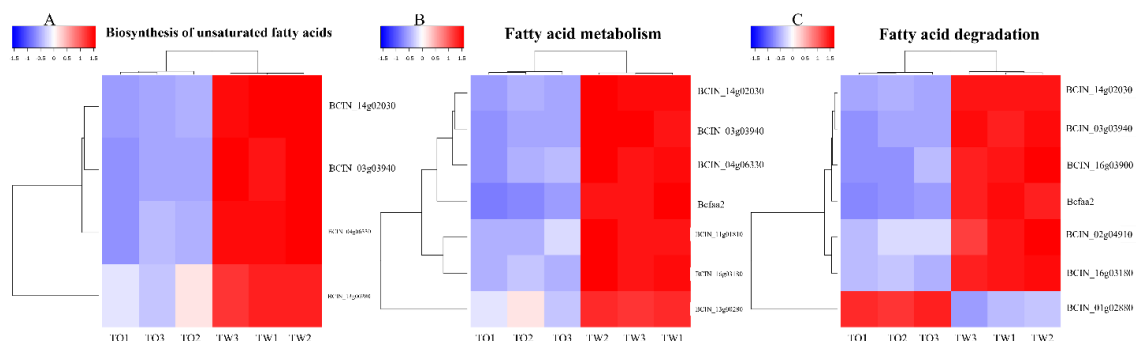


Figura 16. Mapas de calor del perfil de expresión de los genes relacionados con las rutas KEGG enriquecidas en *Botrytis cinerea* en respuesta a Tween 20 (TW1, TW2, TW3) en comparación con el testigo (TO1, TO2, TO3). A: biosíntesis de ácidos grasos insaturados, B: metabolismo de ácidos grasos, C: degradación de ácidos grasos. Los mapas de calor fueron contruidos con base en la puntuación Z. El color rojo indica genes sobre-expresados y el color azul indica genes sub-expresados, la intensidad de los colores representa el nivel de expresión.

Para la ruta: “metabolismo del glioxilato y del dicarboxilato”, se encontraron cinco genes, de los cuales dos (BCIN_09g01320 y BCIN_09g06110) se sobre-expresaron y tres (Bccat7, Bccat5 y Bcfdh1) se sub-expresaron debido al efecto de Tween 20 (Figura 17A). Para la ruta: “peroxisoma”, se encontraron 19 genes, 17 de ellos (BCIN_05g06540, BCIN_14g02960, BCIN_14g02030, BCIN_03g03940, Bcpex11, Bcsp19, Bcfaa2, BCIN_04g06330, BCIN_15g01560, BCIN_16g03900, Bcpex6, Bcpa1, BCIN_07g03000, BCIN_04g03710, Bcpex13, Bcpex10, Bcpex14) se sobre-expresaron con Tween 20 y solo dos genes (Bccat7, Bccat5) se sub-expresaron (Figura 17B).

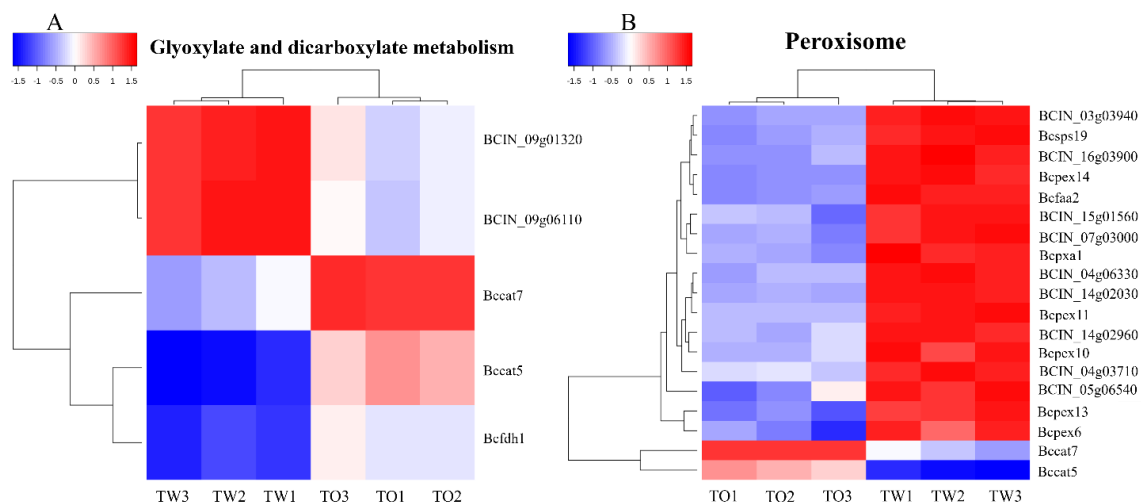


Figura 17. Mapas de calor del perfil de expresión de los genes relacionados con las rutas KEGG enriquecidas en *Botrytis cinerea* en respuesta a Tween 20 (TW1, TW2, TW3) en comparación con el testigo (TO1, TO2, TO3). A: metabolismo del glioxilato y dicarboxilato, B: peroxisoma. Los mapas de calor fueron construidos con base en la puntuación Z. El color rojo indica genes sobre-expresados y el color azul indica genes sub-expresados, la intensidad de los colores representa el nivel de expresión.

7.4.4.2 Análisis de ontología de genes

Los 1,662 DEG de la comparación hidrolato vs. testigo permitieron el enriquecimiento de 62 términos GO ($p < 0.05$). Para la categoría “función molecular” (FM), se enriquecieron 33 términos GO, los tres más significativos fueron “actividad oxireductasa”, “actividad catalítica” y “actividad monooxigenasa”. Para la categoría “proceso biológico” (PB), se enriquecieron 27 términos GO, los tres más significativos fueron el “transporte transmembrana”, “proceso metabólico de carbohidratos” y “proceso catabólico de carbohidratos”. Además, se enriquecieron otros términos relacionados con los carbohidratos como el “proceso catabólico de polisacáridos”, “proceso metabólico de polisacáridos” y “proceso metabólico de la maltosa”. Para la categoría “componente celular” (CC), se enriquecieron dos términos GO, estos fueron la “membrana” y “región extracelular” (Cuadro suplementario 3).

En la comparación Tween 20 vs. testigo, los 791 DEG permitieron el enriquecimiento de 77 términos GO. Para la categoría FM, se enriquecieron 23 términos GO, los tres más significativos fueron “actividad oxireductasa”,

“actividad catalítica” y “unión de hemo”. Para la categoría PB, 47 términos GO fueron enriquecidos, los más significativos fueron: “proceso metabólico de ácidos grasos”, “transporte de membrana peroxisomal” y “organización del peroxisoma”. También, se enriquecieron otros términos relacionados con “beta oxidación de ácidos grasos”, “oxidación de ácidos grasos”, “proceso catabólico de ácidos grasos” y “transporte de ácidos grasos”. Para la categoría CC, se enriquecieron siete términos GO, los tres más significativos fueron los “Microcuerpos”, “peroxisoma” y “membrana” (Cuadro suplementario 4).

Cabe mencionar que varios términos GO enriquecidos estuvieron relacionados con las rutas KEGG enriquecidas. Específicamente, los términos GO relacionados con el metabolismo y transporte de carbohidratos en la comparación hidrolato vs. testigo y los términos GO relacionados con metabolismo de ácidos grasos en la comparación Tween 20 vs. testigo. Además, se enriquecieron términos GO relacionados con la desintoxicación debido a los dos tratamientos hidrolato y Tween 20 que fueron “respuesta a sustancias tóxicas”, “respuesta celular a sustancias tóxicas”, “desintoxicación”, “desintoxicación celular” y “desintoxicación oxidativa celular” (Cuadros suplementario 2 y 3). Para la comparación hidrolato vs. testigo, se encontraron 13 DEG en estos cuatro términos GO, excepto en el término “desintoxicación oxidativa celular” donde se identificaron 12 genes (Figura 18A). Para el tratamiento Tween 20, se encontraron los mismos nueve DEG en los cinco términos GO relacionados con la desintoxicación (Figura 18B). Los genes Bccat6, Bcprd4, Bcprx9, Bcglr2, Bcgst8, Bcprx2 y Bcprd10 fueron identificados únicamente en el tratamiento hidrolato y los genes Bccat2, Bcgst12, Bccat5 y Bcprd11 fueron encontrados únicamente en el tratamiento Tween 20. Mientras que los genes Bccat7, BccatA, BcppoA90, Bcprd3 y Bcccp2 fueron comunes en ambos tratamientos (Figura 18 A y B). En cuanto a su expresión, los genes Bccat6, Bcccp2, Bcprd3 y Bcprx2 fueron sobre-expresados y los genes Bccat7, Bcprd4, Bcprx9, BcppoA90, BccatA, Bcglr2, Bcgst8, Bcprd10 resultaron sub-expresados en la comparación hidrolato vs. testigo. En la comparación Tween 20 vs. testigo, los genes Bccat2, Bcccp2, Bcprd3 y Bcgst12 fueron sobre-expresados y los genes Bccat5, Bccat7,

BccatA, BcppoA90, Bcprd11 fueron sub-expresados. En ambos tratamientos: hidrolato y Tween 20, los genes Bccat7, BcppoA90 y BccatA fueron sub-expresados mientras que el gen Bcccp2 fue sobre-expresado (Figura 18 A y B).

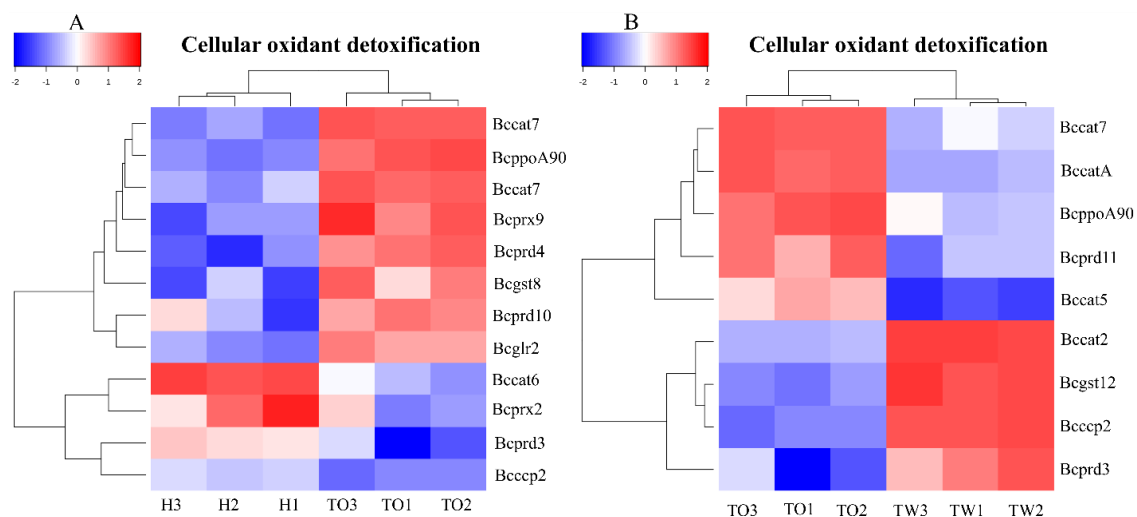


Figura 18. Mapas de calor del perfil de expresión de los genes relacionados con la “desintoxicación oxidativa celular” en *Botrytis cinerea* en respuesta al hidrolato (H1, H2, H3) y a Tween 20 (TW1, TW2, TW3) en comparación con el testigo (TO1, TO2, TO3). Los mapas de calor fueron construidos con base en la puntuación Z. El color rojo indica genes sobre-expresados y el color azul indica genes sub-expresados, la intensidad de los colores representa el nivel de expresión.

7.5 Discusión

Los aceites esenciales, los hidrolatos y algunas sustancias homeopáticas son insumos antifúngicos alternativos a los fungicidas químicos. Los aceites esenciales tienen usos más diversos, aunque, los hidrolatos y las sustancias homeopáticas aún se exploran para diversificar sus usos para controlar hongos. Aunque ya se ha estudiado el efecto de los aceites sobre los hongos mediante transcriptómica, no se ha encontrado información sobre el efecto de hidrolatos y de sustancias homeopáticas derivadas de aceites esenciales.

7.5.1.1 Inhibición *in vitro* de *B. cinerea*

En este experimento, se estudió a *Tagetes remotiflora*, una especie con abundantes compuestos químicos (Ruíz-González et al., 2024b-no publicado). De los tratamientos evaluados, aceite esencial, hidrolato, aceite homeopático y

Tween 20, el aceite esencial 0.5 % de *T. remotiflora* fue el más efectivo para controlar el crecimiento de *B. cinerea* en condiciones *in vitro*, lo cual coincide con resultados observados con los aceites de *T. tenuifolia* (2 µL) y *T. lemmonii* (1 %) (Christova et al., 2024; Larios-Palacios et al., 2020). En este estudio, el hidrolato al 100 % de *T. remotiflora* también redujo notablemente el crecimiento de *B. cinerea*. Asimismo, hidrolatos obtenidos de especies de *Tagetes* (*T. coronopifolia*, *T. minuta*, *T. parryi* y *T. terniflora*) así como hidrolatos de *Daucus carota* también inhibieron el crecimiento del hongo (Ruíz-González et al., 2024a; Zatlá et al., 2017).

Las cantidad, diversidad y abundancia de los compuestos presentes en los aceites y en los hidrolatos afectan de manera distinta los procesos de inhibición de hongos y bacterias (D'Amato et al., 2018; Nazzaro et al., 2017). El efecto inhibidor del aceite esencial se puede atribuir a los compuestos mayoritarios (trans-β-ocimeno, 2-careno, ciclohexeno, 1-metil-4-(1-metiletilideno)- y 5,7-octadien-4-ona, 2,6-dimetil-, (E)-) del aceite esencial de *T. remotiflora* (Ruíz-González et al., 2024b-no publicado). Los hidrolatos contienen trazas de aceites esenciales (D'Amato et al., 2018), por ello, se encuentran algunos compuestos comunes con los aceites esenciales, sin embargo, la abundancia es diferente y esto podría influir en la inhibición de los hongos (Ruíz-González et al., 2024a).

En el presente estudio, Tween 20 a 0.1 % redujo a un 28 % el crecimiento de *B. cinerea*. El efecto inhibidor de Tween 20 ya se ha observado en *Beauveria bassiana* (Mwamburi et al., 2015). Sin embargo, *Rhizopus oryzae* no se inhibió con una alta concentración (1.5 %) de Tween 20 (Wu et al., 2021). Esto indicó que los surfactantes no inhiben a todos los hongos, incluso pueden estimular el crecimiento y la germinación de conidios de *Beauveria bassiana* (Mwamburi et al., 2015). También, el tipo de surfactante influye en la respuesta de inhibición de los hongos (Li et al., 2016). Por ello, se recomienda el uso de bajas concentraciones (<0.2 %) o estandarizar concentraciones de acuerdo con el organismo.

El tratamiento de aceite homeopático 6 CH de *T. remotiflora* tuvo la menor inhibición (19 %) contra *B. cinerea*. Resultados diferentes se han mencionado en otros estudios; los homeopáticos 6 CH de *Eucalyptus citriodora* y *Cymbopogon citratus* inhibieron la germinación de conidios de *Alternaria solani* y *Corynespora cassiicola* de 26 a 34 % (Oliveira et al., 2017). También, los aceites homeopáticos de *Psidium cattleianum* (7 CH y 12 CH) redujeron la incidencia de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. en semillas de frijol (Rocha et al., 2019). Por ello, la evaluación de otras dinamizaciones (>6 CH) de *T. remotiflora* podrían aumentar la inhibición de *B. cinerea*.

7.5.1.2 Perfil transcriptómico de *B. cinerea* en respuesta al hidrolato y Tween 20

Para evaluar el efecto de los tratamientos hidrolato y Tween 20 a nivel molecular, se compararon los perfiles de expresión génica obtenidos de los datos RNA-seq a las 48 h. La cantidad de las secuencias limpias obtenidas en *B. cinerea* fue de 18,294,462 a 27,696,340 (promedio de 21,776,641, 89 % del total) y fue similar a la reportada por Li et al. (2020) donde obtuvieron de 22,130,161 a 31,530,791 de lecturas (promedio de 24,950,141) a partir de cultivos de *B. cinerea in vitro* de 72 h tratados con aceite esencial de *Melaleuca alternifolia* (Li et al., 2020). Similarmente, Haile et al. (2020) obtuvieron de 18,245,810 a 55,880,939 lecturas (promedio de 27,363,951) en muestras de frutos de *Vitis vinifera* inoculados con *B. cinerea* y recolectados después de cuatro semanas. Las variaciones entre las lecturas RNA-Seq, podría deberse a la cepa del hongo utilizada, al tiempo de muestreo, condiciones experimentales, estrategias de secuenciación y flujo de análisis bioinformático. Los resultados se relacionan directamente con el diseño, la ejecución y el análisis del experimento (Bruning et al., 2015).

En cuanto al mapeo realizado en este estudio, alrededor del 96.4 % de las lecturas limpias fueron mapeadas sobre el genoma de referencia *Botrytis cinerea* B05.10. En otros estudios, el mapeo sobre el mismo genoma ha sido de 67 a 78 % (Haile et al., 2020), mientras que Srivastava et al. (2020) mencionaron que el mapeo fue de 97 % en muestras obtenidas de *Solanum lycopersicum* infectado

por *B. cinerea*. Los datos de secuenciación y el mapeo obtenidos en este estudio indicaron la idoneidad de esta información para análisis posteriores.

En los DEG extraídos del hidrolato, se encontraron 1,662 DEG, de estos, 1,314 sub-expresados y 348 sobre-expresados. Li et al. (2020), en cultivos de *B. cinerea* tratados con aceite de *Melaleuca alternifolia*, identificaron 280 DEG, de los cuales 173 fueron sobre-expresados y 107 sub-expresados. Debido al efecto del aceite de *Perilla frutescens* contra *Aspergillus flavus*, se identificaron 5,914 DEG, 3,025 fueron sobre-expresados y 2,889 sub-expresados (Hu et al., 2021). En *Alternaria alternata*, se hallaron 1,334 DEG, 621 sobre-expresados y 713 sub-expresados en respuesta al citral (Wang et al., 2019). En *Sclerotinia sclerotiorum* tratado con aceite esencial de *Anethum graveolens* se identificaron 3,793 DEG, de los cuales 2,334 estaban sobre-expresados y 1,459 sub-expresados (Chen et al., 2022). Además de los factores experimentales y de análisis mencionados anteriormente, otro de los factores que podría influir en las diferencias entre los DEG es la diversidad de compuestos presentes en los aceites esenciales evaluados. Por ejemplo, el aceite de *Melaleuca alternifolia* contiene dos compuestos mayoritarios (1,8-cineol y terpinen-4-ol) (Li et al., 2020). Mientras que, el de *Perilla frutescens* contiene al menos 13 compuestos (Zeng et al., 2024) y en el trabajo de Wang et al. (2019) se utilizó solo un compuesto (citral). El aceite de semilla de eneldo contiene 26 compuestos (Chen et al., 2022). El aceite esencial de *T. remotiflora* evaluado en este estudio contiene 31 compuestos químicos (Ruíz-González et al., 2024b-no publicado).

Con respecto al efecto de Tween 20, se encontraron 791 DEG, 456 fueron sub-expresados y 335 sobre-expresados. En *Rhizopus oryzae* se identificaron 2,935 DEG, 1,094 sobre-expresados y 1,841 sub-expresados debido al efecto de la Trietanolamina (Wu et al., 2021). Los surfactantes pueden influir en la superficie de los hongos mediante el proceso de adsorción y cambiar sus características fisicoquímicas (Hamzah et al., 2018). Además, cada surfactante puede tener efectos diferentes en diferentes especies de hongos (Li et al., 2016).

7.5.1.3 Enriquecimiento de rutas KEGG debido al hidrolato

Los DEG debido al hidrolato permitieron el enriquecimiento de las rutas relacionados con el metabolismo de aminoácidos y carbohidratos. Específicamente, se activaron las rutas: “degradación de valina, leucina e isoleucina”, “metabolismo del azufre” y “metabolismo del propanoato”. El “metabolismo del azufre” también fue enriquecido con el aceite de *Melaleuca alternifolia* en *B. cinerea* (Li et al., 2020). En *Aspergillus flavus*, las rutas: “degradación de valina, leucina e isoleucina” y “metabolismo del azufre” se enriquecieron debido al aceite de *Perilla frutescens* (Hu et al., 2021). Las rutas: “degradación de valina, leucina e isoleucina” y “metabolismo del azufre” se enriquecieron debido al citral en *Alternaria alternata* (Wang et al., 2019).

Para la ruta: “degradación de valina, leucina e isoleucina”, hubo 12 genes sub-expresados debido al hidrolato. Los genes sub-expresados BCIN_13g03020, BCIN_01g03020, BCIN_08g05040, BCIN_08g05050, BCIN_13g01430, BCIN_11g04250 y el gen sobre-expresado BCIN_01g09170 afectaron el proceso catabólico de aminoácidos de cadena ramificada (valina, leucina e isoleucina). Estos aminoácidos son componentes importantes de las proteínas y precursores de los metabolitos secundarios de los hongos (Steyer y Todd, 2023). Los genes BCIN_08g05100, BCIN_07g02750, BCIN_04g04810, BCIN_02g07690 y BCIN_03g05840 estuvieron involucrados en la inhibición de la beta-oxidación de ácidos grasos (3-metilbut-2-enil-CoA). Este proceso (β -oxidación de ácidos grasos) es necesario para el desarrollo celular (Zhang et al., 2023). Los genes BCIN_07g02750 y BCIN_02g06840 inhibieron la síntesis de acetoacetil-CoA, un intermediario metabólico importante para la síntesis de ergosterol que es un componente de las membranas y es clave en la actividad contra los antifúngicos (Zhang et al., 2020).

La inhibición de la ruta “metabolismo de propanoato” se debió a la sub-expresión de nueve genes. Los genes BCIN_13g03020, BCIN_01g03020, BCIN_13g01430 y BCIN_11g04250 inhibieron la síntesis del propionil-CoA, mientras que el gen BCIN_04g03150 inhibió la síntesis del propanoato. Se ha reportado que el

bloqueo de la utilización del propionil-CoA o del propionato está relacionado con la inhibición de los hongos (Maerker et al., 2005). Los genes BCIN_01g03020 y BCIN_03g05840 inhibieron el acetil-CoA, una molécula esencial del metabolismo y su alta producción es un indicador del buen estado metabólico del organismo (Shi y Tu, 2015). Los genes Bcpdh1 y BCIN_07g03110 influyeron en la síntesis del metilisocitrato y propionil-CoA. Zhu et al. (2023) mencionan que la acumulación de intermediarios como el propionil-CoA y el metilisocitrato, que inhiben el complejo piruvato deshidrogenasa y la succinil-CoA sintetasa en el metabolismo primario, repercute en la inhibición de los hongos filamentosos.

En la ruta del “metabolismo del azufre”, se encontraron seis genes sobre-expresados y un gen sub-expresado debido al hidrolato. El único gen sub-expresado (BCIN_12g05950) estuvo involucrado en la oxidación de sulfuros mediante la quinona: oxidorreductasa. La afectación de este proceso podría generar la acumulación de sulfuro de hidrógeno que suele ser tóxico en el organismo (Landry et al., 2020). Los genes sobre-expresados, Bcmet5, Bcmet3 y BCIN_15g02880 participan en la biosíntesis de aminoácidos como la cisteína, este aminoácido azufrado forma parte de las proteínas y es precursor de varios metabolitos (Brzywczy et al., 2007). Los genes Bcmet3, Bcmet5 y Bcmet16 participan en la asimilación de sulfatos. Este proceso es esencial ya que la asimilación del sulfato es requerida para su incorporación a la cisteína y homocisteína (Traynor et al., 2019). Los genes Bcmet10 (actividad sulfito reductasa) y Bcsox1 (actividad oxidorreductasa) son importantes para la oxidación de sulfito a sulfato (Simon & Kroneck, 2013) y en la degradación o desintoxicación de contaminantes a través de la oxidación (Singh et al., 2021). La sobre-expresión de genes observada en *B. cinerea* podría deberse a que la disponibilidad del azufre es esencial para la defensa contra el estrés oxidativo y participa en varios procesos metabólicos en los hongos (Traynor et al., 2019).

7.5.1.4 Enriquecimiento de rutas KEGG debido a Tween 20

Los DEG en respuesta a Tween 20 enriquecieron cuatro rutas relacionadas con peroxisoma y ácidos grasos (“peroxisoma”, “degradación de ácidos grasos”,

“metabolismo de ácidos grasos”, “biosíntesis de ácidos grasos insaturados”) y una ruta de carbohidratos (“metabolismo del glioxilato y del dicarboxilato”). Con la aplicación de Trietanolamina, Wu et al. (2021) no encontraron las mismas rutas enriquecidas, sin embargo, reportaron la ruta “metabolismo de lípidos” que es afín al metabolismo de ácidos grasos. En este estudio, la mayoría de los genes encontrados en la ruta “peroxisoma” fueron sobre-expresados (BCIN_04g03710, BCIN_14g02030, BCIN_04g06330, BCIN_03g03940, Bcpxa1, Bcsps19, BCIN_14g02960, Bcfaa2, BCIN_16g03900) y actúan en la oxidación de ácidos grasos. Como se mencionó anteriormente, la β -oxidación de ácidos grasos es esencial para poder utilizar el acetil-CoA como fuente de carbono y energía para el crecimiento (Zhang et al., 2023). Los genes Bcpex6, BCIN_05g06540, Bcpex10, Bcpex13, Bcpex14 y Bcpex11 influyeron en las proteínas de membrana (PEX2, PEX6, PEX10, PEX11, PEX13, PEX14). Estas proteínas (peroxinas) son de importancia en el ensamblaje de la membrana y en la importación de proteínas de la matriz (Kato, 2019). Mientras que los dos genes sub-expresados (Bccat7 y Bccat5) son de respuesta al peróxido de hidrógeno. La sub-expresión de estos genes podría afectar compuestos celulares en el hongo (Qin et al., 2011).

La afectación del peroxisoma repercutió en la síntesis, oxidación y degradación de ácidos grasos (Zhang et al., 2023). Además, los peroxisomas son parte de las membranas de los hongos (Cassilly et al., 2016), necesarios para sostener la formación de cuerpos fructíferos, la maduración y germinación de esporas sexuales (Peraza-Reyes & Berteaux-Lecellier, 2013). En los hongos filamentosos, incluido *B. cinerea*, los peroxisomas son clave para la producción de metabolitos secundarios necesarios para su desarrollo y la patogénesis (Van Der Klei & Veenhuis, 2013).

En las rutas enriquecidas y relacionadas con ácidos grasos, en su mayoría fueron genes sobre-expresados involucrados en la β -oxidación de ácidos grasos, por ejemplo, en la ruta de la “degradación de ácidos grasos” se sobre-expresaron los genes BCIN_02g04910 y BCIN_16g03900. También, los genes BCIN_14g02030 y BCIN_03g03940 que permiten la β -oxidación de ácidos grasos fueron sobre-

expresados en las tres rutas (“degradación de ácidos grasos”, “metabolismo de ácidos grasos”, “biosíntesis de ácidos grasos insaturados”). Los genes Bcfaa2 y BCIN_16g03180 (“degradación de ácidos grasos”, “metabolismo de ácidos grasos”) actúan en la biosíntesis de ácidos grasos (The UniProt Consortium, 2022). Asimismo, los genes BCIN_04g06330 y BCIN_13g00280, comunes en las rutas del “metabolismo de ácidos grasos” y “biosíntesis de ácidos grasos insaturados”, se relacionaron con β -oxidación y ácidos grasos omega 6. Estos son constituyentes estructurales, forman parte de los lípidos y son compuestos de señalización en varias vías (Guimarães & Venâncio, 2022).

En cuanto a la ruta de “metabolismo del glioxilato y del dicarboxilato”, los genes sub-expresados Bccat7 y Bccat5 actúan en respuesta al peróxido de hidrogeno y el gen Bcfdh1 (sub-expresado) cataliza la oxidación dependiente de NAD del formiato a dióxido de carbono, que tiene un papel en la desintoxicación de formiato exógeno en organismos no metilotrofos (The UniProt Consortium, 2022). El gen BCIN_09g01320 (sobre-expresado) habilita la actividad de la enzima isocitrato liasa y el gen BCIN_09g06110 permite la actividad de la malato sintasa. Isocitrato liasa es una enzima del ciclo del glioxilato que convierte el isocitrato en succinato durante la derivación del glioxalato, lo que ayuda al crecimiento del organismo (Mishra et al., 2017), mientras que la malato sintasa es importante en la patogenicidad y virulencia de varios hongos (Zhao et al., 2013). El ciclo del glioxilato puede actuar en la defensa contra el estrés en las células fúngicas y en la patogénesis (Zeng et al., 2022). Además, *Candida glabrata* puede utilizar este ciclo como una vía metabólica alternativa del carbono (Chew et al., 2019).

7.5.1.5 Enriquecimiento de categorías GO debido al hidrolato y Tween 20

Como se describió anteriormente, el hidrolato y Tween 20 afectaron de manera distinta a *B. cinerea*. Para cada tratamiento, se enriquecieron varios términos GO relacionados con las rutas KEGG enriquecidas. La anotación funcional de los DEG del tratamiento hidrolato permitieron el enriquecimiento de 62 términos GO. Para la categoría “función molecular” (FM) se enriquecieron 33 términos GO, 27 para “proceso biológico” (PB) y 2 para “componente celular” (CC). En otra

investigación, donde se aplicaron aceites esenciales en *B. cinerea* se enriquecieron 42 términos GO, 15 para FM, 18 en PB y 13 en CC (Li et al., 2020). En otros hongos (*Alternaria alternata*, *Sclerotinia sclerotiorum* y *Aspergillus flavus*) tratados con aceites esenciales, se han enriquecido 40 términos GO, 12 para FM, 25 en PB y 3 en CC (Wang et al., 2019). Chen et al. (2022) mencionan el enriquecimiento de 56 términos GO, 19 para FM, 19 en PB y 18 en CC. Mientras que, Hu et al. (2021) indicaron el enriquecimiento de 34 términos GO, en cada categoría GO se enriquecieron 10 términos GO. Algunos términos GO enriquecidos en esta investigación fueron también enriquecidos en algunos estudios mencionados anteriormente. Por ejemplo, en la categoría FM se enriqueció la ruta “actividad catalítica” (Li et al., 2020; Wang et al., 2019) y “actividad oxireductasa” (Wang et al., 2019; Chen et al., 2022). Para la categoría PB también se afectan los términos GO “transporte transmembrana” (Chen et al., 2022), “proceso metabólico de carbohidratos” (Chen et al., 2022), “proceso catabólico de polisacáridos” y “proceso catabólico de carbohidratos” (Wang et al., 2019). Para la categoría CC, se enriquecieron las categorías “región extracelular” y “membrana” (Li et al., 2020).

Los DEG de Tween 20 enriquecieron 77 términos GO, de estos, 23 términos GO se enriquecieron para la categoría FM, 47 en PB y siete para la categoría CC. En respuesta a la Trietanolamina contra *R. oryzae* hubo enriquecimiento de 20 términos GO, de los cuales seis se enriquecieron para la categoría FM, seis en PB y ocho para la categoría CC (Wu et al., 2021). Ambos tratamientos (Tween 20 y trietanolamina) afectaron términos GO de “actividad catalítica” y “membrana”. Aunque Tween 20 afectó más procesos (77) en *B. cinerea*, esto podría deberse a que Tween 20 disuelve los lípidos de las membranas celulares y las hace permeables (Jamur & Oliver, 2009). Mientras que la Trietanolamina, además de su uso como surfactante, también es regulador de pH (Musiał & Kubis, 2004) y se ha comprobado que el pH es un factor determinante en el crecimiento de los hongos (Sasaki et al., 2005; Wang et al., 2018).

En ambos tratamientos (hidrolato y Tween 20), varios términos GO afines a la desintoxicación fueron enriquecidos. Todos los términos GO enriquecidos (“respuesta a sustancias tóxicas”, “respuesta celular a sustancias tóxicas”, “desintoxicación”, “desintoxicación celular” y “desintoxicación oxidativa celular”) se activan cuando el organismo está en contacto con sustancias tóxicas, por ello, desencadenan un proceso de transporte para alejar la sustancia tóxica fuera de áreas sensibles o para reducir o eliminar la toxicidad de los radicales superóxido o peróxido de hidrógeno (Embl-Ebi, 2024). En este estudio, debido al hidrolato, los genes que permiten la actividad peroxidasa y catalasa fueron sub-expresados (Bcprd10, BcppoA90, Bcprd4, Bcprx9 y Bccat7) y también hubo genes sobre-expresados (Bcprd3, Bcccp2 y Bccat6). Estas enzimas son oxidorreductasas que actúan frente a las especies reactivas de oxígeno presentes dentro de las células (Poljovka et al., 2023). El gen Bcprx2, sobre-expresado en *B. cinerea*, permite la actividad de la tiorredoxina peroxidasa y se ha demostrado que la tiorredoxina peroxidasa es útil para la desintoxicación (Mir et al., 2015). Asimismo, las enzimas glutatión transferasa y glutatión reductasa son fundamentales para la desintoxicación y eliminación de radicales libres (Allocati et al., 2018). En el presente estudio, los genes Bcgst8 (glutatión transferasa) y Bcglr2 (glutatión reductasa) fueron sub-expresados debido al hidrolato. También el gen BccatA, que cataliza la degradación del peróxido de hidrógeno, fue sub-expresado. En respuesta al Tween 20, también genes de actividad peroxidasa fueron sub-expresados (Bcprd11 y BcppoA90) y sobre- expresados (Bcprd3 y Bcccp2). Asimismo, hubo un gen sub-expresado (Bccat7) y otro sobre-expresado (Bcprd3), ambos de actividad catalasa. Al igual que en el tratamiento hidrolato, los genes que ayudan en la degradación del peróxido de hidrógeno fueron sub-expresados (BccatA y Bccat5). La mayoría de los organismos ejercen dos mecanismos para la desintoxicación; el primero es el uso de vacuolas (Li et al., 2023) y el segundo se basa en modificaciones químicas (inactivación, hidrólisis, oxidación o conjugación) (Priyanka & Dwivedi, 2023). Por ejemplo, *Beauveria bassiana* utiliza vesículas únicas para dirigir a los compuestos tóxicos hacia vacuolas desintoxicantes (Li et al., 2023). Otros hongos, realizan la

desintoxicación directa de compuestos tóxicos a través de la catálisis y modificación enzimática (Westrick et al., 2021).

Los resultados obtenidos, mostraron que los hidrolatos son insumos con potencial de aprovechamiento contra *B. cinerea*, su evaluación *in vivo* será la siguiente etapa para confirmar su efectividad y fomentar su aplicación en plantas afectadas por el moho gris. El mismo surfactante puede ajustarse para inhibir al hongo o podría utilizarse como coadyuvante adherente en la aplicación del hidrolato.

7.6 Conclusiones

En condiciones de laboratorio, el hidrolato y el aceite esencial de *T. remotiflora* son más efectivos para controlar a *B. cinerea* que el Tween 20 y el aceite homeopático. A nivel molecular, *B. cinerea* presenta una respuesta génica diferente frente al hidrolato y Tween 20. El hidrolato detuvo el crecimiento micelial de *B. cinerea* mediante la afectación de rutas relacionadas con los aminoácidos y carbohidratos. Mientras que Tween 20 afectó el peroxisoma y metabolismo de ácidos grasos. Aunque el hidrolato y Tween 20 afectaron funciones relacionadas con la desintoxicación, el perfil génico fue distinto para cada tratamiento. El hidrolato podría utilizarse como insumo antifúngico seguro contra *B. cinerea* una vez que se verifique su efecto *in vivo*.

7.7 Literatura citada

- Allocati, N., Masulli, M., Di Ilio, C., & Federici, L. (2018). Glutathione transferases: substrates, inhibitors and pro-drugs in cancer and neurodegenerative diseases. *Oncogenesis*, 7(1), 8. <https://doi.org/10.1038/s41389-017-0025-3>
- Almeida, H. H. S., Crugeira, P. J. L., Amaral, J. S., Rodrigues, A. E., & Barreiro, M. (2024). Disclosing the potential of *Cupressus leylandii* A.B. Jacks & Dallim, *Eucalyptus globulus* Labill., *Aloysia citrodora* Paláu, and *Melissa officinalis* L. hydrosols as eco-friendly antimicrobial agents. *Natural Products and Bioprospecting*, 14, Article 1. <https://doi.org/10.1007/s13659-023-00417-9>

- Bellavite, P., & Betti, L. (2021). Homeopathy and the science of high dilutions: when to believe the unbelievable. *International Journal of High Dilution Research*, 11(40), 107-109. <https://doi.org/10.51910/ijhdr.v11i40.614>
- Bruning, O., Rauwerda, H., Dekker, R. J., De Leeuw, W. C., Wackers, P. F. K., Ensink, W. A., Jonker, M. J., & Breit, T. M. (2015). Valuable lessons-learned in transcriptomics experimentation. *Transcription*, 6(3), 51-55. <https://doi.org/10.1080/21541264.2015.1064195>
- Brzywczy, J., Natorff, R., Sieńko, M., & Paszewski, A. (2007). Multiple fungal enzymes possess cysteine synthase activity in vitro. *Research In Microbiology*, 158(5), 428-436. <https://doi.org/10.1016/j.resmic.2007.03.002>
- Bu, D., Luo, H., Huo, P., Wang, Z., Zhang, S., He, Z., Wu, Y., Zhao, L., Liu, J., Guo, J., Fang, S., Cao, W., Yi, L., Zhao, Y., & Kong, L. (2021). KOBAS-intelligent prioritization and exploratory visualization of biological functions for gene enrichment analysis. *Nucleic Acids Research*, 49(W1), W317-W325. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab447>
- Cano, M., Darghan, A., & Cuervo, J. (2023). Temporal distribution of *Botrytis cinerea* and its relationship to the production of strawberries (*Fragaria × ananassa* Duch., Monterrey variety) subjected to biological treatments with microbial antagonists. *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 17(1), Article. e15284. <https://doi.org/10.17584/rcch.2023v17i1.15284>
- Cassilly, C. D., Maddox, M. M., Cherian, P. T., Bowling, J. J., Hamann, M. T., Lee, R. E., & Reynolds, T. B. (2016). SB-224289 antagonizes the antifungal mechanism of the marine depsipeptide papuamide A. *PLoS ONE*, 11(5), Article e0154932. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0154932>
- Chen, Y., Li, W., Zeng, H., Zhou, G., & Cai, Q. (2022). Transcriptome analysis reveals the mechanism of dill seed essential oil against *Sclerotinia sclerotiorum*. *Natural Product Communications*, 17(8). <https://doi.org/10.1177/1934578x221119910>

- Chew, S. Y., Chee, W. J. Y., & Than, L. T. L. (2019). The glyoxylate cycle and alternative carbon metabolism as metabolic adaptation strategies of *Candida glabrata*: perspectives from *Candida albicans* and *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Biomedical Science*, 26(1), Article 52. <https://doi.org/10.1186/s12929-019-0546-5>
- Christova, P. K., Dobрева, A. M., Dzhurmanski, A. G., Dincheva, I. N., Dimkova, S. D., & Zapryanova, N. G. (2024). The impact of plant essential oils on the growth of the pathogens *Botrytis cinerea*, *Fusarium solani*, and *Phytophthora pseudocryptogea*. *Life*, 14(7), Article 817. <https://doi.org/10.3390/life14070817>
- D'Amato, S., Serio, A., López, C. C., & Paparella, A. (2018). Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. *Food Control*, 86, 126-137. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.030>
- Dai, X., & Shen, L. (2022). Advances and trends in omics technology development. *Frontiers in Medicine*, 9, Article 911861. <https://doi.org/10.3389/fmed.2022.911861>
- De, A., Das, D., Dutta, S., Chakraborty, D., Boujedaini, N., & Khuda-Bukhsh, A. R. (2012). Potentized homeopathic drug Arsenicum Album 30C inhibits intracellular reactive oxygen species generation and up-regulates expression of arsenic resistance gene in arsenite-exposed bacteria *Escherichia coli*. *Zhongxiyi Jiehe Xuebao*, 10(2), 210-227. <https://doi.org/10.3736/jcim20120212>
- Dean, R. A., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., Rudd, J. J., Dickman, M. B., Kahmann, R., Ellis, J., & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 13(4), 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Embl-Ebi. (2024, october 16). QuickGO. <https://www.ebi.ac.uk/QuickGO/term/GO:0098754>

- Fokkema, N. J. (1973). The role of saprophytic fungi in antagonism against *Dreschlera sorokiniana* (*Helminthosporium sativum*) on agar plates and rye leaves with pollen. *Physiological Plant Pathology*, 3(2), 195-202. [https://doi.org/10.1016/0048-4059\(73\)90082-9](https://doi.org/10.1016/0048-4059(73)90082-9)
- Gikas, G. D., Parlakidis, P., Mavropoulos, T., & Vryzas, Z. (2022). Particularities of fungicides and factors affecting their fate and removal efficacy: a review. *Sustainability*, 14(7), Article 4056. <https://doi.org/10.3390/su14074056>
- Gorjian, H., Mihankhah, P., & Khaligh, N. G. (2022). Influence of tween nature and type on physicochemical properties and stability of spearmint essential oil (*Mentha spicata* L.) stabilized with basil seed mucilage nanoemulsion. *Journal of Molecular Liquids*, 359, Article 119379. <https://doi.org/10.1016/j.molliq.2022.119379>
- Guimarães, A., & Venâncio, A. (2022). The potential of fatty acids and their derivatives as antifungal agents: a review. *Toxins*, 14(3), 188. <https://doi.org/10.3390/toxins14030188>
- Haile, Z. M., Malacarne, G., Pilati, S., Sonogo, P., Moretto, M., Masuero, D., Vrhovsek, U., Engelen, K., Baraldi, E., & Moser, C. (2020). Dual transcriptome and metabolic analysis of *Vitis vinifera* cv. Pinot Noir berry and *Botrytis cinerea* during quiescence and egressed infection. *Frontiers in Plant Science*, 10, Article 1704. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.01704>
- Hamzah, N., Singhal, N., Padhye, L., & Swift, S. (2018). Effect of surfactants on *Aspergillus brasiliensis* ATCC 16404 physicochemical properties. *Journal of Environmental Chemical Engineering*, 6(2), 3392-3398. <https://doi.org/10.1016/j.jece.2018.04.068>
- Haq, I. U., Rahim, K., Yahya, G., Ijaz, B., Maryam, S., & Paker, N. P. (2024). Eco-smart biocontrol strategies utilizing potent microbes for sustainable management of phytopathogenic diseases. *Biotechnology Reports*, 44, Article e00859. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2024.e00859>

- Hazra, A., Ghosh, S., Naskar, S., Rahaman, P., Roy, C., Kundu, A., Chaudhuri, R. K., & Chakraborti, D. (2023). Global transcriptome analysis reveals fungal disease responsive core gene regulatory landscape in tea. *Scientific Reports*, 13(1), Article 17186. <https://doi.org/10.1038/s41598-023-44163-x>
- Hu, W., Li, C., Dai, J., Cui, H., & Lin, L. (2019). Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Industrial Crops and Products*, 130, 34-41. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.078>
- Hu, Z., Yuan, K., Zhou, Q., Lu, C., Du, L., & Liu, F. (2021). Mechanism of antifungal activity of *Perilla frutescens* essential oil against *Aspergillus flavus* by transcriptomic analysis. *Food Control*, 123, Article 107703. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2020.107703>
- Jackson-Davis, A., White, S., Kassama, L. S., Coleman, S., Shaw, A., Mendonca, A., Cooper, B., Thomas-Popo, E., Gordon, K., & London, L. (2022). A review of regulatory standards and advances in essential oils as antimicrobials in foods. *Journal of Food Protection*, 86(2), Article 100025. <https://doi.org/10.1016/j.jfp.2022.100025>
- Jamur, M. C., & Oliver, C. (2009). Permeabilization of cell membranes. *Methods in Molecular Biology*, 588, 63-66. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-324-0_9
- Kato, H. (2019). Peroxisomes: Biogenesis, function, and role in human disease. In T. Imanaka, & N. Shimozawa (eds), *Structure biology of peroxisomal proteins, peroxins* (pp. 221-248). Springer, Singapore. https://doi.org/10.1007/978-981-15-1169-1_10
- Kolberg, L., Raudvere, U., Kuzmin, I., Adler, P., Vilo, J., & Peterson, H. (2023). g:Profiler-interoperable web service for functional enrichment analysis and gene identifier mapping (2023 update). *Nucleic Acids Research*, 51(W1), W207-W212. <https://doi.org/10.1093/nar/gkad347>

- Kuroyanagi, T., Bulasag, A. S., Fukushima, K., Ashida, A., Suzuki, T., Tanaka, A., Camagna, M., Sato, I., Chiba, S., Ojika, M., & Takemoto, D. (2022). *Botrytis cinerea* identifies host plants via the recognition of antifungal capsidiol to induce expression of a specific detoxification gene. *PNAS Nexus*, 1(5), Article pgac274. <https://doi.org/10.1093/pnasnexus/pgac274>
- Landry, A. P., Ballou, D. P., & Banerjee, R. (2020). Hydrogen sulfide oxidation by sulfide quinone oxidoreductase. *ChemBioChem*, 22(6), 949-960. <https://doi.org/10.1002/cbic.202000661>
- Larios-Palacios, O. E., López-Vázquez, É. Y., Rodríguez, A. C., De Jesús Ruíz-Espinoza, F., Solano-Vidal, R., & Serrato-Cruz, M. Á. (2020). Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(3), 593-606. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.2077>
- Li, R., ZiWei, Z., Chao, Y., YouPin, X., PeiHua, L., Min, H., Jing, W., XueWei, C., & WeiTao, L. (2016). Effects of Tween-20 and Tween-80 on germination of *Magnaporthe oryzae* spores. *Southwest China Journal of Agricultural Sciences*, 29(10), 2379-2382. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/full/10.5555/20173004402#:~:text=The%20germination%20of%20M.,the%20surfactant%20of%20spore%20suspension>.
- Li, Y., Ren, H., Wang, F., Chen, J., Ma, L., Chen, Y., Li, X., Fan, Y., Jin, D., Hou, L., Zhou, Y., Keyhani, N. O., & Pei, Y. (2023). Cell detoxification of secondary metabolites by P4-ATPase-mediated vesicle transport. *eLife*, 12, Article e79179. <https://doi.org/10.7554/elife.79179>
- Li, Z., Shao, X., Wei, Y., Dai, K., Xu, J., Xu, F., & Wang, H. (2020). Transcriptome analysis of *Botrytis cinerea* in response to tea tree oil and its two characteristic components. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 104(5), 2163-2178. <https://doi.org/10.1007/s00253-020-10382-9>
- Liu, Y., & Wu, J. (2012). Effects of Tween 80 and pH on mycelial pellets and exopolysaccharide production in liquid culture of a medicinal fungus.

- Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology*, 39(4), 623-628.
<https://doi.org/10.1007/s10295-011-1066-9>
- Maerker, C., Rohde, M., Brakhage, A. A., & Brock, M. (2005). Methylcitrate synthase from *Aspergillus fumigatus*. *FEBS Journal*, 272(14), 3615-3630.
<https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2005.04784.x>
- Mir, A. A., Park, S., Sadat, M. A., Kim, S., Choi, J., Jeon, J., & Lee, Y. (2015). Systematic characterization of the peroxidase gene family provides new insights into fungal pathogenicity in *Magnaporthe oryzae*. *Scientific Reports*, 5(1), Article 11831. <https://doi.org/10.1038/srep11831>
- Mishra, S. K., Tripathi, G., Kishore, N., Singh, R. K., Singh, A., & Tiwari, V. K. (2017). Drug development against tuberculosis: Impact of alkaloids. *European Journal of Medicinal Chemistry*, 137, 504-544.
<https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2017.06.005>
- Moreno, N. M. (2017). Agrohomeopatía como alternativa a los agroquímicos. *Revista Médica de Homeopatía*, 10(1), 9-13.
<https://doi.org/10.1016/j.homeo.2017.04.004>
- Musiał, W., & Kubis, A. (2004). Effect of some anionic polymers on pH of triethanolamine aqueous solutions. *Polimery w Medycynie*, 34(2), 21-29.
<https://europepmc.org/abstract/MED/15497608>
- Mwamburi, L. A., Laing, M., & Miller, R. (2015). Effect of surfactants and temperature on germination and vegetative growth of *Beauveria bassiana*. *Brazilian Journal of Microbiology*, 46(1), 67-74.
<https://doi.org/10.1590/s1517-838246120131077>
- Nazzaro, F., Fratianni, F., Coppola, R., & De Feo, V. (2017). Essential oils and antifungal activity. *Pharmaceuticals*, 10(4), Article 86.
<https://doi.org/10.3390/ph10040086>
- Oliveira, J. S. B., Schwan-Estrada, K. R. F., Bonato, C. M., & De T P G Carneiro, S. M. (2017). Homeopathy with essential oils in the germination of spores

- and induction of phytoalexins. *Revista Ciência Agronômica*, 48.
<https://doi.org/10.5935/1806-6690.20170024>
- Peraza-Reyes, L., & Berteaux-Lecellier, V. (2013). Peroxisomes and sexual development in fungi. *Frontiers in Physiology*, 4, Article 244.
<https://doi.org/10.3389/fphys.2013.00244>
- Poljovka, A., Musil, M., Bednář, D., Chovanová, K., Bauerová-Hlinková, V., Bellová, J., Kohútová, L., Baráth, P., & Zámocký, M. (2023). Comparison of fungal thermophilic and mesophilic catalase–peroxidases for their antioxidative properties. *Antioxidants*, 12(7), Article 1382.
<https://doi.org/10.3390/antiox12071382>
- Qin, G., Liu, J., Cao, B., Li, B., & Tian, S. (2011). Hydrogen peroxide acts on sensitive mitochondrial proteins to induce death of a fungal pathogen revealed by proteomic analysis. *PLoS ONE*, 6(7), Article e21945.
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0021945>
- Rocha, C. H., Agostinetto, L., Boff, P., Silmara, W. S., Soldi, C., & Carissimi, B. M. I. (2019). Óleo essencial de *Psidium cattleyanum* no controle de fitopatógenos em sementes de feijão. *Revista Verde*, 15(1), 14-19.
<https://doi.org/10.18378/rvads.v15i1.7365>
- Ruíz-González, M. Á., Serrato-Cruz, M. Á., Valadez-Moctezuma, E., & Solano-Vidal, R. (2024b). Destilados y aceite homeopático de *Tagetes remotiflora*: efecto en *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 0(0). En revisión
- Ruíz-González, M. Á., Serrato-Cruz, M. Á., Valadez-Moctezuma, E., & Solano-Vidal, R. (2024a). Chemical composition of *Tagetes* hydrolates and *in vitro* and *in vivo* evaluation against disease associated fungi in strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 42(3), Article 26. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.2401-5>
- Salehi, B., Valussi, M., Morais-Braga, M. F. B., Carneiro, J. N. P., Leal, A. L. A. B., Coutinho, H. D. M., Vitalini, S., Kręgiel, D., Antolak, H., Sharifi-Rad, M.,

- Silva, N. C. C., 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*, 23(11), Article 2847. <https://doi.org/10.3390/molecules23112847>
- SAS OnDemand for Academics. (2024, October 15). SAS. https://www.sas.com/en_us/software/on-demand-for-academics.html
- Sasaki, F., Miyamoto, T., Tamai, Y., & Yajima, T. (2005). Optimum temperature and pH for mycelial growth of *Cordyceps nutans* Pat. (Ascomycetes). *International Journal of Medicinal Mushrooms*, 7(1-2), 301-304. <https://doi.org/10.1615/intjmedmushr.v7.i12.270>
- Şesan, T. E., Enache, E., Iacomi, B. M., Oprea, M., Oancea, F., & Iacomi, C. (2015). Antifungal activity of some plant extracts against *Botrytis cinerea* Pers. in the blackcurrant crop (*Ribes nigrum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 14(1), 29-43. <https://www.cabidigitallibrary.org/doi/pdf/10.5555/20153159976>
- Shafie, M. H., Kamal, M. L., Razak, N. A. A., Hasan, S., Uyup, N. H., Rashid, N. F. A., & Zafarina, Z. (2022). Antioxidant and Antimicrobial Activity of Plant Hydrosol and Its Potential Application in Cosmeceutical Products. *Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products*, 17(4), Article e12401. <https://doi.org/10.5812/jjnpp-124018>
- Shao, W., Zhao, Y., & Ma, Z. (2020). Advances in understanding fungicide resistance in *Botrytis cinerea* in China. *Phytopathology*, 111(3), 455-463. <https://doi.org/10.1094/phyto-07-20-0313-ia>
- Shen, X., Chen, W., Zheng, Y., Lei, X., Tang, M., Wang, H., & Song, F. (2017). Chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of hydrosols from different parts of *Areca catechu* L. and *Cocos nucifera* L. *Industrial Crops and Products*, 96, 110-119. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.11.053>

- Shi, L., & Tu, B. P. (2015). Acetyl-CoA and the regulation of metabolism: mechanisms and consequences. *Current Opinion in Cell Biology*, 33, 125-131. <https://doi.org/10.1016/j.ceb.2015.02.003>
- Simon, J., & Kroneck, P. M. (2013). Advances in microbial physiology. In R. K. Poole (Ed.), *Microbial sulfite respiration* (pp. 45-117). <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-410515-7.00002-0>
- Singh, S. K., Singh, M. K., Singh, V. K., Modi, A., Jaiswal, P., Rashmi, K., & Kumar, A. (2021). Microbe mediated remediation of environmental contaminants. In A. Kumar, V. K. Singh, P. Singh, & M. V. Kumar (Eds.), *Microbial enzymes and their exploitation in remediation of environmental contaminants* (pp. 59-71). Elsevier Inc. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-821199-1.00006-7>
- Srivastava, D. A., Arya, G. C., Pandaranayaka, E. P., Manasherova, E., Prusky, D. B., Elad, Y., Frenkel, O., & Harel, A. (2020). Transcriptome profiling data of *Botrytis cinerea* infection on whole plant *Solanum lycopersicum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 33(9), 1103-1107. <https://doi.org/10.1094/mpmi-05-20-0109-a>
- Steyer, J. T., & Todd, R. B. (2023). Branched-chain amino acid biosynthesis in fungi. *Essays in Biochemistry*, 67(5), 865-876. <https://doi.org/10.1042/ebc20230003>
- The UniProt Consortium. (2022). UniProt: the universal protein knowledgebase in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D523-D531. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1052>
- Traynor, A. M., Sheridan, K. J., Jones, G. W., Calera, J. A., & Doyle, S. (2019). Involvement of sulfur in the biosynthesis of essential metabolites in pathogenic fungi of animals, particularly *Aspergillus* spp.: Molecular and therapeutic implications. *Frontiers in Microbiology*, 10, Article 2859. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.02859>

- Van Der Klei, I. J., & Veenhuis, M. (2013). The versatility of peroxisome function in filamentous fungi. *Sub-cellular Biochemistry/Subcellular Biochemistry*, 69, 135-152. https://doi.org/10.1007/978-94-007-6889-5_8
- Van Kan, J. A. L., Stassen, J. H. M., Mosbach, A., Van Der Lee, T. A. J., Faino, L., Farmer, A. D., Papasotiriou, D. G., Zhou, S., Seidl, M. F., Cottam, E., Edel, D., Hahn, M., Schwartz, D. C., Dietrich, R. A., Widdison, S., & Scalliet, G. (2016). A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 18(1), 75-89. <https://doi.org/10.1111/mpp.12384>
- Wang, H., Li, L., Cai, B., Cai, L., Chen, X., Yu, Z., & Zhang, C. (2018). Metabolic phenotype characterization of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Frontiers in Microbiology*, 9, Article 470. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.00470>
- Wang, L., Jiang, N., Wang, D., & Wang, M. (2019). Effects of essential oil citral on the growth, mycotoxin biosynthesis and transcriptomic profile of *Alternaria alternata*. *Toxins*, 11(10), Article 553. <https://doi.org/10.3390/toxins11100553>
- Westrick, N. M., Smith, D. L., & Kabbage, M. (2021). Disarming the host: detoxification of plant defense compounds during fungal necrotrophy. *Frontiers in Plant Science*, 12, Article. 651716. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.651716>
- Wu, N., Zhang, J., Ou, W., Chen, Y., Wang, R., Li, K., Sun, X., Li, Y., Xu, Q., & Huang, H. (2021). Transcriptome analysis of *Rhizopus oryzae* seed pellet formation using triethanolamine. *Biotechnology for Biofuels*, 14, Article 230. <https://doi.org/10.1186/s13068-021-02081-y>
- Yuan, T., Hua, Y., Zhang, D., Yang, C., Lai, Y., Li, M., Ding, S., Li, S., & Chen, Y. (2024). Efficacy and antifungal mechanism of rosemary essential oil against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Forests*, 15(2), Article 377. <https://doi.org/10.3390/f15020377>

- Zatla, A. T., Dib, M. E. A., Djabou, N., Ilias, F., Costa, J., & Muselli, A. (2017). Antifungal activities of essential oils and hydrosol extracts of *Daucus carota* subsp. *sativus* for the control of fungal pathogens, in particular gray rot of strawberry during storage. *The Journal of Essential Oil Research*, 29(5), 391-399. <https://doi.org/10.1080/10412905.2017.1322008>
- Zeng, N., Zhang, N., Ma, X., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, D., Pu, F., & Li, B. (2022). Transcriptomics Integrated with metabolomics: assessing the central metabolism of different cells after cell differentiation in *Aureobasidium pullulans* NG. *Journal of Fungi*, 8(8), Article 882. <https://doi.org/10.3390/jof8080882>
- Zeng, Q., Wang, L., Long, S., Dong, W., Li, Y., Chen, Y., & Zhou, G. (2024). Inhibitory effects and mechanisms of *Perilla* essential oil and perillaldehyde against chestnut pathogen *Botryosphaeria dothidea*. *Journal of Fungi*, 10(8), Article 526. <https://doi.org/10.3390/jof10080526>
- Zhang, T., Wang, X., Li, X., Li, Y., Li, Y., Wu, S., Xu, L., Zhou, R., Yang, J., Li, G., Liu, X., Zheng, X., Zhang, Z., & Zhang, H. (2023). MoLrp1-mediated signaling induces nuclear accumulation of MoMsn2 to facilitate fatty acid oxidation for infectious growth of the rice blast fungus. *Plant Communications*, 4(4), Article 100561. <https://doi.org/10.1016/j.xplc.2023.100561>
- Zhang, Y., Wei, W., Fan, J., Jin, C., Lu, L., & Fang, W. (2020). *Aspergillus fumigatus* mitochondrial Acetyl Coenzyme A acetyltransferase as an antifungal target. *Applied and Environmental Microbiology*, 86(7), Article e02986-19.. <https://doi.org/10.1128/aem.02986-19>
- Zhao, X., Wang, Y., Zhao, Y., Huang, Y., Zhang, K., & Yang, J. (2013). Malate synthase gene AoMls in the nematode-trapping fungus *Arthrobotrys oligospora* contributes to conidiation, trap formation, and pathogenicity. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 98(6), 2555-2563. <https://doi.org/10.1007/s00253-013-5432-6>

Zhu, C., Tang, Y., Ren, D., Ren, W., Xue, Y., Suthaparan, A., Li, J., Wang, Y., Xu, L., & Zhu, P. (2023). Propionate poses antivirulence activity against *Botrytis cinerea* via regulating its metabolism, infection cushion development and overall pathogenic factors. *Food Chemistry*, 410, Article 135443. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2023.135443>

CAPÍTULO VIII: DISCUSIÓN GENERAL

La reducción del crecimiento micelial en respuesta al aceite esencial e hidrolatos de las plantas de *Tagetes* estudiadas, que fueron pocas en relación con las disponibles en México, sugiere la exploración de otras especies de *Tagetes*. Los compuestos químicos encontrados en las especies evaluadas fueron mayormente monoterpenos que afectan la viabilidad de los conidios, la membrana plasmática, la membrana mitocondrial y el aumento de especies reactivas de oxígeno (Martínez et al., 2022; Pedroso et al., 2024; Zeng et al., 2022).

Considerando que el uso de fungicidas químicos en los próximos años se incrementará (Thind, 2021), el intercambio de conocimientos directamente con productores podría ser una opción para alternar aplicaciones de insumos derivados de plantas y evitaría la generación de resistencia en más organismos (Olita et al., 2024), porque las mutaciones en diferentes genes diana o mutaciones asociadas con la sobreexpresión de transportadores de eflujo han causado resistencia en varios hongos (Reis et al., 2021; Sofianos et al., 2023).

Aunque el aceite esencial inhibió notablemente a los fitopatógenos, una limitante son los bajos rendimientos de este insumo (0.87 mL kg^{-1} hasta 1.6 mL kg^{-1}). Por el contrario, el volumen de hidrolato obtenido es superior, en una hidrodestilación de 45 min con 1 kg de tejido fresco se obtuvo alrededor de 600-800 mL de hidrolato. Esto ofrece una oportunidad para hacer más rentable su extracción y aplicación, puesto que, todo el material sometido a hidrodestilación puede tener un uso. Una vertiente importante será someter estas plantas a manejo agronómico, con la finalidad de no disminuir las poblaciones naturales de este recurso vegetal. Esto ayudará en la conservación de las especies y también podría mejorar el rendimiento y calidad del aceite esencial (Kumar et al., 2021).

La situación de los bajos rendimientos ha sido una limitante para la elaboración de insumos antifúngicos para su distribución, hasta la fecha, son pocos los productos derivados de plantas con distribución y alcance para los productores. Comúnmente se pueden encontrar extractos de Neem, de canela, chile, ajo, cebolla, uno de *Tagetes* y otros (AGRODAV, 2024). La aplicación de estos extractos, así como de distintos aceites esenciales son principalmente antibacterianos e insecticidas (Catani et al., 2022). Los estudios de aceites esenciales de *Tagetes* contra hongos, solo se han realizado *in vitro* (Larios-Palacios et al., 2020).

Los antecedentes con los aceites esenciales e hidrolatos indican que estos insumos son una alternativa que podría repercutir favorablemente en la producción agrícola y en la calidad de los productos, además, su aplicación no tiene efectos tóxicos ni contaminantes (Zulu et al., 2023). Sin embargo, su uso en la agricultura convencional aún no se garantiza. Esto indica que su uso podría ser local y en la agricultura orgánica (Rawat, 2021). También, su aplicación abarca otras áreas como la medicina y la industria alimentaria (Pezantes-Orellana et al., 2024). El efecto protector que mostró el aceite esencial de *T. linifolia* en los frutos de fresa es importante para explorar futuras aplicaciones en la conservación de otros alimentos, aunque los aditivos sintéticos son el principal método para extender la vida útil de los alimentos, la creciente preocupación debido a los efectos secundarios causados por los insumos sintéticos ha promovido la utilización de aceites esenciales (Inobeme & Adetunji, 2024).

No obstante, que los aceites esenciales homeopáticos de *T. remotiflora* mostraron baja inhibición en *B. cinerea*, son sustancias de bajo costo y de fácil preparación, por lo que convendrá su exploración con otras especies; además, son insumos seguros para los agricultores y sin repercusiones al ambiente (Di Lorenzo et al., 2021). Aún es un campo emergente, por lo que las futuras investigaciones serán útiles para demostrar su efectividad en la agricultura (Meneses, 2017).

Con el análisis transcriptómico realizado con *B. cinerea* se confirmó que el aceite esencial causó daños severos en el material genético del hongo. Mientras que, el hidrolato afectó rutas relacionadas con la síntesis de aminoácidos y carbohidratos. Las vías metabólicas son objetivos importantes para el desarrollo de nuevos insumos antifúngicos, por ejemplo, el metabolismo del azufre (Amich, 2022), el metabolismo de los nutrientes (Chen et al., 2020), el metabolismo de la trehalosa, los aminoácidos y las proteínas mitocondriales (Parente-Rocha et al., 2017). También, se buscan nuevos insumos que puedan interferir con las bombas de eflujo y las proteínas de choque térmico 90 (Ivanov et al., 2022).

8.1 Literatura citada

- AGRODAV. (05 de noviembre, 2024). Agro.
<https://agrodavmx.mercadoshops.com.mx/>
- Amich, J. (2022). Sulfur Metabolism as a promising source of new antifungal targets. *Journal of Fungi*, 8(3), Article 295.
<https://doi.org/10.3390/jof8030295>
- Catani, L., Grassi, E., Di Montanara, A. C., Guidi, L., Sandulli, R., Manachini, B., & Semprucci, F. (2022). Essential oils and their applications in agriculture and agricultural products: A literature analysis through VOSviewer. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 45, Article 102502.
<https://doi.org/10.1016/j.bcab.2022.102502>
- Chen, X., Zhang, Z., Chen, Z., Li, Y., Su, S., & Sun, S. (2020). Potential antifungal targets based on glucose metabolism pathways of *Candida albicans*. *Frontiers In Microbiology*, 11, Article 296.
<https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.00296>
- Di Lorenzo, F., Dinelli, G., Marotti, I., & Trebbi, G. (2021). Systemic Agro-Homeopathy: A new approach to agriculture. *OBM Integrative and Complementary Medicine*, 06(03), Article 020.
<https://doi.org/10.21926/obm.icm.2103020>

- Inobeme, A., & Adetunji, C. O. (2024). Application of essential oils in the food industry. In C. O. Adetunji, & J. Sharifi-Rad (Eds.), *Application of essential oils in the food industry* (pp. 1-8). Elsevier eBooks. <https://doi.org/10.1016/b978-0-323-98340-2.00001-8>
- Ivanov, M., Ćirić, A., & Stojković, D. (2022). Emerging antifungal targets and strategies. *International Journal of Molecular Sciences*, 23(5), Article 2756. <https://doi.org/10.3390/ijms23052756>
- Kumar, D., Punetha, A., Verma, P. P., & Padalia, R. (2021). Micronutrient based approach to increase yield and quality of essential oil in aromatic crops. *Journal of Applied Research on Medicinal and Aromatic Plants*, 26, Article 100361. <https://doi.org/10.1016/j.jarmap.2021.100361>
- Martínez, O. I. C., Ortiz, A. A., & Patiño, G. S. (2022). Mechanism of antifungal action of monoterpene isoespintanol against clinical isolates of *Candida tropicalis*. *Molecules*, 27(18), Article 5808. <https://doi.org/10.3390/molecules27185808>
- Meneses. M. N. (2017). Agrohhomeopatía como alternativa a los agroquímicos. *Revista Médica de Homeopatía*, 10(1), 9-13. <https://doi.org/10.1016/j.homeo.2017.04.004>
- Larios-Palacios, O. E., López-Vázquez, E. Y., Curiel, R. A., Ruíz-Espinoza, F. J., Solano-Vidal, R., & Serrato-Cruz, M. A. 2020. Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(3), 593-606. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.2077>.
- Olita, T., Stankovic, M., Sung, B., Jones, M., & Gibberd, M. (2024). Growers' perceptions and attitudes towards fungicide resistance extension services. *Scientific Reports*, 14(1), Article 6821. <https://doi.org/10.1038/s41598-024-57530-z>
- Parente-Rocha, J. A., Bailão, A. M., Amaral, A. C., Taborda, C. P., Paccez, J. D., Borges, C. L., & Pereira, M. (2017). Antifungal resistance, metabolic routes as drug targets, and new antifungal agents: an overview about endemic

- dimorphic fungi. *Mediators of Inflammation*, 2017, Article 9870679. <https://doi.org/10.1155/2017/9870679>
- Pedroso, M. B., Scariot, F. J., Rocha, R. K. M., Echeverrigaray, S., & Delamare, A. P. L. (2024). Antifungal activity and mechanism of action of monoterpenes against *Botrytis cinerea*. *Ciência e Agrotecnologia*, 48, Article e018823. <https://doi.org/10.1590/1413-7054202448018823>
- Pezantes-Orellana, C., Bermúdez, F. G., De la Cruz, C. M., Montalvo, J. L., & Orellana-Manzano, A. (2024). Essential oils: a systematic review on revolutionizing health, nutrition, and omics for optimal well-being. *Frontiers in Medicine*, 11, Article 1337785. <https://doi.org/10.3389/fmed.2024.1337785>
- Rawat, D. (2021). Essential oils in organic agriculture: A review of practices and potential. *Natural Volatiles & Essential Oils*, 8(2) Article 182-189. <https://doi.org/10.53555/nveo.v8i2.5624>
- Reis, E. M., Guerra, W. D., Reis, A. C., Zanatta, M., Carmona, M., & Sautura, F. (2021). Fungi resistance to multissite fungicides. *Journal of Agricultural Science*, 13(11), Article 141. <https://doi.org/10.5539/jas.v13n11p141>
- Sofianos, G., Samaras, A., & Karaoglanidis, G. (2023). Multiple and multidrug resistance in *Botrytis cinerea*: molecular mechanisms of MLR/MDR strains in Greece and effects of co-existence of different resistance mechanisms on fungicide sensitivity. *Frontiers in Plant Science*, 14, Article 1273193. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1273193>
- Thind, T. S. (2021). Changing trends in discovery of new fungicides: a perspective. *Indian Phytopathology*, 74(4), 875-883. <https://doi.org/10.1007/s42360-021-00411-6>
- Zeng, N., Zhang, N., Ma, X., Wang, Y., Zhang, Y., Wang, D., Pu, F., & Li, B. (2022). Transcriptomics integrated with metabolomics: assessing the central metabolism of different cells after cell differentiation in

Aureobasidium pullulans NG. *Journal of Fungi*, 8(8), Article 882.
<https://doi.org/10.3390/jof8080882>

Zulu, L., Gao, H., Zhu, Y., Wu, H., Xie, Y., Liu, X., Yao, H., & Rao, Q. (2023). Antifungal effects of seven plant essential oils against *Penicillium digitatum*. *Chemical and Biological Technologies in Agriculture*, 10(1), Article 82. <https://doi.org/10.1186/s40538-023-00434-3>

CAPÍTULO IX: CONCLUSIONES GENERALES

Los aceites esenciales de las especies de *Tagetes* consideradas fueron efectivos para inhibir *in vitro* el crecimiento micelial, la esporulación y germinación de conidios de *B. cinerea*.

Los aceites esenciales se pueden aplicar en frutos con problemas asociados con *B. cinerea*.

El hidrolato de *T. parry* fue efectivo como tratamiento preventivo contra *B. cinerea* en plantas de fresa.

El aceite esencial homeopático no fue efectivo para el control de los hongos evaluados.

En análisis transcriptómico confirmó los efectos a nivel de genes y reveló que el hidrolato y Tween 20 afectan rutas específicas.

Aunque los aceites esenciales de las especies evaluadas fueron funcionales contra algunos hongos, un aspecto que limitaría su uso son los bajos rendimientos del aceite esencial. De las especies evaluadas (*T. lucida*, *T. remotiflora* y *T. linifolia*) se requerirían entre 500-650 kg de tejido seco para obtener al menos 1 L de aceite esencial, aspecto que no favorece el aprovechamiento de las poblaciones vegetales en su hábitat. Por ello, lo conveniente sería establecer estas especies en cultivo convencional para su aprovechamiento sustentable.

El rendimiento del hidrolato es superior, de los mismos 500-650 kg de tejido seco de estas especies (*T. lucida*, *T. remotiflora* y *T. linifolia*) se obtendrían de 300 a 390 L de hidrolato. Un aspecto importante para la continuidad del aprovechamiento de este insumo, los futuros estudios deberían extenderse a otros organismos patógenos o buscar futuras aplicaciones en otras áreas.

Varias especies de *Tagetes* son herbáceas o perennes, por lo que será otro aspecto importante para considerar al momento del aprovechamiento de estas especies.

En ambos casos, sería conveniente evaluar la viabilidad financiera del proceso de hidrodestilación, porque durante este proceso se utiliza consumo de energía eléctrica o material de combustión (“leña”).

Estas situaciones permiten sugerir que los aceites esenciales y los hidrolatos tendrían una aplicación local.

Tanto los aceites esenciales como los hidrolatos no tienen efectos nocivos en la salud del humano y tampoco son contaminantes. Situación que permite orientar nueva investigación con la finalidad de buscar alternativas para obtener una mayor producción de aceite en la planta.

CAPÍTULO X: MATERIAL SUPLEMENTARIO

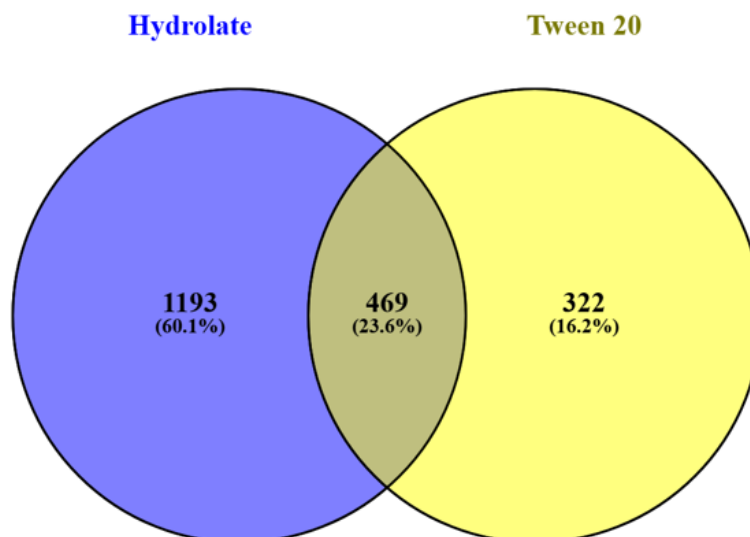


Figura suplementaria 1. DEG comunes y únicos en los tratamientos hidrolato y Tween 20.

Cuadro suplementario 1. Total de lecturas de entrada y lecturas limpias después del control de calidad y mapeo sobre el genoma de referencia.

Tratamientos	Lecturas de entrada	Lecturas limpias		
H1 (Hidrolato)	31220838	27667808		
H2	31056992	27696340		
H3	22392936	19991928		
AH1 (Aceite homeopático)	22670309	20166204		
AH2	21550509	19353032		
AH3	24723667	22117959		
TW1 (Tween 20)	26279979	23381475		
TW2	26124443	23090161		
TW3	20435149	18294462		
TO1 (Testigo)	20829474	18596383		
TO2	23631075	21137838		
TO3	22640449	19826111		
Datos de mapeo				
Tratamientos	Mapeados de forma única	%	Mapeados en múltiples loci	%
H1	26472879	95.7	64840	0.2
H2	26569354	95.9	63464	0.2
H3	18953353	94.8	45638	0.2
AH1	19428387	96.3	51916	0.3
AH2	18630831	96.3	47127	0.2
AH3	21223881	96	59097	0.3
TW1	22409824	95.8	56939	0.2

TW2	22406381	97	55860	0.2
TW3	17650695	96.5	46765	0.2
TO1	18153922	97.6	47871	0.3
TO2	20743642	98.1	54747	0.3
TO3	18834316	95	54388	0.3

Fuente: elaboración propia

Cuadro suplementario 2. Rutas KEGG y términos GO enriquecidos debido al hidrolato.

Rutas KEGG enriquecidas				
Nombre	ID	Total (genes)	Valor <i>p</i>	ID genes
Valine, leucine and isoleucine degradation	bfu 002 80	13	0.001	BCIN_13g03020, BCIN_01g03020, BCIN_08g05100, BCIN_04g04810, BCIN_02g07690, BCIN_11g04250, BCIN_07g02750, BCIN_08g05050, BCIN_01g09170, BCIN_08g05040, BCIN_13g01430, BCIN_03g05840, BCIN_02g06840
Propanoate metabolism	bfu 006 40	9	0.005	BCIN_13g03020, BCIN_15g05660, BCIN_01g03020, BCIN_11g04250, BCIN_03g05840, BCIN_09g01930, BCIN_04g03150, BCIN_13g01430, BCIN_07g03110
Sulfur metabolism	bfu 009 20	7	0.014	BCIN_12g03740, BCIN_12g05950, BCIN_01g04340, BCIN_15g02880, BCIN_13g03450, BCIN_01g04230, BCIN_07g04460
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	bfu 006 30	8	0.052	BCIN_16g04640, BCIN_09g06110, BCIN_09g04400, BCIN_06g05360, BCIN_04g01320, BCIN_09g01320, BCIN_09g00660, BCIN_05g06430
Término GO enriquecido: Función molecular				
Nombre	ID	Valor <i>p</i>	Genes (total)	ID genes
Oxidoreductase activity	GO:0016 491	1.56E- 33	260	BCIN_07g00010, BCIN_08g04910, BCIN_12g02050, BCIN_16g03870, BCIN_04g02250 BCIN_07g00010, BCIN_08g04910, BCIN_02g03630,
Catalytic activity	GO:0003 824	1.44E- 17	615	BCIN_13g00710, BCIN_12g06460 BCIN_02g01260,
Monooxygenase activity	GO:0004 497	9.76E- 09	58	BCIN_12g04970, BCIN_02g00460,

				BCIN_08g05200, BCIN_05g07090 BCIN_03g08920, BCIN_02g03630, BCIN_13g00710, BCIN_07g02220, BCIN_13g02720
Transporter activity	GO:0005 215	0.0002 27643	129	
Término GO enriquecido: Proceso biológico				
Nombre	ID	Valor <i>p</i>	Genes (total)	ID genes
Transmembrane transport	GO:0055 085	6.23E- 12	133	BCIN_03g08920, BCIN_02g03630, BCIN_13g00710, BCIN_07g02220, BCIN_13g02720 BCIN_05g01520, BCIN_14g00480, BCIN_03g02970, BCIN_09g02070, BCIN_05g08240 BCIN_14g00480, BCIN_09g02070, BCIN_06g04840, BCIN_14g01690, BCIN_15g05260, BCIN_14g05510 BCIN_14g00480, BCIN_06g04840, BCIN_14g01690, BCIN_14g05510, BCIN_04g00030, BCIN_03g03830 BCIN_14g01030, BCIN_09g04400, BCIN_05g04580, BCIN_05g00590, BCIN_10g01030, BCIN_07g05810 BCIN_14g01030, BCIN_09g04400, BCIN_05g04580, BCIN_05g00590 BCIN_14g01030, BCIN_09g04400, BCIN_05g04580, BCIN_05g00590, BCIN_10g01030, BCIN_07g05810 BCIN_09g04400, BCIN_05g04580, BCIN_05g00590,
Carbohydrate metabolic process	GO:0005 975	4.02E- 11	84	
Carbohydrate catabolic process	GO:0016 052	1.60E- 08	43	
Polysaccharide catabolic process	GO:0000 272	8.11E- 08	34	
Cellular response to toxic substance	GO:0097 237	0.0205 243	13	
Cellular detoxification	GO:1990 748	0.0205 243	13	
Response to toxic substance	GO:0009 636	0.0256 514	13	
Cellular oxidant detoxification	GO:0098 869	0.0256 514	12	

				BCIN_10g01030, BCIN_07g05810, BCIN_04g05000 BCIN_14g01030, BCIN_09g04400, BCIN_05g04580, BCIN_05g00590
Detoxification	GO:0098 754	0.0256 514	13	
Término GO enriquecido: Componente celular				
Nombre	ID	Valor <i>p</i>	Genes (total)	ID genes
				BCIN_03g08920, BCIN_10g04970, BCIN_02g03630, BCIN_13g00710, BCIN_04g06040 BCIN_01g05020, BCIN_15g03150, BCIN_05g08240, BCIN_14g05390, BCIN_14g01690, BCIN_15g04670
Membrane	GO:0016 020	1.03E- 34	448	
Extracellular region	GO:0005 576	4.60E- 07	38	

Fuente: elaboración propia

Cuadro suplementario 3. Rutas KEGG y términos GO enriquecidos debido al Tween 20.

Rutas KEGG enriquecidas				
Nombre	ID	Total (genes)	Valor <i>p</i>	ID genes
				BCIN_05g06540, BCIN_14g02960, BCIN_14g02030, BCIN_03g03940, BCIN_13g02740, BCIN_09g04400, BCIN_01g07920 BCIN_02g04910, BCIN_14g02030, BCIN_01g02880, BCIN_04g00760 BCIN_14g02030, BCIN_03g03940, BCIN_04g00760, BCIN_04g06330 BCIN_14g02030, BCIN_03g03940, BCIN_04g06330, BCIN_13g00280
Peroxisome	bfu04146	19	4.16E-09	
Fatty acid degradation	bfu00071	7	0.000520 382	
Fatty acid metabolism	bfu01212	7	0.005515 121	
Biosynthesis of unsaturated fatty acids	bfu01040	4	0.015562 22	

				BCIN_09g04400, BCIN_09g01320, BCIN_09g06110,
Glyoxylate and dicarboxylate metabolism	bfu00630	5	0.042868 613	BCIN_03g01920, BCIN_16g04640
Fatty acid biosynthesis	bfu00061	2	0.172880 489	BCIN_11g01810, BCIN_04g00760 BCIN_05g03750,
Carbon metabolism	bfu01200	8	0.232534 463	BCIN_16g04640, BCIN_14g02030 BCIN_16g03180,
Valine, leucine and isoleucine degradation	bfu00280	3	0.346337 835	BCIN_02g06840, BCIN_03g03940
Pyruvate metabolism	bfu00620	2	0.515332 489	BCIN_09g06110, BCIN_16g03120
Sulfur metabolism	bfu00920	1	0.647847 172	BCIN_12g05950
Propanoate metabolism	bfu00640	1	0.728781 022	BCIN_14g02030

Término GO enriquecido: Función molecular

Nombre	ID	Valor p	Genes (total)	ID genes
Oxidoreductase activity				BCIN_03g04860, BCIN_02g05870, BCIN_15g05110, BCIN_07g04130, BCIN_01g11030, BCIN_08g00010
Catalytic activity	GO:001649 1	2.59E- 22	142	BCIN_03g04860, BCIN_03g03940, BCIN_02g05870, BCIN_15g05110, BCIN_07g04130
Heme binding	GO:000382 4	4.47E- 10	304	BCIN_08g00010, BCIN_11g06450, BCIN_07g05810, BCIN_01g11010, BCIN_14g01530, BCIN_01g11020
Monooxygenas e activity	GO:002003 7	2.14302 E-06	33	BCIN_03g04860, BCIN_15g05110, BCIN_08g00010, BCIN_01g11010, BCIN_02g00460, BCIN_12g06380, BCIN_14g04970
Peroxidase activity	GO:000449 7	9.38115 E-05	30	BCIN_11g06450, BCIN_07g05810, BCIN_10g02270, BCIN_03g01920
	GO:000460 1	0.00411 9768	9	

Término GO enriquecido: Proceso biológico

Nombre	ID	Valor <i>p</i>	Genes (total)	ID genes
Fatty acid metabolic process	GO:0006631	9.4071E-06	15	BCIN_07g04130, BCIN_01g11030, BCIN_14g02030, BCIN_01g07920, BCIN_01g00060, BCIN_14g01290 BCIN_04g00760,
Peroxisomal membrane transport	GO:0015919	1.2704E-05	7	BCIN_04g02410, BCIN_11g00350, BCIN_05g05280 BCIN_13g02740,
Peroxisome organization	GO:0007031	1.2704E-05	10	BCIN_10g03590, BCIN_04g02410, BCIN_11g00350 BCIN_04g00760,
Peroxisomal transport	GO:0043574	1.2704E-05	7	BCIN_04g02410, BCIN_11g00350, BCIN_05g05280 BCIN_07g04130,
Fatty acid beta-oxidation	GO:0006635	2.7882E-05	5	BCIN_14g02030, BCIN_10g03590, BCIN_14g02960, BCIN_04g00760 BCIN_10g03590,
Transmembrane transport	GO:0055085	2.7882E-05	62	BCIN_16g03420, BCIN_14g04480, BCIN_04g00760, BCIN_04g05130, BCIN_15g05620 BCIN_07g04130,
Fatty acid oxidation	GO:0019395	2.7882E-05	5	BCIN_14g02030, BCIN_10g03590, BCIN_14g02960, BCIN_04g00760 BCIN_07g04130,
Lipid oxidation	GO:0034440	0.00053466	5	BCIN_14g02030, BCIN_10g03590, BCIN_14g02960, BCIN_04g00760 BCIN_11g06450,
Cellular oxidant detoxification	GO:0098869	0.00270128	9	BCIN_07g05810, BCIN_10g02270, BCIN_03g01920, BCIN_09g04400, BCIN_06g01180 BCIN_11g06450,
Cellular response to toxic substance	GO:0097237	0.00441853	9	BCIN_07g05810, BCIN_10g02270, BCIN_03g01920

Cellular detoxification	GO:199074 8	0.00441 853	9	BCIN_11g06450, BCIN_07g05810, BCIN_10g02270, BCIN_03g01920 BCIN_11g06450, BCIN_07g05810, BCIN_10g02270, BCIN_03g01920 BCIN_11g06450, BCIN_07g05810, BCIN_10g02270, BCIN_03g01920 BCIN_07g04130, BCIN_14g02030, BCIN_10g03590, BCIN_14g02960, BCIN_04g00760, BCIN_05g05750
Detoxification	GO:009875 4	0.00578 269	9	
Response to toxic substance	GO:000963 6	0.00578 269	9	
Lipid modification	GO:003025 8	0.02231 847	6	
Término GO enriquecido: Componente celular				
Nombre	ID	Valor <i>p</i>	Genes (total)	ID genes
Microbody	GO:0042579	3.60E-11	18	BCIN_07g04130, BCIN_13g02740, BCIN_14g02030, BCIN_10g03590, BCIN_14g02960 BCIN_07g04130, BCIN_13g02740, BCIN_14g02030, BCIN_10g03590, BCIN_14g02960 BCIN_03g03940, BCIN_13g02740, BCIN_08g00010, BCIN_10g03590, BCIN_01g10250, BCIN_16g03420 BCIN_13g02740, BCIN_10g03590, BCIN_04g02410, BCIN_11g00350, BCIN_05g05280 BCIN_13g02740, BCIN_10g03590, BCIN_04g02410, BCIN_11g00350, BCIN_05g05280 BCIN_05g05740, BCIN_03g07720, BCIN_11g04150,
Peroxisome	GO:0005777	3.60E-11	18	
Membrane	GO:0016020	2.89E-09	193	
Microbody membrane	GO:0031903	7.408E-06	9	
Peroxisomal membrane	GO:0005778	7.408E-06	9	
Nucleolus	GO:0005730	0.0005 978	21	

				BCIN_11g01570, BCIN_05g07440 BCIN_05g05740, BCIN_11g04150, BCIN_01g09800, BCIN_04g01690, BCIN_01g05400
Preribosome	GO:0030684	0.0053 976	11	

Fuente: elaboración propia

Nota: para descargar la información en archivo de Excel puede acceder al siguiente link:

https://drive.google.com/drive/folders/132ofm0lkkFF86EgIEfYMRAPrbSeR_GI3?usp=drive_link