



**UNIVERSIDAD MICHOACANA DE SAN
NICOLÁS DE HIDALGO**



**PROGRAMA INSTITUCIONAL
DE MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ÁREA TEMÁTICA: BIOTECNOLOGÍA ALIMENTARIA
FACULTAD DE QUÍMICO FARMACOBIOLOGÍA**

**PROPIEDAD ANTIFÚNGICA DE COMPUESTOS VOLÁTILES DE
TRES PLANTAS MEDICINALES (NURITE, SANTA MARÍA Y
TORONJIL) SOBRE HONGOS PATÓGENOS DE FRESA**

TESIS

Que presenta:

BIOL. RODOLFO FULGENCIO NEGRETE

Para obtener el grado de

MAESTRO EN CIENCIAS

Asesor de Tesis

D.C. RAFAEL SALGADO GARCIGLIA

Morelia, Michoacán, México

Agosto 2013

DEDICATORIA

A mí Mamá:

Celerina Negrete Avila

Te dedico este trabajo por creer en mí, por sacarme adelante dándome ejemplos dignos de superación y entrega, porque en gran parte gracias a ti hoy puedo ver alcanzada mi meta, ya que siempre estuviste impulsándome en los momentos más difíciles, por toda la fortaleza que necesitaste para sacarnos adelante a mis hermanas y a mí y porque el orgullo que sientes por mí fue lo que me hizo llegar hasta el final.

A Violetita

Por estar ahí siempre para aplacar mis miedos, por esa capacidad grandiosa de querer que sólo tú tienes, por desear siempre lo mejor para mí y por esforzarte en mantener un vínculo.

A mis abuelitos:

Camerina y Salomón

Que me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo y por ser un ejemplo de lucha.

A mis hermanas:

Claudia

Por ser el ejemplo de una hermana mayor y de la cual aprendí aciertos y de momentos difíciles.

Lupita

Por haber sido mi compañera de juegos y porque estaremos juntos durante toda la vida y serás mi único vínculo con mi infancia.

A mi sobrinita

Aprílita

Quien representa en mí una gran ilusión, ese motor que me impulsa y quien me ha demostrado que la vida vale la pena.

A mi familia:

A todos mis tíos especialmente a Estela, Alfredo, Paz, Arturo y Lolito por toda su paciencia, cariño y apoyo todos aquellos que participaron directa o indirectamente en la elaboración de esta tesis.

A quienes sin escatimar esfuerzo alguno, han sacrificado gran parte de su vida para formarme y educarme, a quienes la ilusión de su vida ha sido convertirme en una persona de provecho, a quienes nunca podré pagar los desvelos ni aun con las riquezas más grandes del mundo.

AGRADECIMIENTOS

A la Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo, en especial al PIMCB, por haberme brindado la oportunidad de realizar mis estudios.

Muy especialmente al D.C. Rafael Salgado Garciglia, por confiar en mí y brindarme la oportunidad de trabajar en su laboratorio, haber compartido conmigo su experiencia y sabiduría, por su infinita presencia, por todos sus consejos, por no solo ser un guía en el campo de la investigación sino además un ejemplo a seguir por su determinación y sus valores. Me es imposible expresar la admiración y cariño que tengo ¡Gracias!

Quiero expresar un profundo agradecimiento a mí comité tutorial la D.C. Sylvia Patricia Fernández Pavía, D.C. Patricia Ríos Chávez, D.C. Rodolfo López Gómez y D.C. Marco Antonio Cortés Rodríguez por su participación durante la realización del proyecto, en la revisión de la tesis y en la evaluación durante las diferentes etapas del trabajo y por los valiosos comentarios que ayudaron a enriquecer este trabajo.

Al laboratorio de Biotecnología Vegetal del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, en particular a la Biol. Alejandra Hernández García por el apoyo técnico y académico brindado.

A la Biol. Yolanda Rodríguez García por su apoyo y disponibilidad en la realización de esta tesis y en mi formación como investigador.

A CONACYT por el apoyo económico otorgado como beca durante el desarrollo de la presente investigación.

A mis compañeros del laboratorio ya que en ellos he encontrado amistad y apoyo con el más alto profesionalismo, quienes fueron pieza clave durante el proyecto pero sobre todo gracias al M.C. Rafael Torres Martínez un buen ejemplo de perseverancia y paciencia, gracias por tu amistad y por haberme ayudado a realizar este trabajo.

Son muchas personas a quienes les debo GRACIAS, no sólo a quienes de alguna manera intervinieron en el desarrollo de este proyecto, sino también a TODOS aquellos que me acompañaron durante el proceso de mi formación académica, profesional y personal.

ÍNDICE GENERAL

	Página
ÍNDICE DE FIGURAS	i
ÍNDICE DE CUADROS	iii
RESUMEN	iv
ABSTRACT	v
CAPÍTULO I	1
1. INTRODUCCIÓN GENERAL	1
1.1. JUSTIFICACIÓN	4
1.2. HIPÓTESIS	5
1.3. OBJETIVOS	6
1.3.1. Objetivo general	6
1.3.2. Objetivos específicos	6
CAPÍTULO II	7
2. MARCO TEÓRICO	7
2.1. FRESA (<i>Fragaria x ananassa</i> Duchesne Cv. Aromas)	7
2.1.1. Cultivo y producción de fresa	7
2.1.2. Origen del cultivo	8
2.1.3. Características botánicas y fisiológicas	9
2.1.4. Plagas y enfermedades	11
2.1.4.1. <i>Botrytis cinerea</i> Pers.:Fr.	12
2.1.4.2. <i>Colletotrichum acutatum</i> J.H. Simmonds	13
2.2. CONTROL DE ENFERMEDADES FUNGOSAS EN PLANTAS	13
2.2.1. Metabolitos secundarios vegetales como plaguicidas	15
2.2.2. Antifúngicos de origen vegetal	15
2.2.3. Actividad antimicrobiana de compuestos volátiles	16
2.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS FUENTE DE EXTRACTOS	17
2.3.1. Nurite (<i>Satureja macrostema</i> 'Benth.' Briq.)	17
2.3.2. Santa María (<i>Tagetes lucida</i> Cav.)	19
2.3.3. Toronjil (<i>Agastache mexicana</i> 'Kunth' Briq.)	21
CAPÍTULO III	23
3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL	23

	Página
CAPÍTULO IV	24
4. RESULTADOS	24
4.1. Evaluación de las propiedades antifúngicas de los extractos de nurite, Santa María y toronjil sobre el crecimiento de <i>B. cinerea</i> y <i>C. acutatum</i> bajo condiciones <i>in vitro</i>	24
RESUMEN	24
INTRODUCCIÓN	24
MATERIALES Y MÉTODOS	26
Material biológico	26
Método de extracción	27
Ensayos antifúngicos	27
ANÁLISIS ESTADÍSTICO	27
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	28
CONCLUSIÓN	33
LITERATURA CITADA	33
4.2. Identificación y cuantificación de los componentes volátiles del extracto hexánico y la fracción con mayor actividad fungicida de <i>Tagetes lucida</i> Cav. (Santa María)	35
RESUMEN	35
INTRODUCCIÓN	35
MATERIALES Y MÉTODOS	36
Material biológico	36
Separación de fracciones por cromatografía en columna	37
Ensayo antifúngico de fracciones	37
Ensayo antifúngico con metil eugenol	38
Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (CG-EM)	39
Análisis estadístico	40
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	40
Efecto antifúngico de las fracciones del extracto de <i>T. lucida</i>	40
Identificación y cuantificación de compuestos activos	45
CONCLUSIÓN	48
LITERATURA CITADA	49

	Página
4.3. Determinación del efecto antifúngico del extracto hexánico y fracción activa de <i>Tagetes lucida</i> Cav. en plántulas de fresa	51
RESUMEN	51
INTRODUCCIÓN	51
MATERIALES Y MÉTODOS	53
Material biológico	53
Obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI)	54
Obtención de esporas	54
Efecto sobre la germinación de esporas	54
Ensayo con plantas de fresa cultivadas <i>in vitro</i>	55
Análisis estadístico	55
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	56
CONCLUSIONES	64
LITERATURA CITADA	65
CAPÍTULO V	67
5. DISCUSIÓN GENERAL	67
CAPÍTULO VI	72
6. CONCLUSIONES GENERALES	72
6.1. Perspectivas	73
CAPÍTULO VII	74
7. LITERATURA CITADA GENERAL	74
ANEXOS	83
ANEXO I. Espectros de masas	83
ANEXO II. Artículo enviado para su publicación	85

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
CAPÍTULO II	
Figura 1. Planta de nurite con flores (<i>Satureja macrostema</i> 'Benth.' Briq.).	18
Figura 2. Planta con flores de Santa María (<i>Tagetes lucida</i> Cav.).	20
Figura 3. Planta con flores de toronjil morado (<i>A. mexicana</i> (Kunth) Lint et Epling ssp. <i>mexicana</i>).	22
CAPÍTULO IV	
4.1. Evaluación de las propiedades antifúngicas de los extractos de nurite, Santa María y toronjil sobre el crecimiento de <i>B. cinerea</i> y <i>C. acutatum</i> bajo condiciones <i>in vitro</i>	
Figura 1. Porcentaje de inhibición del crecimiento de <i>B. cinerea</i> y <i>C. acutatum</i> por los extractos de Nurite, Santa María y Toronjil: A) Método de difusión en placa; B) Método de sensidiscos. A los 8 días de cultivo.	30
Figura 2. Bioensayos <i>in vitro</i> con el método de sensidiscos con 50 µL de etanol absoluto (1), 1.0 mg/mL de extracto de Santa María (2), Nurite (3), Toronjil (4) y Tecto 60 (5) en <i>B. cinerea</i> (A) y <i>C. acutatum</i> (B), a los 8 días de cultivo.	31
Figura 3. Bioensayos <i>in vitro</i> con el método de difusión en placa con 50 µL de etanol absoluto, 1.0 mg/mL de extracto de Santa María, Nurite, Toronjil y Tecto 60 en <i>C. acutatum</i> (A) y <i>B. cinerea</i> (B), a los 8 días de cultivo.	32
4.2. Identificación y cuantificación de los componentes volátiles del extracto hexánico y la fracción con mayor actividad fungicida de <i>Tagetes lucida</i> Cav. (Santa María)	
Figura 1. Fotografía de placa cromatográfica de capa fina con revelado de luz UV ($\lambda=254\text{nm}$) de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna, del extracto hexánico de <i>T. lucida</i> .	41
Figura 2. Bioensayos <i>in vitro</i> con el método de difusión en placa aplicando 25 µL de cada fracción (F1 – F7), 50 µL de etanol absoluto (E) y 1.0 mg/mL de Tecto 60 (T), tanto en <i>B. cinerea</i> (A) y <i>C. acutatum</i> (B), a los 8 días de cultivo.	43

	Página
Figura 3. Bioensayos <i>in vitro</i> con el método de sensidiscos aplicando 25 μ L de cada fracción (F1 – F7), 50 μ L de etanol absoluto (E) y 1.0 mg/mL de Tecto 60 (T), tanto en <i>B. cinerea</i> (A) y <i>C. acutatum</i> (B), a los 8 días de cultivo.	44
Figura 4. Cromatograma (A y B) del extracto hexánico de Santa María y de la fracción F5: 1, β -Mirceno; 2, <i>o</i> -cimeno; 3, β -Linalol; 4, Estragol; 5, Acetato de geraniol; 6, Metil eugenol; (C) Espectro de masas de la fracción F5 del extracto hexánico de <i>T. lucida</i> .	47
4.3. Determinación del efecto antifúngico del extracto hexánico y fracción activa de <i>Tagetes lucida</i> Cav. en plántulas de fresa	
Figura 1. Bioensayos <i>in vitro</i> con el método de sensidiscos en <i>B. cinerea</i> (A) y en <i>C. acutatum</i> (B), para la determinación de la CMI aplicando el extracto hexánico de <i>T. lucida</i> en diferentes concentraciones; 1) 0.1; 2) 0.05; 3) 0.01; 4) 0.005 mg/mL; 5) Tecto 60; 6) etanol absoluto. A los 8 días de cultivo.	57
Figura 2. Bioensayos <i>in vitro</i> con el método de sensidiscos en <i>B. cinerea</i> (A) y en <i>C. acutatum</i> (B), para determinar el efecto inhibitorio con la CMI (0.05 mg/mL): 1) extracto hexánico; 2) fracción F5; 3) metil eugenol, 4) Tecto 60 (1 mg/mL); 5) etanol absoluto. A los 8 días de cultivo.	58
Figura 3. Efecto del extracto hexánico de <i>T. lucida</i> sobre el micelio y la germinación de esporas de <i>B. cinerea</i> y <i>C. acutatum</i> : micelio íntegro (A), micelio con extracto hexánico (B), esporas sin tratamiento (C), germinación de esporas (D) y esporas tratadas con extracto hexánico (E), de <i>B. cinerea</i> ; micelio íntegro (F), micelio con extracto hexánico (G), esporas sin tratamiento (H), germinación de esporas (I) y esporas tratadas con extracto hexánico (J), de <i>C. acutatum</i> . Observaciones en microscopio óptico (60 X).	60
Figura 4. Efecto antifúngico del extracto hexánico, fracción F5 y metil eugenol sobre <i>B. cinerea</i> en plantas de fresa cultivadas en condiciones <i>in vitro</i> : Planta sin inóculo de esporas, con DMSO 5% (A); Planta de fresa inoculada con esporas, con DMSO 5% (B); Plantas de fresa tratadas con 0.05 mg/L de extracto hexánico (C), fracción F5 (D), metil eugenol (E) y con 1 mg/L de Tecto 60 (F).	62
Figura 5. Efecto antifúngico del extracto hexánico, fracción F5 y metil eugenol sobre <i>C. acutatum</i> en plantas de fresa cultivadas en condiciones <i>in vitro</i> : Sin inóculo de esporas, con DMSO 5% (A); Planta de fresa inoculada con esporas, con DMSO 5% (B); Plantas de fresa tratadas con 0.05 mg/L de extracto hexánico (C), fracción F5 (D), metil eugenol (E) y con 1 mg/L de Tecto 60 (F).	63

ÍNDICE DE CUADROS

	Página
CAPÍTULO IV	
4.1. Evaluación de las propiedades antifúngicas de los extractos de nurite, Santa María y toronjil sobre el crecimiento de <i>B. cinerea</i> y <i>C. acutatum</i> bajo condiciones <i>in vitro</i>	
Cuadro 1. Efecto de los extractos de Nurite, Santa María y Toronjil sobre el crecimiento (cm) en <i>C. acutatum</i> y <i>B. cinerea</i> a los 8 días de cultivo, mediante el ensayo de difusión en placa (n=6).	29
Cuadro 2. Efecto de los extractos de Nurite, Santa María y Toronjil sobre el crecimiento (cm) en <i>C. acutatum</i> y <i>B. cinerea</i> a los 8 días de cultivo, mediante el ensayo de sensidiscos (n=6).	29
4.2. Identificación y cuantificación de los componentes volátiles del extracto hexánico y la fracción con mayor actividad fungicida de <i>Tagetes lucida</i> Cav. (Santa María)	
Cuadro 1. Efecto de las fracciones del extracto hexánico de Santa María sobre el crecimiento (cm) en <i>C. acutatum</i> y <i>B. cinerea</i> a los 8 días de cultivo, mediante el ensayo de difusión en placa (n=6).	42
Cuadro 2. Efecto de las fracciones del extracto hexánico de Santa María sobre el crecimiento (cm) en <i>C. acutatum</i> y <i>B. cinerea</i> a los 8 días de cultivo, mediante el ensayo de sensidiscos (n=6).	44
Cuadro 3. Contenido de los compuestos terpénicos identificados en el extracto hexánico y fracciones de <i>T. lucida</i> .	45
4.3. Determinación del efecto antifúngico del extracto hexánico y fracción activa de <i>Tagetes lucida</i> Cav. en plántulas de fresa	
Cuadro 1. Crecimiento y porcentaje de inhibición del extracto hexánico de Santa María (<i>T. lucida</i>) para determinar la CMI sobre el crecimiento de <i>B. cinerea</i> y <i>C. acutatum</i> (A los 8 días del cultivo).	56

RESUMEN

En la presente investigación se determinó el efecto antifúngico de los extractos de *Satureja macrostema* (nurite), *Tagetes lucida* (Santa María) y *Agastache mexicana* (toronjil morado), plantas utilizadas en la medicina tradicional del centro-occidente de México. Los extractos fueron obtenidos mediante maceración con hexano de la parte aérea (tallo, hojas y flores), todos fueron preparados a una concentración de 1 mg/mL con etanol absoluto. La actividad antifúngica fue determinada mediante bioensayos *in vitro* (difusión en placa y sensidiscos) contra *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum acutatum*, hongos patógenos de fresa, aplicando 50 y 25 μ L, respectivamente. Primeramente se seleccionó el extracto más activo, encontrando que el derivado de Santa María ejerció un 100% de mortalidad en los dos hongos bajo ambos métodos de ensayo. Los extractos de toronjil y nurite mostraron un efecto inhibitorio similar en ambos hongos, con porcentajes de inhibición menores a 21%. El extracto hexánico de *T. lucida* fue analizado por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM), determinando como mayoritarios a los compuestos terpénicos, metil eugenol (64%), estragol (29.4%), β -linalol (2.3%), mirceno (2.1%), *o*-cimeno (1.3%) y acetato de geraniol (0.9%). Mediante el fraccionamiento por cromatografía en columna, se obtuvieron 10 fracciones, las cuales fueron usadas en ensayos antifúngicos a una concentración de 0.1 mg/mL, encontrando que la fracción F5 ejerció un 100% de inhibición tanto en *B. cinerea* y *C. acutatum*, similar al efecto antifúngico del extracto (100% de inhibición). El 94.4% del contenido de la fracción F5 correspondió a metil eugenol, considerado como el responsable de esta actividad ya que a una concentración de 1 mg/mL produce una inhibición del 100% sobre el crecimiento de ambos hongos, resultado igual que ejerce el extracto y la fracción F5. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hexánico de Santa María fue de 0.05 mg/mL, con la que se comprobó el efecto antifúngico en ensayos de germinación de esporas y en plántulas de fresa *in vitro* inoculadas con esporas (1×10^3 /mL) tanto de *B. cinerea* como de *C. acutatum*. La germinación de las esporas de ambos hongos fue inhibida en un 100% después de una hora de incubación, aplicando el extracto hexánico y la fracción F5 en una concentración de 0.05 mg/mL del contenido de metil eugenol, así como con el metil eugenol de referencia (estándar). No se observaron síntomas de la enfermedad causada por *B. cinerea* o por *C. acutatum*, al aplicarse el extracto hexánico o la fracción F5 en plántulas de fresa cultivadas *in vitro* inoculadas con ambos hongos. Este mismo efecto fue observado al aplicar 0.05 mg/mL de metil eugenol. Estos resultados demuestran que la actividad antifúngica de Santa María se debe principalmente a los compuestos volátiles terpénicos, considerando al metil eugenol como el principal responsable del efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *B. cinerea* y *C. acutatum*.

ABSTRACT

In this research was determined antifungal effect of extracts from *Satureja macrostema* (nurite), *Tagetes lucida* (Santa María) y *Agastache mexicana* (toronjil morado), plants used in traditional medicine in the West Central of Mexico. The extracts were obtained through maceration with hexane of the aerial part (stem, leaves and flowers), all were prepared at a concentration of 1 mg/mL absolute ethanol. Antifungal activity was determined using *in vitro* bioassays (diffusion plate and paper discs) against *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum*, pathogenic fungi of strawberry, applying 50 and 25 μ L, respectively. The Santa Maria extract was the most active extract, which exerted a 100% mortality in the two fungi under both test methods. Extracts of *A. mexicana* and *S. macrostema* showed a similar inhibitory effect in both fungi, with percentages of inhibition less than 21%. The extract hexanic of *T. lucida* was analyzed by gas chromatography and mass spectrometry (GC-MS), determining as majority compounds terpenes, methyl eugenol (64%), estragole (29.4%), β -linalool (2.3%), myrcene (2.1%), o-cymene (1.3%) and geraniol acetate (0.9%). Fractionation of Santa Maria extract by column chromatography produced 10 fractions, which were used in antifungal tests at a concentration of 0.1 mg/mL, finding that fraction F5 exerted 100% inhibition both in *B. cinerea* and *C. acutatum*, similar to the antifungal effect of extract (100% inhibition). Methyl eugenol was 94.4% of the content of the fraction F5, considered to be responsible for this activity since at a concentration of 1 mg/mL produced a 100% growth inhibition of both fungi, inhibition like that extract and fraction F5. The minimum inhibitory concentration (MIC) Santa Maria hexanic extract was 0.05 mg/mL, which found the antifungal effect in spore germination trials and *in vitro* strawberry seedlings inoculated with spores (1×10^9 /mL) both of *B. cinerea* as *C. acutatum*. The germination of the spores of both fungi was inhibited 100% after an hour of incubation, applying the extract hexanic and F5 fraction at a concentration of 0.05 mg/mL of methyl eugenol content, as well as the methyl eugenol of reference (standard).

No symptoms of the disease caused by *B. cinerea* or *C. acutatum* when the extract hexanic or F5 fraction were applied in strawberry plantlets cultured *in vitro* conditions, inoculated with both fungi. This same effect was observed when applying 0.05 mg/mL of methyl eugenol. These results demonstrate that the antifungal activity of Santa Maria is mainly due to the volatile terpenes, considering to methyl eugenol as primarily responsible for the inhibitory effect on the growth of *B. cinerea* and *C. acutatum*.

CAPÍTULO I

1. INTRODUCCIÓN GENERAL

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) produce una de las frutas más populares y con mayor demanda a nivel mundial, su cultivo en México es de gran importancia económica debido a que es un producto de exportación que requiere de una gran cantidad de mano de obra, lo que genera empleos y divisas. Además es un fruto con una gran posibilidad de utilización industrial en la obtención de diferentes productos. Sin embargo, presenta una gran problemática debido a factores que afectan la producción y el rendimiento como la disponibilidad de agua y de variedades o cultivares tolerantes; la presencia de enfermedades son la secadera causada por hongos (*Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani*, *Verticillium* spp., *Alternaria* spp. y *Rhizoctonia* spp), el moho gris causado por *Botrytis cinerea* y la antracnosis por diversas especies de *Colletotrichum*; las condiciones climatológicas, las cuales han cambiado en los últimos años dando lugar a oscilaciones en los rendimientos; pero también al manejo inadecuado del producto lo que da lugar a pérdidas poscosecha y a pérdidas de calidad del producto (INFOAGRO, 2002).

La fresa es un cultivo estratégico en el estado de Michoacán, siendo este primer productor y exportador del país, ya que es generador de empleos y divisas (Martínez *et al.*, 2008). Es un producto que participa con casi el 54% de la superficie cosechada, sin embargo, sólo aporta el 36.65% del valor de la producción del país, y desde 1991 hasta la fecha, excepto en 1995, ha tenido rendimientos por unidad de superficie inferiores a la media nacional (SAGARPA-SIAP, 2010). Aunado a lo anterior, Michoacán presenta una disminución de 0.66 % en la tasa media de crecimiento anual de la superficie sembrada (SAGARPA-SIAP, 2010).

Entre los factores más importantes que explican esta baja productividad están la densidad de cultivo, aportación de nutrimentos y el control de plagas y enfermedades. Por lo cual, es necesario buscar alternativas que permitan que los

cultivares de fresa sean más productivos y con mayor calidad, sanidad e inocuidad de los frutos.

Para combatir los diversos fitopatógenos se han empleado diferentes estrategias como la rotación de cultivos, siembra de variedades resistentes y aplicación de fungicidas. Sin embargo estas prácticas de forma aislada rara vez han resultado adecuadas (Gunashekar, 2008). Otra alternativa para combatir a las enfermedades causadas por estos fitopatógenos es emplear microorganismos promotores del crecimiento vegetal que antagonicen a los agentes infecciosos, como *Trichoderma* (Howell, 2003) y algunas bacterias como *Arthrobacter agilis* (Velázquez-Becerra *et al.*, 2011).

Desde hace más de 20 años se ha retomado el uso y aplicación de los metabolitos secundarios vegetales como una alternativa en el control de hongos y oomicetos fitopatógenos, que por sus características, es una medida viable para la regulación de poblaciones de microorganismos patógenos conservando al mismo tiempo la calidad ambiental. Se ha demostrado la actividad antimicrobiana de muchos de estos compuestos, los que en su mayoría han sido caracterizados químicamente (Jeandet *et al.*, 2002). Es por ello, que extractos vegetales, aceites esenciales o metabolitos secundarios derivados de éstas, pueden ser utilizados en el control de enfermedades vegetales, principalmente las causadas por hongos fitopatógenos (Fiori *et al.*, 2000). Estos compuestos presentan una serie de ventajas con respecto a los fungicidas sintéticos, tales como una baja toxicidad, menor residualidad y una alta selectividad por lo que son candidatos potenciales para su uso como agroquímicos (Aplablaza *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2004).

En México, uno de los países con mayor riqueza florística en el mundo, se han iniciado algunas investigaciones en donde se han encontrado numerosas especies de plantas que producen metabolitos antifúngicos, destacando las que pertenecen a la familia Asteraceae, Brassicaceae y Lamiaceae. Mediante bioensayos *in vitro*, se ha demostrado el efecto fungicida de diversos metabolitos vegetales, comprobando que éstos inhiben el desarrollo de diversos hongos patógenos, lo cual propone a

estos metabolitos para utilizarse como antifúngicos en plantas. El anetol (Kubo y Himejima, 1991), los isoflavonoides colutequinona y la colutehidroquinona (Grosvenor y Gray, 1996), la afinina (Molina-Torres *et al.* 2000, Ramírez-Chávez *et al.* 2000), y la azadiractina entre muchos más compuestos, han sido reportados con propiedades antifúngicas (Amadioha y Uchendu, 2003).

Los aceites esenciales o compuestos volátiles de diversas plantas han sido evaluados para determinar su efectividad como antifúngicos (Singh *et al.*, 2007). En este contexto, Antonov *et al.* (1997) demostraron que los aceites esenciales de tomillo (*Thymus capitatus*), clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y árbol de menta (*Prostanthera rotundifolia*), mostraron un efecto inhibitorio en el crecimiento de *B. cinerea*. También se ha demostrado el efecto antifúngico de compuestos volátiles de plantas como el orégano (*Origanum vulgare*), el jengibre (*Zingiber officinale*) y el maguey morado (*Tradescantia spathaceaz*), que inhiben el crecimiento tanto *in vitro* como en campo de hongos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. lindemuthianum*, que causan la enfermedad de la antracnosis en gran número de plantas (Bertelli *et al.*, 2003; Nguefack *et al.*, 2004; Sahin *et al.*, 2004).

Por el interés de buscar y determinar la efectividad de metabolitos secundarios de plantas medicinales de nuestra región (Michoacán, México), contra los hongos fitopatógenos de fresa, *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum acutatum*, se planteó evaluar el efecto de compuestos volátiles de tres plantas usadas como medicinales y con antecedentes de tener propiedades antifúngicas (nurite, *Satureja macrostema*; Santa María, *Tagetes lucida*; y toronjil morado, *Agastache mexicana*), realizando bioensayos *in vitro* y su aplicación en discos de hoja de plántulas de fresa cultivadas *in vitro*.

1.1. JUSTIFICACIÓN

Debido a que la fresa es uno de los cultivos más importantes de nuestro país y sabiendo que sufre pérdidas cuantiosas por la presencia de plagas y enfermedades, se requieren alternativas viables contra el ataque de hongos, que sean económicas e inocuas al ambiente. Una de ellas es factible con la aplicación de extractos derivados de las plantas, sobre todo los que contienen compuestos volátiles, por lo que contando con un gran número de ellas, en especial de aquellas de las que se han reportado propiedades antifúngicas, es posible seleccionar alguna con alto potencial antifúngico, para controlar los principales hongos que causan sus enfermedades en este cultivo, como *B. cinerea* y *C. acutatum*.

1.2. HIPÓTESIS

Los compuestos volátiles de las plantas de nurite, Santa María y toronjil son los responsables del efecto antifúngico sobre *B. cinerea* y *C. acutatum*, patógenos de fresa.

1.3. OBJETIVOS

1.3.1. Objetivo general

Determinar el efecto antifúngico de los compuestos volátiles de nurite, Santa María y toronjil sobre hongos patógenos de fresa.

1.3.2. Objetivos específicos

1. Evaluar las propiedades antifúngicas de los extractos de nurite, Santa María y toronjil sobre el crecimiento de *B. cinerea* y *C. acutatum* bajo condiciones *in vitro*, para seleccionar el de mayor efecto.
2. Identificar y cuantificar los componentes volátiles del extracto y de la fracción de mayor actividad fungicida.
3. Determinar el efecto antifúngico del extracto, fracción activa y compuesto mayoritario en plántulas de fresa cultivadas *in vitro*.

CAPÍTULO II

2. MARCO TEÓRICO

2.1. FRESA (*Fragaria x ananassa* Duchesne Cv. Aromas)

Las fresas conocidas por su delicado sabor y rico contenido en vitaminas se cultivan en todas las regiones arables de la tierra, son de las bayas más populares y forman parte regular de la dieta de millones de personas en el mundo. En los últimos años su cultivo ha alcanzado un notable desarrollo, mayor que el de las demás especies de frutos pequeños con los que tradicionalmente se asocia como la frambuesa y la mora. Su rápida difusión se debe principalmente a que es una fruta que puede cultivarse prácticamente durante todo el año. Además tiene una gran posibilidad de industrialización ya que se puede transformar o emplear en diversos productos. Otro aspecto importante a considerar, desde el punto de vista económico y social es la gran cantidad de mano de obra que requiere el cultivo, lo cual genera empleos (Schwab y Raab, 2004).

2.1.1. Cultivo y producción de fresa

La producción de fresa en el mundo presenta variaciones las cuales están relacionadas con la superficie cosechada, el rendimiento, las condiciones climatológicas, la demanda y la oferta y con la situación económica que prevalece en cada uno de los países productores (FAOSTAT, 2006). Los principales países productores de fresa son Estados Unidos, España, Rusia, Turquía, Rep. de Corea, Japón, Polonia y México, entre los cuales nuestro país ocupa el séptimo lugar. En los últimos años, Marruecos y Egipto han tenido un considerable aumento en la producción en los últimos 2 años, en cambio México ha presentado una disminución. De acuerdo a los datos reportados se observa que no hay una correspondencia entre el área cosechada y la producción, lo que indica que hay diferentes rendimientos de producción en cada país. Estados Unidos produce 1,259,449 ton en

20,300 hectáreas, sin embargo en México se producen 191, 843 ton en un área de 5,414 ha (FAOSTAT, 2006).

Sin embargo, la producción de fresa en México en los últimos años se ha incrementado, para 2006 se tuvo un incremento de hasta un 400 por ciento, en 2010 se obtuvieron 113,193.37 ton, equivalente a un rendimiento de 34.8 ton/ha, produciendo un valor de \$ 692.57 millones de pesos. El principal estado productor de fresa es Michoacán, seguido de otras regiones del país, principalmente en Baja California y Guanajuato (SAGARPA-SIAP, 2010).

El cultivo de la fresa en México ha formado parte de la tradición agrícola por más de 40 años en Ciudades como Zamora, Michoacán e Irapuato, Guanajuato, pero sus niveles de producción y exportación han perdido terreno paulatinamente. El cultivo de fresa ocupa solamente el 1% de la superficie dedicada a la agricultura, no obstante ocupa un lugar importante en la producción de hortalizas, figurando entre los principales por la producción obtenida y por los volúmenes exportados. Entre los tres principales estados productores de fresa se generan el 91.55% del total de producción nacional de fresa y solamente Michoacán genera el 52.38% de la producción nacional de fresa situándose con esto como el Estado productor más importante de fresa en México, por su volumen de producción aunque no por su productividad ya que el rendimiento que presenta es de 25.56 toneladas por hectárea (SAGARPA, 2006).

2.1.2. Origen del cultivo

La fresa tiene una gran cantidad de especies. Antes del descubrimiento de América, en Europa se cultivaban principalmente las especies *Fragaria vesca* y *Fragaria alpina*, de tamaño pequeño pero con excelente calidad sensorial. Con el descubrimiento de América se encontraron dos nuevas especies de mayor tamaño una en Chile, *Fragaria chiloensis* y otra en Estados Unidos, *Fragaria virginiana*, que por su tamaño se les llamó fresones, las cuales fueron llevadas a Europa e

hibridadas. Actualmente estas fresas grandes dominan el mercado y son producto de una serie de cruces (INFOAGRO, 2002).

Juscafresca e Ibar (1987), hicieron una descripción más detallada sobre las principales especies de fresa conocidas por el hombre en los tiempos pasados y de las cuales se generaron las especies comerciales, las especies descritas por ellos son: *Fragaria vesca*, *Fragaria alpina*, *Fragaria virginiana*, *Fragaria chiloensis*, *Fragaria moschata* o *ellator*. De estas especies las de interés desde el punto de vista económico son *Fragaria vesca*, *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana* (González, 1993).

La fresa que se cultiva hoy en día es la *Fragaria x ananassa* Duchesne, su origen es relativamente reciente. Ésta se obtuvo a partir de la hibridación de la *Fragaria virginiana* Duchesne y de la fresa chilena *Fragaria chiloensis* Duchesne, las cuales fueron llevadas a Europa alrededor del año 1750. Siguiendo con posteriores hibridaciones, especialmente en 1980, *Fragaria x ananassa* se desarrolló como una fruta roja, grande, fragante y sabrosa, que hoy se conoce como una excepcional fruta para postre o para procesamiento. La *Fragaria x ananassa* es el cultivo de fresa predominante aunque *Fragaria chiloensis* aún se cultiva en algunas partes de Sudamérica en donde ha sido cultivada por cientos de años. La fresa cultivada muestra una amplia variación en la adaptación a las condiciones ambientales. La producción de la fresa y la calidad de la fruta están marcadamente influenciadas por las interacciones del fotoperíodo, la temperatura, la longitud del período de descanso, enfermedades, condiciones del suelo y fluctuaciones de humedad del aire y del suelo. Como resultado, los cultivares muestran amplios rangos de adaptaciones regionales o ambientales (INFOAGRO, 2002).

2.1.3. Características botánicas y fisiológicas

El nombre botánico de la fresa es *Fragaria* L. y pertenece a la familia de las Rosáceas (Rosaceae). La planta posee un rizoma cilíndrico y retorcido que se entierra verticalmente y del cual, a flor de tierra, nacen las hojas, las flores y los

estolones tendidos que emiten raíces (Tamaro, 1981). Por su morfología las fresas pertenecen al grupo de frutas conocido desde el punto de vista hortícola como bayas, aunque botánicamente no corresponden a una verdadera baya. La fresa es una fruta simple, formada por el engrosamiento del receptáculo floral que permanece pulposo y succulento cuando madura y contiene inmersas las semillas. En este contexto, la fresa es un falso fruto, teniendo las verdaderas frutas o aquenios sobre la parte externa del receptáculo pulposo y unido a él a través de conexiones vasculares. Otros autores la describen como una fruta agregada y lo que se conoce como fruta de fresa es en realidad un falso fruto, producto de engrosamiento del receptáculo floral. Sobre este falso fruto se encuentran gran cantidad de semillas pequeñas, que son frutos verdaderos llamados aquenios (Schwab y Raab, 2004).

La fruta crece rápidamente obteniendo su tamaño completo en aproximadamente 30 días, después de la antesis, dependiendo de las condiciones. El tiempo que tarda en alcanzar el color rojo está relacionado con la temperatura y puede variar entre 20 y 60 días (Schwab y Raab, 2004). Las bayas se caracterizan por tener una piel muy suave, lo cual las hace susceptibles al daño físico (abrasión, cortaduras, magulladuras y pérdida de jugo) y a la invasión de microorganismos patógenos (Green, 1971).

Por sus características fisiológicas la fresa es una fruta no climatérica (Voca *et al.*, 2006), por lo tanto no madura fuera de la planta, así que deben ser recolectadas cuando están casi completamente maduras y suaves, lo cual reduce considerablemente su vida poscosecha (Talbot y Chau, 1998). Su velocidad de respiración es alta, cerca de 15 mg CO₂/Kg/h a 0°C y se incrementa de 4 a 5 veces conforme se eleva la temperatura a 10°C, entre 10°C y 20°C el incremento es de 2 a 3 veces. También se incrementa cuando la fresa se daña mecánicamente (Kader, 1991).

2.1.4. Plagas y enfermedades

Dentro de las enfermedades que presenta la fresa, la más seria es la pudrición producida por *Botrytis cinerea* (hongo gris), que ataca hojas, flores y frutos, manifestándose con manchas de donde surge una masa polvosa constituida por las esporas del hongo, que se movilizan fácilmente con el viento afectando rápidamente los cultivos. Generalmente se desarrolla en cultivos con alta humedad ambiental y baja temperatura. La “antracnosis” es causada por *Colletotrichum* spp (*C. fragariae*, *C. acutatum*, *C. gloesporioides*) y se caracteriza por pudriciones en los pecíolos y folíolos causando marchitamiento y muerte de hojas y raíces. Además de estos patógenos, también *Fusarium oxysporum*, *Verticillium albo atrum* y *Phytophthora cactorum* causan graves enfermedades: el primero ocasiona marchitamiento y en la hojas externas produce pudrición en el borde, su ataque también se ha denomina fusariosis; el segundo causa también marchitamiento, enfermedad muy destructiva en la fresa, el ataque empieza con el marchitamiento de las hojas atrasando la formación de nuevas hojas, la planta se marchita totalmente paralizando la producción; *Phytophthora cactorum* (oomiceto) causa el “tizón” cuyas primeras manifestaciones se ven con marchitamiento de la hoja, apareciendo tonos amarillos y rojizos en todo el follaje, en las raíces se producen pudriciones ocasionando la muerte de la planta (INFOAGRO, 2002).

Algunos de estos patógenos también atacan durante la poscosecha, *Botrytis cinerea* desarrolla la enfermedad de “moho gris”, la mayoría de las veces es el resultado de una infección precosecha, mientras que las infecciones poscosecha ocurren ocasionalmente cuando las frutas sanas se presionan contra la lesión de una fruta enferma (Sommer *et al.*, 1973). Otras enfermedades poscosecha de fresa incluyen la pudrición por *Rhizopus* (causada por *Rhizopus* spp) y la descomposición de la piel causada por *Phytophthora cactorum* (Takeda y Janisiewicz, 1991).

2.1.4.1. *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.

Botrytis cinerea es un hongo Ascomycete, de la familia Sclerotinicaeae. El nombre del género *Botrytis* se deriva del Griego por la organización de las esporas en forma de racimos, ya que en griego *botrys* significa grupos de uvas. Mientras que el nombre de la especie *B. cinerea* deriva del Latín por *uvas* como *cenizas*; aunque poético, las *uvas*, decepcionantemente, se refiere al racimo de las esporas del hongo en los conidióforos, y las *cenizas* se refiere al color grisáceo de las esporas acumuladas. Normalmente se refiere al hongo por el nombre del anamorfo (forma asexual), porque la fase sexual raras veces se observa. El telomorfo (forma sexual) es un ascomiceto, *Botryotinia fuckeliana* (INFOAGRO, 2002).

B. cinerea se caracteriza por los abundantes conidios (esporas asexuales) de forma oval en el extremo de conidióforos grises ramificados. El hongo además produce esclerocios altamente resistentes como formas de resistencia en cultivos viejos. Pasa el invierno en forma de esclerocio o como micelio intacto, ambas formas germinan en primavera para producir conidióforos. Los conidios se dispersan por el viento y la lluvia y causan nuevas infecciones (Phillips *et al.*, 1987).

B. cinerea daña el fruto principalmente de vid o de fresa, produciendo un ablandamiento, y cuando es muy severo se cubre completamente con vello gris. Su desarrollo se ve favorecido con la alta humedad y bajas temperaturas, puede penetrar en el fruto sin necesidad de heridas y durante la cosecha los frutos sanos pueden ser contaminados con esporas provenientes de otros infestados. Las flores abiertas son fácilmente infectadas debido a la humedad aprisionada entre sus estructuras y a la exudación de jugos azucarados en los estigmas. También daña tejidos vegetativos como hojas y tallos, denominados tizones o pudriciones (Pérez *et al.*, 1991).

2.1.4.2. *Colletotrichum acutatum* J.H. Simmonds

La antracnosis es la segunda enfermedad más importante en fresa y es causada por diversas especies de *Colletotrichum*, entre ellas *C. acutatum* (APS, 1998). *C. acutatum* es un hongo ascomiceto de la familia Phyllachoraceae (Sutton, 1992) y es el agente causal principal de esta enfermedad, que afecta hojas, tallos, flores y frutos especialmente cuando estos últimos están maduros. Las lesiones son hundidas de color oscuro, cuando ataca la corona del tallo, se presenta la muerte de las plantas. Bajo condiciones de humedad masas de micelio de color rosado, salmón o anaranjado cubren el centro de la lesión. La antracnosis ha sido reportada principalmente en regiones de clima templado, especialmente en áreas donde la fresa es cultivada de forma anual y con cobertura plástica. Bajo este sistema de siembra se ha confirmado que las infecciones son causadas por *C. acutatum* (APS, 1998).

2.2. CONTROL DE ENFERMEDADES FUNGOSAS EN PLANTAS

En México se ha identificado un gran número de enfermedades en las plantas causadas por hongos patógenos, que con diversa intensidad afectan a los diferentes cultivos. Entre las enfermedades más importantes podemos mencionar a la “tristeza del aguacatero” ocasionada por el hongo *Phytophthora cinnamomi*, la “roya o chahuixtle” del ciruelo, ocasionada por el hongo *Tranzchelia discolor*, la “antracnosis” del mango, ocasionada por el hongo *Colletotrichum gloesporioides* y la “mancha foliar” en el arroz, causada por el hongo *Cercospora oryzae* (Mendoza-Zamora, 1991).

El control de este tipo de enfermedades se realiza mediante control químico y control biológico. El control químico se realiza principalmente utilizando plaguicidas sintéticos. Por diseño, los plaguicidas son sustancias tóxicas cuya aplicación deber ser controlada (Cortinas *et al.*, 1996).

Se estima que si no se utilizaran los plaguicidas para detener el efecto que los patógenos tienen sobre los cultivos, habría pérdidas de hasta un 45% en la cosecha total. Aún con el uso intensivo de fungicidas, las pérdidas en las cosechas a causa de los hongos es un grave problema en el ámbito mundial. De ahí que cualquier metodología que ayude en la resolución de este problema puede tener repercusiones tanto alimenticias como económicas, especialmente si se ayuda también a disminuir las fuertes cantidades de fungicidas sintéticos aplicados en el campo (Herrera y Carsolio, 1998).

Actualmente existe una creciente preocupación de la sociedad acerca del uso de plaguicidas sintéticos. El uso irracional de estos agroquímicos, esto es, el incremento en la frecuencia y en la dosis de aplicación, uso de mezclas, deficiente aplicación y el uso de químicos muy persistentes, ha propiciado el surgimiento de múltiples efectos negativos en el ambiente. Como consecuencia de estos disturbios biológicos y ecológicos se han provocado cambios de un cultivo a otro menos redituable, ha disminuido la actividad agrícola y en algunos casos se ha abandonado. Ante esta situación, se considera impostergable el uso de medidas ecológicas en el combate de plagas (Rodríguez, 2000).

Las alternativas actuales del control de plagas, incluidas todas en el MIPE (Manejo integral de plagas y enfermedades), son el control cultural, el uso de plantas resistentes a las plagas, el control vía uso de feromonas, atrayentes, repelentes, control microbiano, entre otros. El MIPE es un sistema de manejo de plagas que, en el contexto del ambiente asociado y la dinámica poblacional de las especies bajo estudio, utiliza todos los métodos y la tecnología adecuada de manera compatible para mantener la densidad de la población plaga a niveles subeconómicos, es decir que no cause daño económico sobre el cultivo, conservando a la vez la calidad ambiental. El control integrado es un método de regulación de poblaciones plaga, siendo este mismo un componente del manejo de los recursos que tiene influencia sobre la conservación de otros recursos (Badii *et al.*, 1996).

Recientemente se han intensificado los esfuerzos encaminados a identificar agentes de control biológico potenciales así como otras alternativas, además de desarrollar los procedimientos de producción y aplicación de esos agentes. Asimismo, aunque es considerada otra rama de control de plagas, las plantas han sido estudiadas también como un gran potencial de ser utilizadas como fuente de compuestos biocidas (Duke, 1990).

2.2.1. Metabolitos secundarios vegetales como plaguicidas

Se ha demostrado que existen alrededor 2,400 especies de plantas con propiedades para contra plagas agrícolas incluyendo hongos, roedores, malas hierbas, ácaros, insectos, nematodos y bacterias. Se ha dilucidado la estructura de cerca de 10,000 metabolitos secundarios con este tipo de propiedades. En México hay antecedentes del uso de polvos vegetales para controlar insectos de granos almacenados como una técnica tradicional transmitida verbalmente de generación en generación (Montes, 1996).

La necesidad de desarrollar métodos de control de plagas, seguros y compatibles con los principios de control integrado y la sustentabilidad de la agricultura, ha conducido al análisis e investigación sobre métodos alternativos como son los convencionales mencionados en párrafos anteriores. De esta manera el uso de productos de origen vegetal con algún tipo de actividad plaguicida ha tomado gran importancia, en donde el campo de control de hongos fitopatógenos y el de control de insectos sobresalen.

2.2.2. Antifúngicos de origen vegetal

Diversos estudios realizados sugieren que la propiedad antifúngica de los metabolitos secundarios es un fenómeno muy frecuente y la diversidad de hongos fitopatógenos ha generado también variedad de respuestas al interactuar con los vegetales. A partir de información recabada se ha calculado que existen alrededor de 50 familias de plantas en las que se han encontrado especies con características

antifúngicas destacando la familia Asteraceae, Fabaceae y Brassicaceae (Bowers y Locke, 1999).

Son varios los tipos de compuestos que tienen propiedades antifúngicas (Grosvenor y Gray, 1996; Lida et al., 1999). Por otro lado, diversas formulaciones comerciales de extractos botánicos y aceites esenciales están siendo investigadas como posibles alternativas para aplicarse contra algunos hongos fitopatógenos como *F. oxysporum*. Para considerar que los metabolitos secundarios de plantas representan una alternativa, efectiva y ecológicamente sensata para el control de plagas y patógenos, es necesario realizar diferentes bioensayos que lo demuestren. Dentro de los más importantes se encuentran los de espectro de acción, efectividad, toxicidad, mecanismo de acción y estabilidad, en donde los bioensayos *in vitro*, en invernadero y campo, tienen una importancia trascendental (Bowers y Locke, 1999).

En México, uno de los países con mayor riqueza florística en el mundo, se han iniciado algunas investigaciones en donde se han encontrado numerosas especies de plantas que producen metabolitos antifúngicos, destacando las que pertenecen a la familia Asteraceae, Brassicaceae y Labiatae.

2.2.3. Actividad antimicrobiana de compuestos volátiles

Algunos compuestos volátiles de los aceites esenciales derivados de plantas han mostrado actividad antimicrobiana contra un amplio número de hongos y bacterias (Daferera *et al.*, 2000; Ramos-García *et al.*, 2010). La actividad antimicrobiana se asocia al contenido de fenoles monoterpenos, especialmente el de tomillo (*Thymus vulgaris* L.), orégano (*Origanum vulgare* L.) y clavo (*Eugenia caryophyllata* Thunb.). Su mecanismo de acción se asocia con la capacidad de interactuar con el citoplasma del patógeno y su modo de acción parece estar estrechamente relacionado con la solubilidad de cada compuesto (Ronquillo, 2007). Esta actividad podría estar relacionada a la respectiva composición de aceites volátiles de cada planta, a la configuración estructural de los componentes constituyentes de los aceites, a sus grupos funcionales y a posibles interacciones sinérgicas entre sus componentes

(Dorman y Deans, 2000). La hidrofobicidad de los aceites esenciales les permite incorporarse a los lípidos de membrana, ocasionando trastornos en su estructura y permeabilidad, dando lugar a la fuga de iones y otros compuestos (Bosquez–Molina *et al.*, 2009).

Se ha reportado toxicidad en humanos por la utilización de los aceites esenciales puros o en altas concentraciones, ocasionando desde irritaciones en la piel hasta cáncer. Sin embargo, la utilización de aceites en concentraciones mínimas no genera alteraciones en el organismo, siendo además productos considerados como GRAS (de siglas en Inglés, Generally Recognized As Safe) de acuerdo a regulaciones de FDA (Food and Drug Administration) (Bakkali *et al.*, 2008).

2.3. CARACTERÍSTICAS DE LAS PLANTAS FUENTE DE EXTRACTOS

2.3.1. Nurite (*Satureja macrostema* ‘Benth.’ Briq.)

Satureja macrostema (Benth.) Briq. (Familia: Lamiaceae), planta conocida como nurite, es una planta muy utilizada por los Purépechas (Región de la meseta Purépecha, Michoacán, México) para sus eventos ceremoniales y religiosos, así como para la aplicación de la medicina tradicional. Es una planta que se utiliza en la medicina tradicional mexicana, principalmente por sus propiedades antimicrobianas, atribuidas al alto contenido de compuestos volátiles. Los compuestos químicos identificados para esta especie son: monoterpenos (linalool, limoneno, canfor, timol, pulegona, p-cimeno, α -terpineol, canfeno, limoneno y 4-terpinenol), tres triterpenos (ácido oleanólico, ácido ursólico y ácido 3- hidroxí-ursenoico) (Bello, 2006).

El nurite [*Satureja macrostema* (Benth.) Briq.] es una planta dicotiledónea de la familia Lamiaceae con olor a menta al estrujar sus hojas. Es una planta arbustiva de 1 a 3 m de alto; tallos erectos, ramas arqueadas, pubescentes; hojas con peciolos de 2 a 5 mm de largo, limbo ovado u oblongo a lanceolado, de 1 a 4 cm de largo por 0.6 a 1.5 cm de ancho, ápice agudo, aserradas, base redondeada; flores solitarias o en grupos de 2 a 3 en las axilas de las hojas, pedicelos de 2 a 6 mm de largo,

pubescentes; cáliz 5-dentado, bilabiado, de 7 a 10 mm de largo con la garganta pilosa; corola roja o anaranjada (cambiando a blanquecina o rosada en el secado), de 2 a 3.5 cm de largo; estambres exsertos, tecas de las anteras divergentes; estilo saliente de la corola; mericarpios ovoides, lisos o reticulados (Figura 1) (Rzedowski y Rzedowski, 1985).

S. macrostema es una especie compleja y los siguientes taxones han sido incluidos como sus sinonimias: *Melissa macrostema*, Mociño & Sessé; *Clinopodium macrostemum* (Benth.) Kuntze (Standley, 1924); y *Calamintha macrostema* (Benth.) Kuntze (Rzedowski y Rzedowski, 1985).



Figura 1. Planta de nurite con flores (*Satureja macrostema* 'Benth.' Briq.).

Al nurite se le encuentra ampliamente distribuido en regiones donde habita el bosque de pino, encino, pino-encino, oyamel y a veces en matorrales cercanos a los bosques, en alturas de 2400 a 3200 msnm por lo que se distribuye en los municipios

de Paracho, Nahuatzen, Uruapan, Tancítaro, Cherán, Tangancícuaro, Zinapécuaro, Tlalpujahua, Salvador Escalante, San Juan Nuevo, Zacapu, Peribán, Los Reyes, Charo, Tarímbaro, Queréndaro y otros municipios donde abunda el bosque. Habita en temperaturas de 9 a 16°C, precipitación de 1.200 a 1.600 mm, suelos andosoles y una pendiente de 0 a 35% (Bello, 1993).

En trabajos recientes con nurite, se ha mostrado que el extracto etanólico de esta especie tuvo 80% de inhibición contra bacterias (*Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Streptococcus sp*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Klebsiella pneumoniae*). Los terpenos como limoneno y pulegona, compuestos volátiles mayoritarios del extracto, podrían ser los metabolitos responsables del efecto antibacteriano y antifúngico. Los compuestos Fitol, Escualeno, Estigmasterol y Ácido Ursólico son principalmente responsables del efecto antiinflamatorio y relajante (Bello *et al.*, 2006).

2.3.2. Santa María (*Tagetes lucida* Cav.)

El género *Tagetes*, pertenece a la familia Asteraceae y tiene una amplia distribución en el continente americano (Turner y Nesom 1993), cuenta con pocas especies de importancia económica, si bien su potencial de uso es amplio por las propiedades químicas del taxón (Serrato y Quijano 1993).

La especie *T. lucida* Cav. es llamada comúnmente “Santa María” o Spanish Tarragón, Anicillo, Bashigo (tarahumara), Bashigóko (tarahumara), Cuauhiyautli (náhuatl), Curucumín, Curucumis, Flor de muerto, Flor de Santa María, Guía laga-zaa (zapoteca), Hierba de las nubes, La coronilla, Naná uarhi (purépecha), Pericón, Periquillo, Yauhtli, Yerbanís, Yiauhtli, Yita pericoó, Zacayahueli. Planta que se distribuye principalmente al norte 20°24', al sur 17°55' de latitud norte; al este 100°04', al oeste 103°44' de longitud oeste (Serrato, 2002).

Es una planta anual, erecta, de hasta 80 cm de altura, generalmente de varios tallos partiendo de la base, más o menos ramificados, glabros, hojas sésiles, lineares a oblongas, elípticas u oblongo-lanceoladas, de 2 a 10 cm de largo, de 0.5 a 2 cm de

ancho, agudas a redondeadas en el ápice, márgenes aserrados; cabezuelas en corimbos, sobre los pedúnculos bracteados hasta de 1 cm de largo, flores liguladas 3 o 4 amarillas (Figura 2). En varios Estados de la República tiene una amplia tradición y aprovechamiento. Se tiene conocimiento que esta especie se utilizaba desde la época prehispánica, aunque actualmente sigue teniendo un uso ceremonial, medicinal, insecticida, forrajero, como condimento y ornamental. Su uso es de las flores y tallos en infusión para aliviar el dolor de estómago y para bañarse después del parto, se utiliza en ensaladas y como condimento o bien, como planta repelente de insectos (Rzedowski y Rzedowski, 2001). Se ha determinado que contiene alcaloides, ácido tánico y tiofenos, los cuales en términos generales tienen efecto letal para algunos microorganismos y nematodos. Otro compuesto determinado es la herniarina (7-metoxi-cumarina), también con propiedades antimicrobianas (Serrato, 2002).



Figura 2. Planta con flores de Santa María (*Tagetes lucida* Cav.).

En cuanto a los trabajos relacionados con *T. lucida*, se han realizado bajo diversos enfoques como son la determinación de la concentración de metales en las diversas partes de la planta, propiedades antioxidantes, antibacterial (Serrato, 2002) y el resto relacionado con la frecuencia de uso medicinal en América Latina (Linares y Bye, 1987; Girón *et al.*, 1991).

2.3.3. Toronjil (*Agastache mexicana* 'Kunth' Briq.)

A. mexicana (Kunth) Lint et Epling ssp. *mexicana* [sinonimia: *Cedronella mexicana* (Kunth) Briq.] (Familia: Lamiaceae), conocida popularmente en México con los nombres de toronjil morado, olotillo, abejera, cidronela y melisa, es una hierba perenne de 40 a 50 cm, muy aromática al estrujarse. Es una hierba perenne de 0.6 a m de altura; tallo erecto casi glabro con hojas con peciolo de 1 a 2.5 cm de largo, limbo generalmente lanceolado a ovado-lanceolado, de 2 a 8 cm de largo por 2 a 4 cm de ancho, ápices agudo, aserrado, base cuneada o redondeada, pubescente en ambas caras; inflorescencia terminal, en forma de verticilios laxos, interruptos; cáliz ligeramente bilabiado, tubular, de 6.5 a 11.5 mm de largo; corola de color rojizo-morado, de 2 a 3 cm de largo, el tubo angosto en la parte cubierta por el cáliz y ensanchándose en la parte superior, labio superior plano, el inferior trilobulado; estambres exsertos, filamentos delgados, de más o menos 6 mm de largo; mericarpios de 1.5 a 2 mm de largo, de color pardo oscuro. Esta subespecie también es conocida como toronjil morado por el color de sus flores (Rzedowski y Rzedowski, 1985) (Figura 3).

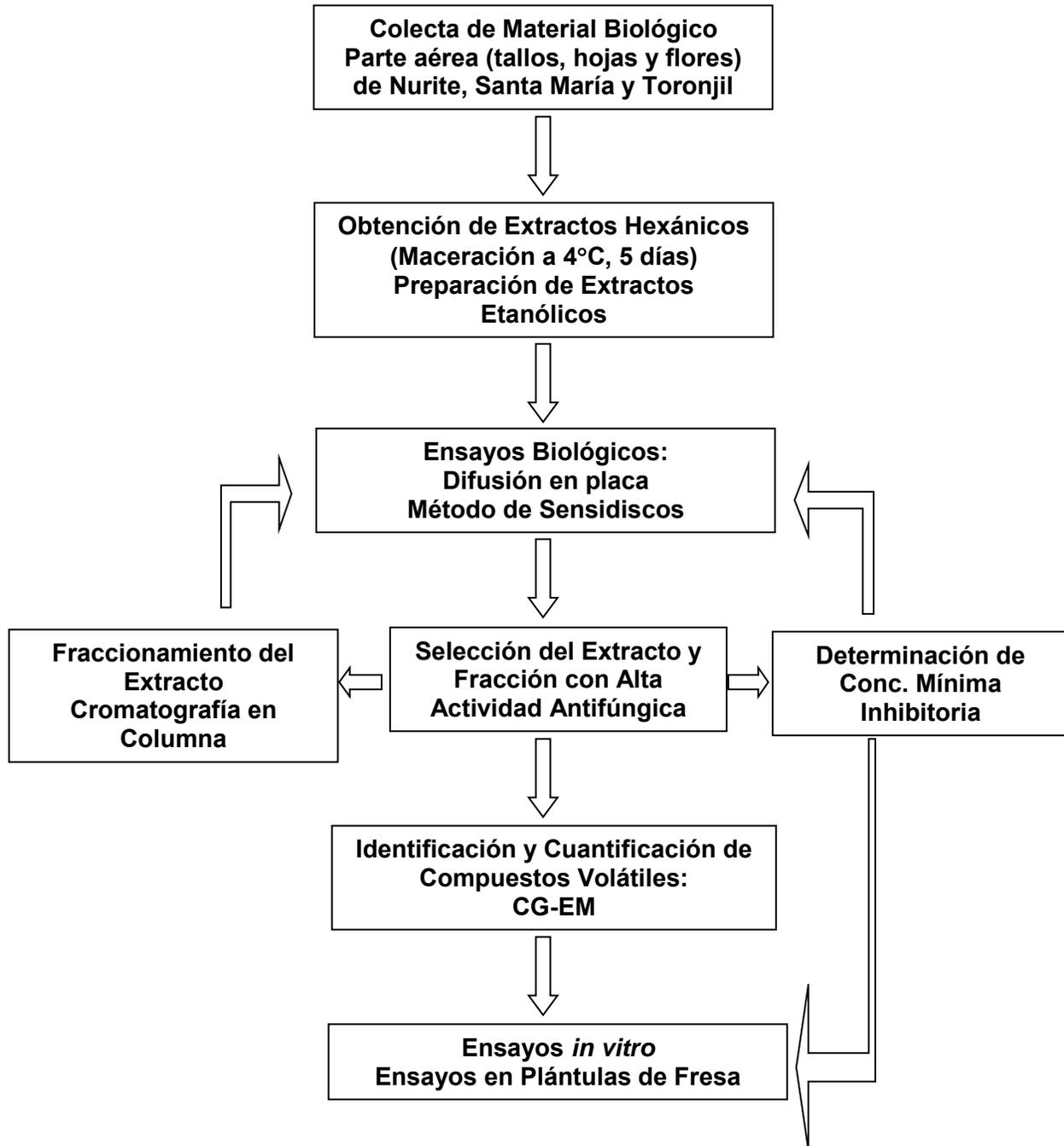
Los estudios químicos que se han realizado sobre esta especie han conducido al aislamiento de diversos metabolitos secundarios, destacando los alcanos (nonano); los monoterpenos (canfeno, β -pineno, limoneno, 1,8-cineol, furfural, citronelal, mentona); los terpenos (pulegona), y los flavonoides (crisina, apigenina, luteolina, diosmetina) (Lara y Márquez, 1996). Estos productos poseen diferentes actividades biológicas, como las arriba mencionadas. En la literatura al respecto, se reporta que la presencia de estos metabolitos secundarios confiere actividad biológica a las especies que los contienen (Trease y Evans, 1991).



Figura 3. Planta con flores de toronjil morado (*A. mexicana* (Kunth) Lint et Epling ssp. *mexicana*).

CAPÍTULO III

3. ESTRATEGIA EXPERIMENTAL GENERAL



CAPÍTULO IV

4. RESULTADOS

4.1. Evaluación de las propiedades antifúngicas de los extractos de nurite, Santa María y toronjil sobre el crecimiento de *B. cinerea* y *C. acutatum* bajo condiciones *in vitro*

RESUMEN

En la presente investigación se determinó el efecto antifúngico de los extractos de *Satureja macrostema* (nurite), *Tagetes lucida* (Santa María) y *Agastache mexicana* (toronjil morado), plantas utilizadas en la medicina tradicional michoacana. Se obtuvieron extractos mediante maceración de la parte aérea (tallos, hojas y flores) de cada planta con hexano, preparándose en una concentración final de 1 mg/mL con etanol absoluto. Los extractos fueron utilizados mediante bioensayos *in vitro* (difusión en placa y sensidiscos) contra *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum acutatum*, hongos patógenos de fresa. Para cada ensayo se aplicaron 50 o 25 µL de cada extracto, según el método, determinando el crecimiento micelial de los hongos, obteniendo los porcentajes de inhibición. En esta etapa de la investigación se seleccionó el extracto más activo, encontrando que el derivado de Santa María ejerció un 100% de mortalidad en los dos hongos bajo ambos métodos de ensayo. Los extractos de toronjil y nurite mostraron un efecto inhibitorio similar en ambos hongos, con porcentajes de inhibición por debajo del 21%. Es perspectiva de este trabajo el determinar la dosis mínima inhibitoria, así como la identificación de los compuestos responsables de la propiedad antifúngica.

INTRODUCCIÓN

El control de enfermedades fungosas se realiza mediante fungicidas sintéticos que son sustancias tóxicas que deben de ser altamente controladas debido a los efectos adversos como envenenamientos, resistencia, entre otros (Badii *et al.*, 1996). Se estima que de no utilizarse los fungicidas habría pérdidas de hasta un 45% en la

cosecha total. De ahí que cualquier metodología que ayude en la resolución de este problema puede tener repercusiones tanto alimenticias como económicas, especialmente si se ayuda a disminuir las fuertes cantidades de fungicidas sintéticos aplicados en el campo (SAGARPA, 2006). Se ha demostrado que existen alrededor de 2,400 especies de plantas con propiedades contra plagas y enfermedades agrícolas incluyendo hongos, roedores, malas hierbas, ácaros, insectos, nematodos y bacterias. Se ha dilucidado la estructura de cerca de 10,000 metabolitos secundarios con estas propiedades que representan una alternativa, efectiva y ecológicamente sensata para el control de plagas y patógenos (Lara y Márquez, 1996).

México ocupa el 7º lugar de producción de fresa a nivel mundial con 113,193 mil toneladas, pero se tienen cuantiosas pérdidas debido a plagas y enfermedades, específicamente hongos fitopatógenos, entre otros factores, ocasionando una disminución en el rendimiento (34.8%), un 20% por debajo de la producción mundial (FAOSTAT, 2006). La alternativa de utilizar extractos vegetales o metabolitos secundarios derivados de éstos, como antifúngicos en plantas, podría ser de utilidad sobre el control de hongos fitopatógenos de fresa, particularmente sobre aquellos de gran importancia como *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum acutatum*.

Las plantas medicinales representan la materia prima para obtener compuestos con propiedades antifúngicas, por presentar una gran cantidad y diversidad de metabolitos (Abreu-Guirado y Cuéllar-Cuéllar, 2008). Entre éstos, los componentes volátiles de los aceites esenciales, principalmente los de tipo terpenoide tienen propiedades antifúngicas que pueden ser utilizados en el control de enfermedades de plantas causadas por hongos, por lo que son considerados candidatos potenciales para su uso como agroquímicos (Fiori *et al.*, 2000; Aplablaza *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2007).

Plantas como nurite (*Satureja macrostema* Benth. 'Briq.'), Santa maría (*Tagetes lucida* Cav.) y toronjil morado (*Agastache mexicana* 'Kunth' Lint et Epling ssp. *mexicana*), utilizadas en la medicina tradicional mexicana, poseen propiedades

antifúngicas contra hongos patógenos de humano, debido al alto contenido de compuestos volátiles (Trease y Evans, 1991; Serrato y Quijano 1993; Lara y Márquez, 1996; Bello *et al.*, 2006; Céspedes *et al.*, 2006; Damián-Badillo *et al.*, 2008).

El objetivo de la presente investigación fue determinar el efecto antifúngico de extractos de nurite, Santa María y toronjil, sobre los hongos *B. cinerea* y *C. acutatum*, patógenos de fresa.

Palabras clave: Fresa, antifúngicos, extractos vegetales, compuestos volátiles, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Las plantas fuente de los extractos fueron colectadas en la comunidad de Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México (19° 21' 00" y 19° 34' 45" latitud Norte y 102° 08' 15" y 102° 17' 30" longitud Oeste). Cada especie se analizó para autentificar género y especie (Herbario de la Facultad de Biología, UMSNH). La colecta se realizó de parte aérea (tallos, hojas y flores) en el período de floración para cada planta. Se sometieron a secado en sombra y se pulverizaron en seco, almacenándose hasta su posterior extracción en oscuridad y baja humedad relativa.

Los hongos *B. cinerea* y *C. acutatum* se mantuvieron en el medio PDA (papa-dextrosa-agar) a 28°C. Las siembras se realizaron cada 15 días, por el método de resiembra sucesiva por micelio en cajas de Petri. Estas cepas fueron donadas por los laboratorios de Ecología Microbiana y de Fisiología Molecular de Hongos del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, respectivamente.

Método de extracción

A cada 100 g de muestra pulverizada en seco de cada una de las plantas, se añadieron 1000 mL de hexano, sometiendo a maceración en frío por 5 días a 4-10°C en frascos herméticamente cerrados. Posteriormente se obtuvo cada extracto de la siguiente manera: El extracto fue filtrado a través de papel filtro W. No.5; se llevó a sequedad, con remoción al vacío en un rotavapor (45°C); por último, cada extracto obtenido se resuspendió en 1 mL de hexano por cada mg de extracto obtenido y se mantuvo en refrigeración hasta su análisis.

Ensayos antifúngicos

Estos ensayos se realizaron mediante la técnica de difusión en placa de los extractos y con el método de discos impregnados, para ambos hongos. Cada uno de los extractos se preparó en una concentración de 1 mg/mL, removiendo el hexano y diluyendo con etanol absoluto. Para el primer método se llevó a cabo la aplicación de 50 µL del extracto en pozos realizados mediante sacabocado en el medio de cultivo sólido PDA, para posteriormente colocar un segmento de micelio (disco de 0.5 cm de diámetro), realizando los ensayos en cajas petri de 5 cm de diámetro por separado; el segundo método consistió en impregnar discos de papel filtro Whatman No. 5 (0.5 cm de diámetro) con 25 µL de cada extracto, los cuales se colocaron sobre el medio nutritivo, donde posteriormente se sembró un segmento de micelio (disco de 0.5 cm de diámetro) de cada hongo, éstos fueron realizados en cajas petri de 10 cm. Cada experimento se realizó con una n=6.

Como control positivo sobre la inhibición del crecimiento de los hongos en estudio, se utilizó el fungicida comercial Tecto 60 (1 mg/mL), para conseguir un 100% de inhibición. La adición de etanol absoluto fue utilizada como control negativo. Para el primer método se adicionaron 50 µL y 25 µL en el segundo método.

Los cultivos fueron incubados a 28°C, determinando en ambos métodos el crecimiento del micelio sobre el extracto en placa o sobre los discos impregnados, a los 8 días del cultivo, tiempo de máximo crecimiento de los hongos en medio PDA. Estos valores se presentan en porcentaje (%), tomando como control el crecimiento de cada hongo sobre etanol absoluto, con un 100% de crecimiento de micelio (0% de inhibición), correspondiente a 2 cm de diámetro de crecimiento mediante el método de difusión en placa y en el método de discos impregnados 1 cm de diámetro de crecimiento.

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Todos los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$), también se utilizó la prueba de diferenciación de medias de TUKEY. Para los ensayos antifúngicos *in vitro*, se analizó una $n=6$. Para realizar la prueba de ANOVA, los datos de los experimentos se transformaron con la fórmula siguiente (Steel y Torrie, 1980):

$$\sqrt{X + 0.5}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante los bioensayos *in vitro* de cada uno de los extractos vegetales sobre el crecimiento de *B. cinerea* y *C. acutatum*, tanto con el método de difusión en placa como en sensidiscos, pudo determinarse el efecto antifúngico de dichos extractos, mostrándose un crecimiento nulo al aplicar el extracto derivado de Santa María (*T. lucida*), equivalente a un 100% de inhibición (Cuadros 1 y 2, Figura 1). Sin embargo, los extractos de nurite (*S. macrostema*) y toronjil (*A. mexicana*) ejercieron un efecto inhibitorio por debajo del 21%, los extractos de toronjil fueron más efectivos que los de nurite, con un 21% y 19%, respectivamente, en el ensayo de difusión en placa, correspondientes a 3.23 y 3.43 cm (Cuadro1, Figura 1).

Cuadro1. Efecto de los extractos de Nurite, Santa María y Toronjil sobre el crecimiento (cm) en *C. acutatum* y *B. cinerea* a los 8 días de cultivo, mediante el ensayo de difusión en placa.

Tratamiento	<i>C. acutatum</i>		<i>B. cinerea</i>	
	Crecimiento (cm)	Inhibición (%)	Crecimiento (cm)	Inhibición (%)
Control negativo (Etanol)	3.53 ±0.2	0	3.63 ±0.2	0
Control positivo (Tecto 60)	0 ±0.0	100*	0 ±0.0	100*
Santa María	0 ±0.0	100*	0	100*
Nurite	2.86 ±0.3	18.9	3.43 ±0.2	5.5
Toronjil	2.76 ±0.2	21.7	3.23 ±0.3	10.1

*Indica diferencia significativa (n=6, p < 0.05).

Cuadro 2. Efecto de los extractos de Nurite, Santa María y Toronjil sobre el crecimiento (cm) en *C. acutatum* y *B. cinerea* a los 8 días de cultivo, mediante el ensayo de sensidiscos.

Tratamiento	<i>C. acutatum</i>		<i>B. cinerea</i>	
	Crecimiento (cm)	Inhibición (%)	Crecimiento (cm)	Inhibición (%)
Control negativo (Etanol)	2.5 ±0.2	0	4.5 ±0.2	0
Control positivo (Tecto 60)	0 ±0.0	100*	0 ±0.0	100*
Santa María	0 ±0.0	100*	0	100*
Nurite	2.33 ±0.3	6.7	4.26 ±0.2	5.2
Toronjil	2.03 ±0.2	18.7	4 ±0.3	11.1

*Indica diferencia significativa (n=6, p < 0.05).

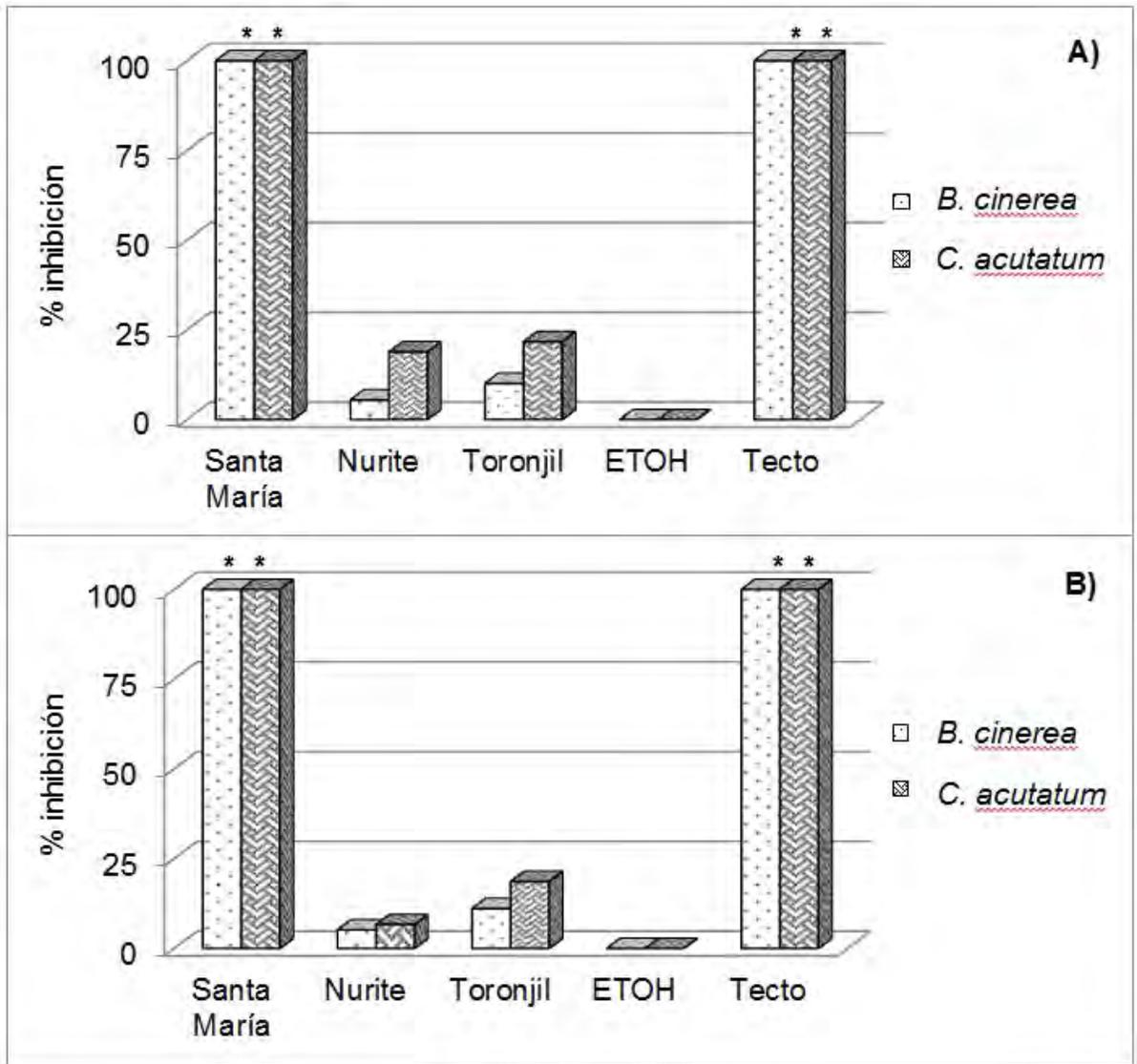


Figura1. Porcentaje de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* y *C. acutatum* por los extractos de Nurite, Santa María y Toronjil: A) Método de difusión en placa; B) Método de sensibilización. A los 8 días de cultivo. *Significa diferencia significativa (n=6, p < 0.05).

En la figura 1 puede observarse los porcentajes de inhibición, resultado del efecto de cada uno de los extractos utilizados, bajo el uso de ambos tipos de ensayos, el extracto de Santa María alcanzó el 100% de inhibición, similar al producido por el fungicida comercial y porcentajes menores por la aplicación de los extractos de nurite y toronjil (Figura 1).

En las figuras 2 y 3, se muestran fotografías representativas del efecto de los diferentes extractos sobre los hongos en estudio, puede observarse el óptimo crecimiento al aplicarse el etanol absoluto (0% de inhibición), la inhibición del 100% del fungicida comercial Tecto 60, similar al efecto que presentan los extractos de *T. lucida*, y el mínimo efecto inhibitorio de los extractos de *S. macrostema* y *A. mexicana*. Cabe señalar que durante los bioensayos con *C. acutatum* (método sensidiscos), el crecimiento del hongo fue menor al compararse con el método de difusión de placa, además de que se presentó un ligero crecimiento con la aplicación del Tecto 60, resaltando aún más el poder antifúngico del extracto de Santa María.

Este efecto antifúngico de *T. lucida* corrobora lo ya reportado por diversos investigadores, quienes describen que extractos etanólicos derivados de parte aérea poseen compuestos que inhiben el crecimiento de hongos patógenos de humano como *Candida albicans*, *Trichophyllum mentagrophytes* y *Sporothrix schenckii* (Céspedes *et al.*, 2006; Damián-Badillo *et al.*, 2008). Así mismo, el extracto etanólico de *T. lucida* ha sido reportado con actividad fungicida contra algunos fitopatógenos como *Fusarium moniliforme*, *F. sporotrichum* y *Rhizoctonia solani* (Céspedes *et al.*, 2006).

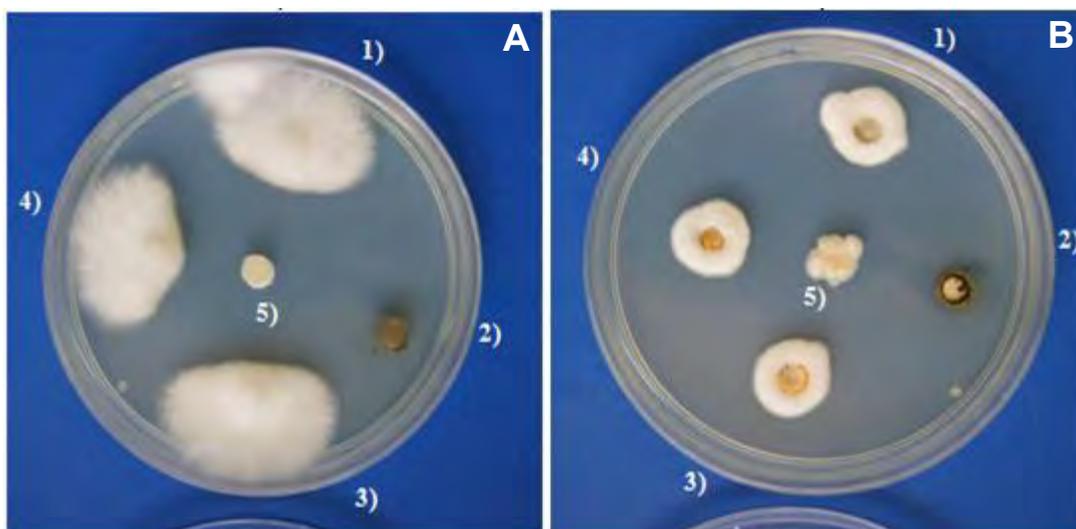


Figura 2. Bioensayos *in vitro* con el método de sensidiscos con 50 μ L de etanol absoluto (1), 1.0 mg/mL de extracto de Santa María (2), Nurite (3), Toronjil (4) y Tecto 60 (5) en *B. cinerea* (A) y *C. acutatum* (B), a los 8 días de cultivo.

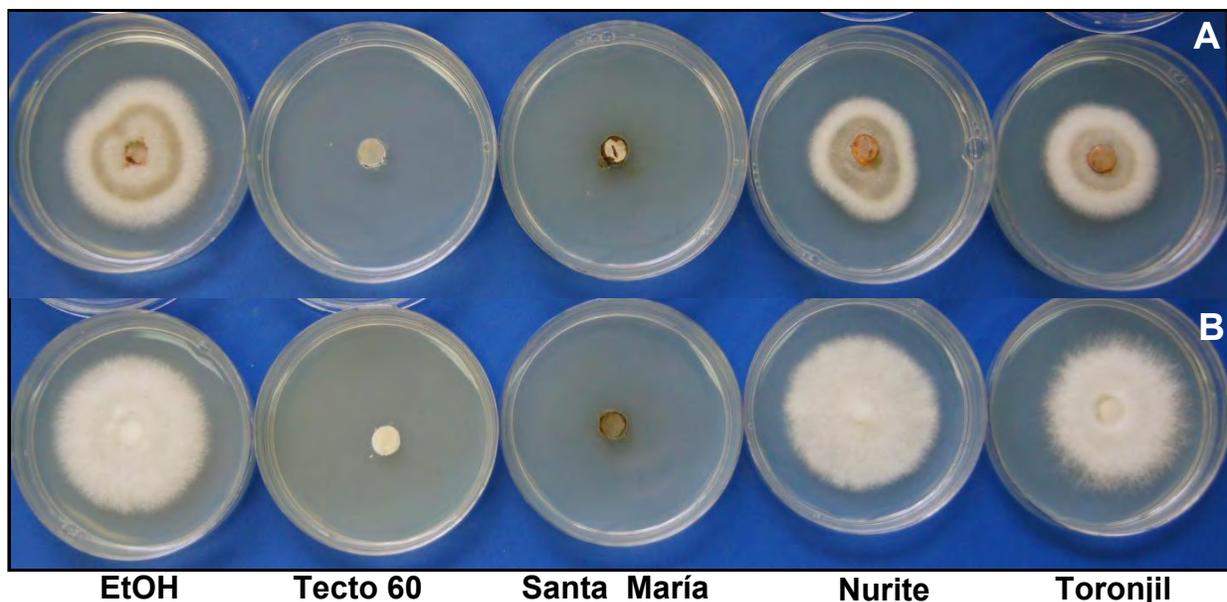


Figura 3. Bioensayos *in vitro* con el método de difusión en placa con 25 μ L de etanol absoluto, 1.0 mg/mL de extracto de Santa María, Nurite, Toronjil y Tecto 60 en *C. acutatum* (A) y *B. cinerea* (B), a los 8 días de cultivo.

Los compuestos responsables más estudiados en *Tagetes spp* son de naturaleza terpenoide, compuestos volátiles con amplia actividad antifúngica como metil chavicol, metil eugenol (Marotti *et al.*, 2004), estragol, anetol y mirceno, entre otros (Ciccío, 2004).

Con estos resultados, pudo demostrarse el efecto antifúngico de los tres extractos vegetales, los porcentajes de inhibición fueron dependientes de la planta medicinal, considerando al extracto de Santa María (*T. lucida*) como el más efectivo por presentar un 100% de inhibición sobre ambos hongos en estudio.

El trabajo de escrutinio como el realizado en la presente investigación, permite elegir plantas con alto potencial antifúngico. En el siguiente apartado, se procedió a la identificación de los compuestos activos del extracto con mayor efecto, la selección de la fracción más activa y el componente mayoritario con mayor actividad antifúngica. Así como la determinación de la concentración mínima inhibitoria de éstos.

CONCLUSIÓN

Con la evaluación de las propiedades antifúngicas de los extractos de nurite, Santa María y toronjil sobre el crecimiento de *B. cinerea* y *C. acutatum*, bajo condiciones *in vitro*, se seleccionó el extracto de *T. lucida* (Santa María) como el de mayor efecto fungicida.

LITERATURA CITADA

Abreu-Guirado, O.A. y Cuéllar-Cuéllar A. 2008. Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. Rev. Cubana Plant. Med., 13(3):1-9.

Apablaza, G., Díaz M., San Martín R. y Moya E. 2002. Control de oídio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de Quillay (*Quillaja saponaria*). Ciencia e Investigación Agraria, 29:83-90.

Badii, M.H., Flores A.E., Foroughbakhlela R., Quiroz H. y Torres R. 1996. Ecología del manejo integrado de plagas (MIP) con observaciones sobre control microbiano de insectos. Publicación Universidad Autónoma de Nuevo León. Avances Recientes en la Biotecnología de *Bacillus thuringiensis*. pp. 21-49.

Bello, G.M.A., Molina T.J., Calderón M.J., García Ch.A., Salgado G.R. 2006. Propiedades antimicrobianas y análisis fitoquímico de seis plantas medicinales de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. 2º Congreso de Investigación Científica. UMSNH, Morelia, Michoacán, México.

Céspedes, C.L., Ávila G.J., Martínez A., Serrato B., Calderón-Múgica J.C. y Salgado-Garciglia R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). J. Agric. Food Chem., 54:3521-3527.

Ciccío, J. F. 2004. A source of almost pure methyl chavicol: Volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. Revista de Biología Tropical, 52(4):853-857.

Damián-Badillo, L.M., Salgado-Garciglia R., Martínez-Muñoz R.E. y Martínez-Pacheco M.M. 2008. Antifungal properties of some Mexican medicinal plants. The Open Natural Products Journal, 1:27-33.

FAOSTAT, 2006. Database Gateway 2006 <http://apps.fao.org/lim500/nphwrap.pl>. Production.Crops.Primary&Domain=SUA&Language=espanol&servlet=1.

Fiori, A.C.G., Schwan-Estrada K.R.F., Stangarlin J.R., Vida J.B., Scapim C.A., Cruz M.E.S. y Pascholati S.F. 2000. Antifungal activity of leaf extracts and

essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. J. Phytopathol.,148:483-487.

Lara, O.F. y Márquez C.A. 1996. Plantas medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de Mexico. México, D. F. pp.1-5.

Marotti, M., Piccaglia R., Biavati B. y Marotti I. 2004. Caracterización and yied evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. J. of Essential Oil Research, 16:440-444.

SAGARPA, 2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.sagarpa.gob.mx

Serrato, C.M.A. y Quijano M.L. 1993. Usos de algunas especies de *Tagetes*: revisión bibliográfica (1984 –1992). En: Proceedings of the I International Symposium and II National Meeting of Sustainable Agriculture: Importance and contribution of traditional agriculture. CEICADAR, Puebla, México. pp. 228-238.

Steel, R.G.D. y Torrie J.H. 1980 Principles and procedures of statistics: A biomedical approach (2nd Ed.) McGraw-Hill Book Co., New York 622p.

Trease, G. y Evans W. 1991. Farmacognosia. México, D.F., Interamericana McGraw-Hill. 910 p.

4.2. Identificación y cuantificación de los componentes volátiles del extracto hexánico y la fracción con mayor actividad fungicida de *Tagetes lucida* Cav. (Santa María)

RESUMEN

El extracto hexánico de *Tagetes lucida* Cav. (Santa María) fue analizado por cromatografía de gases y espectrometría de masas (CG-EM), determinando como mayoritarios a los compuestos terpénicos, metil eugenol (64%), estragol (29.4%), β -linalol (2.3%), mirceno (2.1%), *o*-cimeno (1.3%) y acetato de geraniol (0.9%). Para determinar los compuestos activos, el extracto fue sometido a fraccionamiento por cromatografía en columna, obteniendo 10 fracciones, las cuales fueron usadas en ensayos antifúngicos a una concentración de 0.1 mg/mL, encontrando que la fracción F5 ejerció un 100% de inhibición tanto en *B. cinerea* y *C. acutatum*, similar al efecto antifúngico del extracto (100% de inhibición). Las demás fracciones no ejercieron efecto inhibitorio mayores al 15.6% sobre ambos hongos por lo que no fueron consideradas antifúngicas. El 94.4% del contenido de la fracción F5 correspondió a metil eugenol, aunque presentó los compuestos β -linalol y estragol en cantidades menores (1.6 y 4.1%, respectivamente). El metil eugenol se considera como el responsable de esta actividad, ya que el contenido de éste en el extracto hexánico también es el mayoritario (64%) y debido a que en una concentración de 1 mg/mL produce una inhibición del 100% sobre el crecimiento de ambos hongos, resultado igual que ejerce el extracto y la fracción F5.

Palabras clave: Aceite esencial, antifúngicos, metil eugenol, terpenos, *T. lucida*.

INTRODUCCIÓN

Los aceites esenciales son una compleja mezcla natural de metabolitos secundarios volátiles, aislados de plantas mediante diversos métodos de extracción con solventes. Los principales constituyentes de los aceites esenciales son mono y sesquiterpenos, incluyendo carbohidratos, éteres, aldehídos y cetonas, los que son responsables de la fragancia y propiedades biológicas de las plantas medicinales.

Los compuestos volátiles, en particular los de origen terpénico, son responsables de la actividad antimicrobiana contra diversas bacterias, oomicetes y hongos. Durante mucho tiempo se han utilizado en el campo de la cosmética, en la elaboración de perfumes, la conservación de alimentos y aromaterapia (Kalemba y Kunicka, 2003; Contreras *et al.*, 2006).

Dada la riqueza de la flora de México, *Tagetes lucida* es una planta que crece en forma silvestre desde el Noroeste de México hasta Honduras, siendo utilizada como medicinal por ciertas comunidades rurales debido a que se le atribuyen propiedades antiespasmódicas, antisépticas, antidiarreicas, antiinflamatorias, carminativas, diuréticas y febrífugas, pero el aceite esencial aún no ha sido aplicado como antifúngico (Nash, 1976; Martínez, 1997). La composición química de *T. lucida* indica la presencia de compuestos volátiles como limoneno, mirceno, estragol, timol y eugenol (Cáceres, 1996), reportados con actividad antimicrobiana. Se ha demostrado su actividad antibacteriana con inhibición sobre *E. coli*, *S. typhi* y *P. aeruginosa*, así como un efecto antifúngico contra *Candida albicans*, *C. krusei*, *C. parapsilosis* y *C. stellatoidea* (Abdala, 1999; Hernández *et al.*, 2006).

Sus propiedades contra hongos fitopatógenos ha sido estudiado, el extracto hexánico tiene un 100% de inhibición sobre *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum acutatum*, hongos patógenos de fresa (Capítulo 1). Los compuestos responsables de esta actividad se desconocen así como la concentración efectiva de cada uno de ellos, por lo que es importante identificar y cuantificar los compuestos volátiles del extracto de *T. lucida*, objetivo principal de la presente investigación.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Los hongos *B. cinerea* y *C. acutatum* se cultivaron en el medio PDA (papa-dextrosa-agar) a 28°C. Las siembras se realizaron cada 15 días, por el método de resiembra sucesiva por micelio en cajas de Petri. Estas cepas fueron donadas por los

laboratorios de Fitobioquímica (CINVESTAV Campus Guanajuato) y de Fisiología Molecular de Hongos del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, respectivamente.

Separación de fracciones por cromatografía en columna

El extracto hexánico de Santa María (*T. lucida*), seleccionado por su alta actividad antifúngica (Sección 4.1.), fue sometido a cromatografía en columna para la separación en fracciones. En una columna de vidrio (50 cm de largo, 1 cm de diámetro) empacada con gel de sílice (60 Å) con hexano, se realizó la separación cromatográfica, agregando una cantidad de 5 mg del extracto disuelto en 5 mL del solvente eluyente que consistió en una mezcla de cloroformo:metanol en la proporción 2:1.

El fraccionamiento se realizó por la separación de volúmenes de 5 mL, obteniendo 10 fracciones, las cuales fueron llevadas a cromatografía en capa fina para determinar de forma cualitativa la presencia y separación de compuestos terpénicos. La cromatografía en capa fina fue realizada en placas de gel de sílice (60Å, con fluoresceína) de 5 x 10 cm, utilizando la mezcla de solventes hexano:acetato de etilo:metanol 60:40:1 y revelando con luz ultravioleta ($\lambda=254$ nm).

Cada fracción fue probada mediante bioensayos antifúngicos para seleccionar la de mayor efecto. Tanto el extracto como la fracción más activa fueron analizadas por cromatografía de gases acoplada a espectrometría de masas para la identificación y cuantificación de los compuestos volátiles activos.

Ensayo antifúngico de fracciones

Estos ensayos se realizaron mediante la técnica de difusión en placa y con el método de discos impregnados con cada una de las fracciones, tanto con *B. cinerea* como con *C. acutatum*. Cada uno de las fracciones se preparó en una concentración de 0.1 mg/mL, removiendo la mezcla de solventes y diluyendo con etanol absoluto.

Para el primer método se llevó a cabo la aplicación de 50 μ L del extracto en pozos realizados mediante sacabocado en el medio de cultivo sólido PDA, para posteriormente sembrar un segmento de micelio (disco de 0.5 cm de diámetro), realizando los ensayos en cajas petri de 5 cm de diámetro por separado; el segundo método consistió en impregnar discos de papel filtro Whatman No. 5 (0.5 cm de diámetro) con 25 μ L de cada fracción, los cuales se colocaron sobre el medio nutritivo, donde posteriormente se sembró un segmento de micelio (disco de 0.5 cm de diámetro) de cada hongo, éstos fueron realizados en cajas petri de 10 cm. Cada experimento se realizó con una n=6.

Como control positivo sobre la inhibición del crecimiento de los hongos en estudio, se utilizó 25 μ L del fungicida comercial Tecto 60 (1 mg/mL), para conseguir un 100% de inhibición. La adición de etanol absoluto (25 μ L) fue utilizado como control negativo.

Los cultivos fueron incubados a 28°C, determinando en ambos métodos, el crecimiento del micelio sobre cada una de las fracciones a los 8 días del cultivo, tiempo de máximo crecimiento de los hongos en medio PDA. Estos valores se presentan en porcentaje (%), tomando como control el crecimiento de cada hongo sobre etanol absoluto, con un 100% de crecimiento de micelio (0% de inhibición).

Ensayo antifúngico con metil eugenol

Este ensayo fue realizado por el método de discos impregnados, como se indicó previamente. El ensayo consistió en determinar el efecto sobre la inhibición del crecimiento tanto de *B. cinerea* como de *C. acutatum*, del extracto hexánico, de la fracción F5 y de metil eugenol puro comercial (Sigma-Aldrich, México®), todos en una concentración de 0.1 mg/mL. Se usaron los controles positivo (Tecto 60) y negativo (etanol absoluto).

Cromatografía de gases-Espectrometría de masas (CG-EM)

El análisis del extracto hexánico de *T. lucida* y la fracción más activa se realizó mediante la inyección de 1 μ L en un cromatógrafo de gases Agilent (HP6890) equipado con un detector de masas (HP5973). El cromatógrafo se operó usando helio como gas acarreador con un flujo de 1mL/min, con inyección dividida (split 60.3:1) a una temperatura de 220°C, en una columna capilar no polar HP5MS (25m x 25mm x 25 μ m), usando el siguiente programa de temperatura en el horno: una temperatura inicial de 60°C, seguida de una rampa de 5°C/min para llegar a una temperatura de 200°C y otra rampa de 25°C/min para llegar a una temperatura final de 300°C.

Para la identificación de los compuestos mayoritarios, el espectrómetro de masas se operó a una velocidad de flujo de 1mL/min, con un voltaje de ionización a 70eV, a una temperatura de la interfase de 280°C, en modo SCAN y en un rango de masas de 35-500m/z.

La pureza y confirmación de cada compuesto identificado se obtuvieron utilizando la base de datos NIST02 (National Institute of Standards and Technology). Solo se aceptaron los picos con pureza de pico de uno y la identificación de espectros con concordancia por arriba del 90%. La cuantificación de los compuestos activos se calculó con el método de área para obtener el porcentaje de los compuestos, utilizando como estándar externo los compuestos metil eugenol y estragol (Sigma-Aldrich) (Anexo I). Estas concentraciones relativas se reportaron en porcentajes para todos los compuestos identificados y en mg/mL para los compuestos metil eugenol y estragol.

La identificación con estándares de Sigma-Aldrich solo se realizó para el β -mirceno, 3-careno, linalool, estragol y metil eugenol, estándares que se inyectaron en las mismas condiciones en las que se analizó el extracto hexánico de *T. lucida* y cada una de las fracciones.

Para calcular los índices Kovats se inyectó 1.0 µL de una serie de alcanos puros (Sigma Aldrich) C8-C20 en el cromatógrafo de gases Agilent 6890 acoplado a un espectrómetro de masas Agilent 5973 (CG-MS), en las mismas condiciones en las que se analizaron las muestras. Estos Índices Kovats (Cuadro 3) se compararon con los reportados en la literatura (Adams, 2007).

Análisis estadístico

Todos los datos fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$), utilizando la prueba de diferenciación de medias de TUKEY. Para los ensayos antifúngicos *in vitro*, se analizó una $n=6$. Para realizar la prueba de ANOVA, los datos de los experimentos se transformaron con la fórmula siguiente (Steel y Torrie, 1980):

$$\sqrt{X + 0.5}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El resultado de la cromatografía en columna para la separación de compuestos volátiles del extracto hexánico de *T. lucida*, dio como resultado 10 fracciones, las cuales fueron analizadas por cromatografía en capa fina, observando la separación de grupos de compuestos en 7 de ellas, al revelar con luz UV (Figura 1). Las fracciones 5 y 6 (F5 y F6) fueron las de mayor cantidad de compuestos, no encontrando señal de fluorescencia después de la fracción 7 (F8-F10), por lo que solo las primeras 7 fracciones fueron utilizadas en los ensayos antifúngicos.

Efecto antifúngico de las fracciones del extracto de *T. lucida*

Cada una de las fracciones (F1-F7) fueron aplicadas bajo los dos métodos de bioensayos *in vitro*, observando un efecto nulo o mínimo sobre el crecimiento tanto de *B. cinerea* como de *C. acutatum* al aplicar las fracciones F1, F2, F3, F4,

F6 y F7. Con la aplicación de éstas, utilizando el método de difusión en placa, se obtuvo el máximo crecimiento de diámetro de cada hongo, de 3.5 a 3.8 cm en *C. acutatum* y de 5 cm en *B. cinerea*, similar al crecimiento observado al aplicar etanol absoluto (control negativo), con 0% de inhibición (Cuadro 1, Figura 2). La fracción F5 presentó un 100% de inhibición del crecimiento en ambos hongos, no observando crecimiento del micelio. La fracción F6 también mostró inhibición sobre el crecimiento de los dos hongos, aunque solo del 14.3% en *C. acutatum* y del 6% en *B. cinerea* (Cuadro 1, Figura 2).

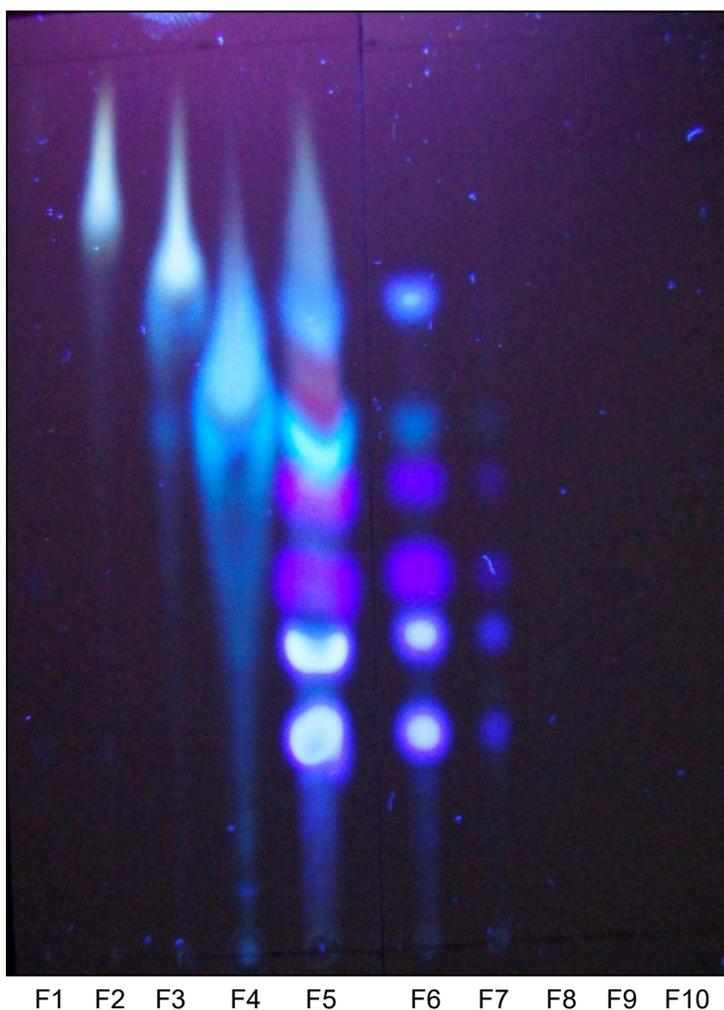


Figura 1. Fotografía de placa cromatográfica de capa fina con revelado de luz UV ($\lambda=254\text{nm}$) de las fracciones obtenidas por cromatografía en columna, del extracto hexánico de *T. lucida*.

Cuadro1. Efecto de las fracciones del extracto hexánico de Santa María sobre el crecimiento (cm) en *C. acutatum* y *B. cinerea* a los 8 días de cultivo, mediante el ensayo de difusión en placa.

Fracciones / Tratamiento	<i>C. acutatum</i>		<i>B. cinerea</i>	
	Crecimiento (cm)	Inhibición (%)	Crecimiento (cm)	Inhibición (%)
F1	3.5 ± 0.3	0	5 ± 0.2	0
F2	3.5 ± 0.3	0	5 ± 0.1	0
F3	3.8 ± 0.2	0	5 ± 0.1	0
F4	3.7 ± 0.2	0	5 ± 0.2	0
F5	0	100*	0	100*
F6	3 ± 0.2	14.3	4.7 ± 0.3	6
F7	3.5 ± 0.3	0	5 ± 0.2	0
Etanol Abs.	3.5 ± 0.3	0	5 ± 0.1	0
Tecto 60 [1 mg/mL]	0.5 ± 0.2	90	0.5 ± 0.1	90

*Indica diferencia significativa (n=6, p<0.05).

La fracción F5 presentó un 100% de inhibición del crecimiento en ambos hongos, no observando crecimiento del micelio. La fracción F6 también mostró inhibición sobre el crecimiento de los dos hongos, aunque solo del 14.3% en *C. acutatum* y del 6% en *B. cinerea* (Cuadro 1, Figura 2).

Los bioensayos con el método de sensidiscos mostraron resultados similares, corroborando el mayor efecto antifúngico de F5 con un 100% de inhibición en ambos hongos. Las fracciones F2 y F6 ejercieron un ligero porcentaje de inhibición en *C. acutatum* (6.6 y 13.3%, respectivamente), sin embargo en *B. cinerea* solo la fracción F1 no tuvo un efecto antifúngico, las demás mostraron porcentajes de inhibición menores al 16% (Cuadro 2, Figura 3).

Es importante notar que el efecto fungicida de F5 aún es mayor que el producido por el fungicida comercial Tecto 60, el cual a la concentración de 1 mg/mL no alcanzó el 100% de inhibición, tanto en *C. acutatum* como en *B. cinerea*.

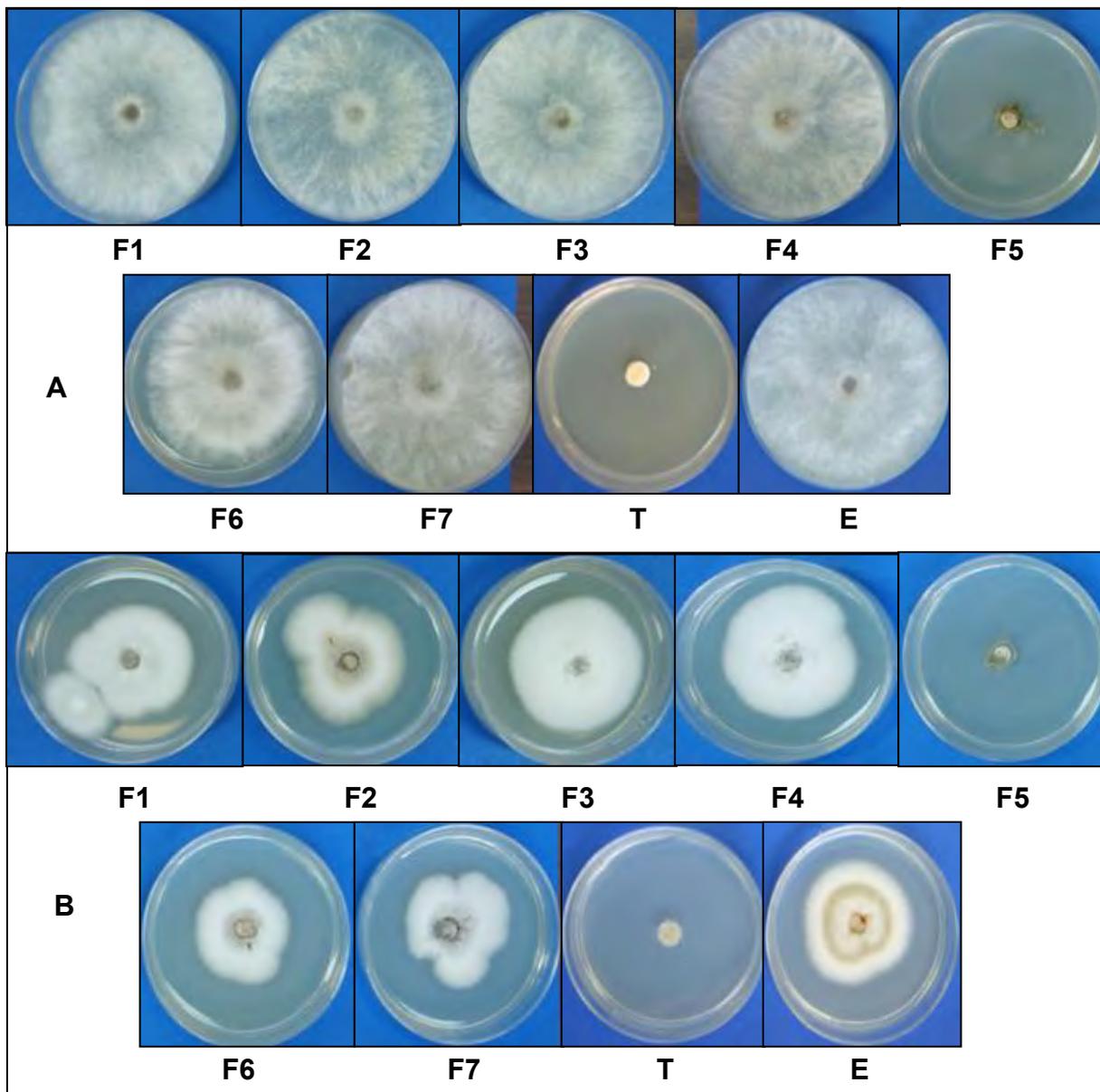


Figura 2. Bioensayos *in vitro* con el método de difusión en placa aplicando 25 μ L de cada fracción (F1 – F7), 50 μ L de etanol absoluto (E) y 1.0 mg/mL de Tecto 60 (T), tanto en *B. cinerea* (A) y *C. acutatum* (B), a los 8 días de cultivo.

Cuadro 2. Efecto de las fracciones del extracto hexánico de Santa María sobre el crecimiento (cm) en *C. acutatum* y *B. cinerea* a los 8 días de cultivo, mediante el ensayo de sensidiscos.

Fracciones / Tratamiento	<i>C. acutatum</i>		<i>B. cinerea</i>	
	Crecimiento (cm)	Inhibición (%)	Crecimiento (cm)	Inhibición (%)
F1	3 ± 0.3	0	3.2 ± 0.2	0
F2	2.8 ± 0.3	6.6	2.7 ± 0.3	15.6
F3	3 ± 0.2	0	2.8 ± 0.2	12.5
F4	3 ± 0.2	0	2.7 ± 0.3	15.6
F5	0	100*	0	100*
F6	2.6 ± 0.2	13.3	3 ± 0.3	6.25
F7	3 ± 0.2	0	2.8 ± 0.3	12.5
Etanol Abs.	3 ± 0.3	0	3.2 ± 0.2	0
Tecto 60 [1 mg/mL]	0.5±0.2	83	0.5±0.2	84.4

*Indica diferencia significativa (n=6, Tukey, $\alpha=0.05$).

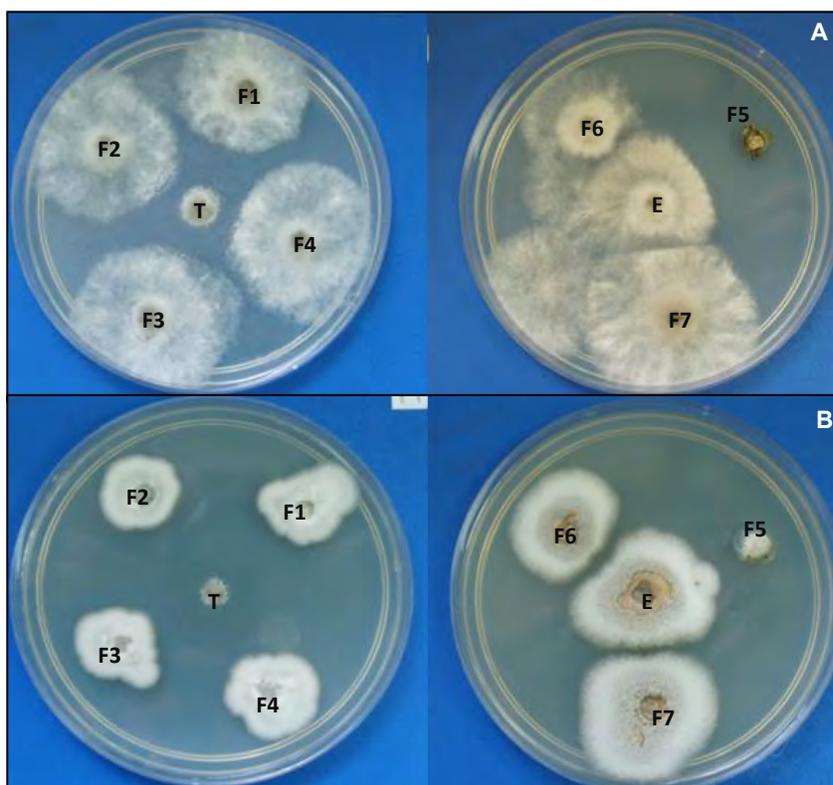


Figura 3. Bioensayos *in vitro* con el método de sensidiscos aplicando 25 μ L de cada fracción (F1 – F7), 50 μ L de etanol absoluto (E) y 1.0 mg/mL de Tecto 60 (T), tanto en *B. cinerea* (A) y *C. acutatum* (B), a los 8 días de cultivo.

Identificación y cuantificación de compuestos activos

El extracto hexánico de *T. lucida* y cada una de las fracciones analizadas por CG-EM, mostraron compuestos volátiles como mayoritarios, todos de tipo terpénico. Los compuestos estragol (29.4%) y metil eugenol (64%) fueron los de mayor contenido en el extracto, en menor concentración se identificaron el mirceno (2.1%), α -cimeno (1.3%), β -linalol (11.19%) y acetato de geraniol (18.95%). La fracción F1 fue enriquecida con estragol (69.6%), las fracciones F2, F3 y F4 con metil eugenol y estragol, las fracciones F5 y F6 con solo metil eugenol, en la F7 no se detectaron compuestos terpénicos (Cuadro 3).

En la fracción F5, con un 100% de inhibición antifúngica, la concentración en base al porcentaje de área del metil eugenol fue de 94.4%, 4.1% de estragol y 1.6 de β -linalol. En esta fracción, mediante la cuantificación por estándar externo (Anexo I), se determinó el contenido del metil eugenol y el estragol en la fracción F5, encontrando 208.621 $\mu\text{g/mL}$ y 17.555 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Cuadro 3).

Cuadro 3. Contenido de los compuestos terpénicos identificados en el extracto hexánico y fracciones de *T. lucida*.

Compuesto	Tiempo de retención (min)	Concentración (% de área)								IK
		Ext. Hex	F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7	
Mirceno	8.22	2.1	5.9	2.2	0.8	0.8	NP	0.6	NP	992
α -cimeno	9.76	1.3	2.9	1.4	0.5	0.5	NP	NP	NP	1048
β -Linalol	11.19	2.3	0.0	2.0	2.8	2.8	1.6	2.0	NP	1101
Estragol	14.13	29.4	69.6	32.0	27.5	27.5	4.1	10.4	NP	1206
Acetato de geraniol	18.95	0.9	1.0	0.9	1.0	1.0	NP	NP	NP	1383
Metil eugenol	19.67	64.0	10.2	60.3	67.5	67.5	94.4	86.9	NP	1414

NP=no presente; IK= Índice Kovats.

En la figura 4 se muestran los cromatogramas del extracto hexánico de Santa María y de la fracción F5, donde se observan los compuestos volátiles mayoritarios (Figura 4A) y el metil eugenol en una abundancia de 3,000,000 (Figura 4B), respectivamente. Asimismo, se muestra el espectro de masas específico para el metil eugenol debido a que es el compuesto mayoritario (Figura 4C).

La identificación de cada compuesto fue confirmada por espectrometría de masas, en el Anexo II se muestran los respectivos espectros de masas para cada compuesto identificado.

En el presente trabajo se orientó la búsqueda de compuestos activos a través de resultados obtenidos en ensayos realizados con fracciones del extracto hexánico de *T. lucida*. Con los resultados obtenidos, puede atribuirse al metil eugenol como el compuesto responsable de tal actividad, ya que la fracción F5 fue la que ejerció un 100% de inhibición sobre el crecimiento tanto en *B. cinerea* como en *C. acutatum*, en la que el contenido de este compuesto es la más elevada (208.621 µg/mL), que representó un 94.4% del total de compuestos de la fracción. El contenido de este compuesto en el extracto hexánico fue también el mayoritario, con un 64% del contenido total, resultado que confirma que el metil eugenol es el responsable de la actividad antifúngica contra los hongos patógenos de fresa, *B. cinerea* y *C. acutatum*.

Con el propósito de evaluar el efecto antifúngico del compuesto mayoritario metil eugenol, se realizó un bioensayo *in vitro* para comparar la inhibición sobre el crecimiento de *B. cinerea* y *C. acutatum*, del extracto hexánico de *T. lucida*, de la fracción F5 y de metil eugenol puro. En la concentración de 0.1 mg/mL del extracto hexánico, de la fracción F5 y del metil eugenol se obtuvo un 100% de inhibición en ambos hongos. Este resultado demostró que este metabolito es el principal componente del extracto hexánico de Santa María, responsable de la actividad antifúngica.

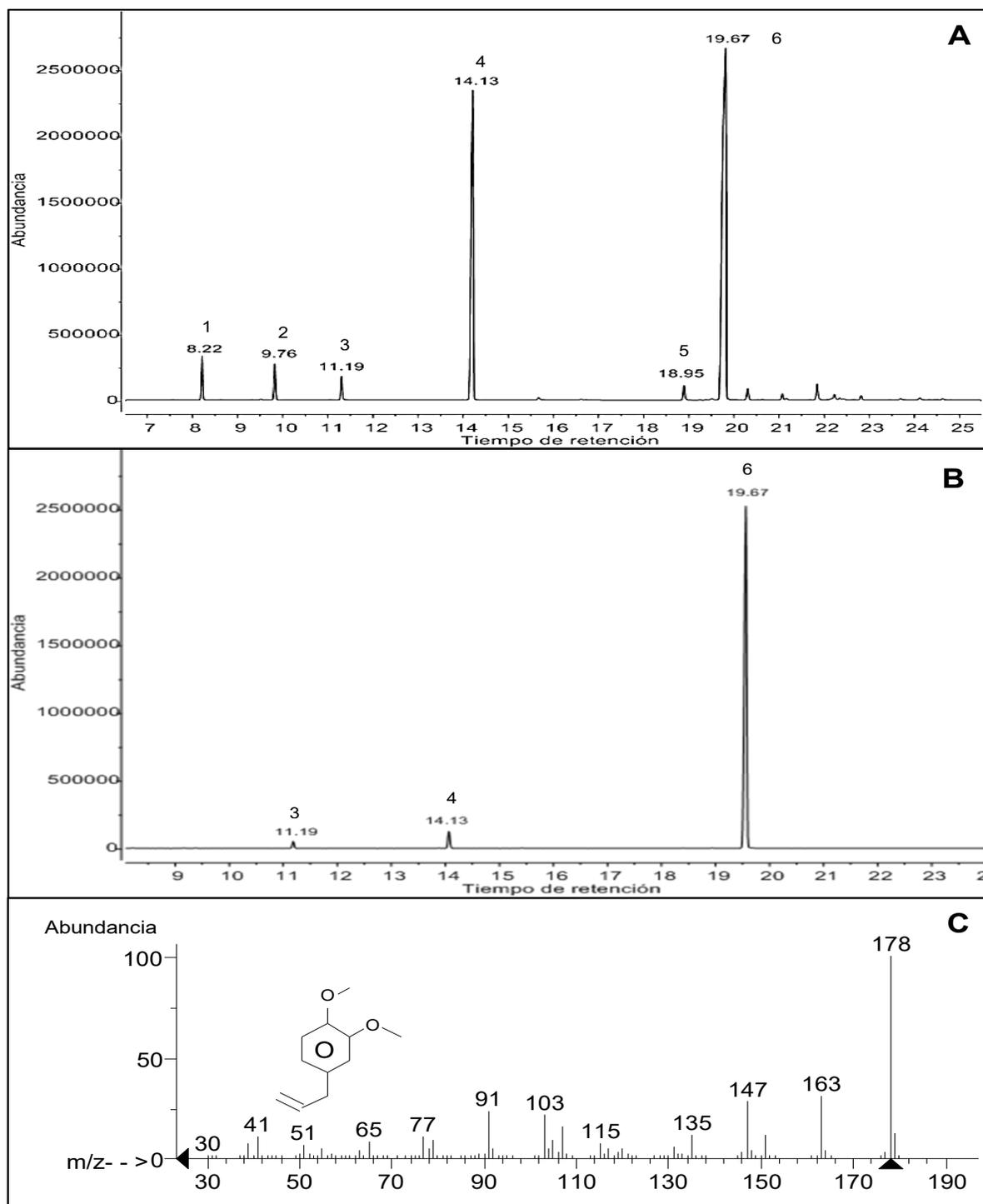


Figura 4. Cromatograma (A y B) del extracto hexánico de Santa María y de la fracción F5: 1, β -Mirceno; 2, α -cimeno; 3, β -Linalol; 4, Estragol; 5, Acetato de geraniol; 6, Metil eugenol; (C) Espectro de masas de la fracción F5 del extracto hexánico de *T. lucida*.

Este compuesto es encontrado como mayoritario en el aceite esencial de diversas plantas medicinales o aromáticas como *Echinophora sibthorpiana*, *Piper callosum*, *Pimenta pseudocaryophyllus*, *Laurus nobilis* y *Asarum heterotropoides*, entre otras más, con propiedades antifúngicas. A los extractos de estas plantas se les atribuyen propiedades antifúngicas o antioomiceto, ya que inhiben el crecimiento *in vitro* de *Candida* spp (Leite-Lima *et al.*, 2006), *Phyphthoptora palmivora* y *P. capsici* (Silva y Bastos, 2007); *Botrytis cinerea* y *Monilinia laxa* (De Corato *et al.*, 2010); y *Alternaria humicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Rhizoctonia solani*, *Phytophthora cactorum* y *Fusarium solani* (Dan *et al.*, 2010).

La capacidad antifúngica de este tipo de compuestos, monoterpenos fenólicos como el metil eugenol, puede ser atribuida a la reactividad de los grupos hidroxilofenólicos, ya que forman enlaces puentes de hidrógeno con sitios activos de ciertas enzimas del metabolismo secundario, se ha demostrado que inhiben la síntesis de esteroides en varias especies de *Candida* (Ahmad *et al.*, 2010). Además, estos compuestos atacan la membrana citoplasmática de microorganismos, destruyendo la capacidad selectiva y permitiendo el escape de componentes intracelulares (Nychas, 1995), lo que sumado a su capacidad de inactivar enzimas, explicaría la actividad contra el desarrollo fúngico.

El extracto hexánico de *T. lucida*, la fracción activa o bien el compuesto mayoritario (metil eugenol), debido al efecto antifúngico mostrado, poseen un potencial fungicida capaz de controlar el desarrollo de la enfermedad ocasionada tanto por *B. cinerea* como por *C. acutatum*, al aplicar 0.1 mg/mL, concentración considerada como la letal 100% (CL100).

CONCLUSIÓN

Los metabolitos mayoritarios del extracto hexánico de *T. lucida* son el metil eugenol y el estragol, la fracción F5 mayormente contiene el metil eugenol (94.4%, 208.621 µg/mL), por lo que se le atribuye ser el responsable de la actividad fungicida. Este metabolito ejerce un 100% de inhibición al aplicar 0.1 mg/mL.

LITERATURA CITADA

Ahmad, A., Khan A., Manzoor N. y Khan L.A. 2010. Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial Pathogenesis*, 48(1):35-41.

Abdala, L.R. 1999. Flavonoids of the aerial parts from *Tagetes lucida* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 27:753-754.

Cáceres, A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Edit. Universitaria, Guatemala, p. 402.

Contreras, N., Martínez J. y Stashenko E. 2006. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites volátiles de cuatro plantas de uso tradicional mediante la medición de la peroxidación lipídica de aceite. *Scientia et Technica*, 30:365-370.

Dan, Y., Liu H. Y., Gao W.W. y Chen Sh.L. 2010. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. *Crop Protection*, 29(3):295-299.

De Corato, U., Maccioni O., Trupo M. y Di Sanzo G. 2010. Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. *Crop Protection*, 29(2):142-147.

Hernández, T., Canales M., Flores C., García A.M., Durán A. y Ávila J.G. 2006. Antimicrobial activity of *Tagetes lucida*. *Pharmaceutical biology*, 44:19-22.

Kalemba, D. y Kunicka A. 2003. Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-29.

Kivanç, M. 2006. Antimicrobial activity of "Çörtük" (*Echinophora sibthorpiana* Guss.) spice, its essential oil and methyl-eugenol. *Molecular Nutrition and Food Research*, 32(6):635-637.

Leite-Lima, M.E., Cordeiro I., Marx-Young M.C., Sobra M.E.G. y Moreno P.R.H. 2006. Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum (Myrtaceae) native from Sao Paulo State-Brazil. *Pharmacologyonline*, 3:589-593.

Martínez, J.V. 1997. Contribuciones al conocimiento integral del pericón *Tagetes lucida* Cav. En Guatemala. Edit. Universitaria, Guatemala, p.25.

Nash, D.L. 1976. Flora of Guatemala. *Fieldiana:Botany*, 24(12):383-384.

Nychas, G. J. E. 1995. Natural antimicrobials from plants. En: *New methods of food preservation* (Gould G.W., Ed.), Chapman y Hall, London, UK. Capítulo 4:59-89.

Silva, D.M.H. y Bastos C.N. 2007. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. *Fitopatologia Brasileira*, 32:143-145.

Steel, R.G.D. y Torrie J.H. 1980 Principles and procedures of statistics: A biomedical approach (2nd Ed.) McGraw-Hill Book Co., New York 622p.

4.3. Determinación del efecto antifúngico del extracto hexánico y fracción activa de *Tagetes lucida* Cav. en plántulas de fresa

RESUMEN

Los estudios con extractos hexánicos de Santa María (*Tagetes lucida* Cav.) han demostrado su actividad antifúngica *in vitro* en *Botrytis cinerea* y en *Colletotrichum acutatum*, patógenos de fresa, la cual se explica fundamentalmente por la presencia de compuestos volátiles, particularmente por el metil eugenol. En esta investigación se realizaron estudios para determinar dicha actividad en ensayos *in vivo*, utilizando el método de infección con esporas de ambos hongos en plántulas de fresa cultivadas *in vitro*. Primeramente se determinó la concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hexánico de Santa María con ensayos antifúngicos *in vitro*, utilizando diferentes concentraciones en base al metil eugenol (0.1, 0.05, 0.01 y 0.005 mg/mL). Los resultados mostraron que la CMI del extracto fue 0.05 mg/mL, con la que se comprobó el efecto antifúngico en ensayos de germinación de esporas y en plántulas de fresa *in vitro* inoculadas con esporas (1×10^3 /mL) tanto de *B. cinerea* como de *C. acutatum*. La germinación de las esporas de ambos hongos fue inhibida en un 100% después de una hora de incubación, aplicando 0.05 mg/mL de metil eugenol en el extracto hexánico, de la fracción activa F5 y del metil eugenol de referencia. En plántulas de fresa cultivadas *in vitro* pudo comprobarse el efecto antifúngico del extracto hexánico y de la fracción F5, ya que no se presentaron síntomas de la enfermedad. Este mismo efecto fue observado al aplicar 0.05 mg/mL de metil eugenol.

Palabras Clave: antifúngico, ensayo *in vivo*, fresa, metil eugenol, Santa María.

INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria x ananassa*) al igual que otros cultivos es afectado por numerosas enfermedades que causan grandes pérdidas durante su crecimiento, desarrollo y producción (Fraire *et al.*, 2003; Guédez *et al.*, 2009). Durante el desarrollo de la

planta, las enfermedades fungosas son las más comunes, dentro de las más importantes está el moho gris y la antracnosis, causadas por *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum acutatum*, respectivamente. *B. cinerea* ataca hojas, flores y frutos, produciendo manchas en donde se forma una masa polvosa grisácea. La antracnosis se caracteriza por pudriciones en los pecíolos y folíolos causando marchitamiento y muerte de hojas y raíces (Sutton, 1995; Tello *et al.*, 1996).

La necesidad de desarrollar métodos de control de hongos fitopatógenos con métodos seguros y compatibles con los principios del control integrado y la sustentabilidad de la agricultura, ha llevado a la búsqueda del uso y aplicación de extractos vegetales o principios activos derivados de éstos, como una alternativa más ecológica (Fiori *et al.*, 2000; Aplablaza *et al.*, 2002; Singh *et al.*, 2004). De esta manera, el uso de productos antifúngicos de origen vegetal ha tomado gran importancia, aunque actualmente éstos todavía no son altamente comercializados, probablemente debido a la falta de investigaciones o a la poca efectividad de éstos.

Entre los metabolitos de origen vegetal con propiedades antifúngicas están los terpenoides, compuestos volátiles que forman una gran parte de los llamados aceites esenciales, los cuales son producidos por las plantas aromáticas, muchas de ellas utilizadas en la medicina tradicional a nivel mundial (Bertelli *et al.*, 2003; Nguéack *et al.*, 2004; Sahin *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2007).

En una primera etapa, los ensayos *in vitro* se realizan estudios para seleccionar los extractos o metabolitos vegetales con actividad antifúngica, con los que se comprueba el efecto inhibitorio del crecimiento de micelio o la germinación de esporas en cultivos *in vitro*. Posteriormente se efectúan ensayos del control del ataque de hongos sobre partes aisladas de las plantas (hojas, tallos, raíces o frutos) o en plantas completas, que pueden ser en cultivos *in vitro*, en invernadero o en campo. Con este tipo de estudios, se ha demostrado el efecto antifúngico de extractos o compuestos volátiles de *Origanum vulgare*, *Zingiber officinale* y *Tradescantia spathacea*, que inhiben el crecimiento tanto *in vitro* como en campo de

hongos como *Colletotrichum gloeosporioides*, *C. acutatum* y *C. lindemuthianum* (Bertelli *et al.*, 2003; Nguetack *et al.*, 2004; Sahin *et al.*, 2004).

En los estudios mencionados en anteriores subcapítulos, se ha demostrado la actividad antifúngica del extracto hexánico de *Tagetes lucida*, siendo el metil eugenol el principio activo. En esta investigación se determinó la CMI del extracto activo en bioensayos *in vitro* con *B. cinerea* y *C. acutatum*, así como el efecto sobre la germinación *in vitro* de esporas de ambos hongos. También se realizaron ensayos *in vivo*, aplicando esporas de ambos hongos en plantas de fresa cultivadas *in vitro*, para determinar el efecto del extracto activo, de la fracción F5 y del metil eugenol utilizando la concentración mínima inhibitoria.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material biológico

Los hongos *B. cinerea* y *C. acutatum* se cultivaron en el medio PDA (papa-dextrosa-agar) a 28°C durante 15 días para asegurar la formación y liberación de esporas. Estas cepas fueron donadas por los laboratorios de Fitobioquímica (CINVESTAV Campus Guanajuato) y de Fisiología Molecular de Hongos del Instituto de Investigaciones Químico Biológicas de la UMSNH, respectivamente.

Las plantas de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch. Cv. Aromas), utilizadas para el ensayo *in vitro*, son plantas micropropagadas que se mantienen bajo cultivo *in vitro* en el Lab. de Biotecnología Vegetal, donde se llevó a cabo la presente investigación. Éstas se mantuvieron en crecimiento bajo condiciones de cultivo 25 ± 2°C, 16 h luz y 2000 lux por 30 días, en el medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) con 0.05 mg/L de benciladenina (BA) para obtener plántulas de 5 cm de altura, con un número promedio de 7 hojas y un desarrollo óptimo del sistema radical.

Obtención de la concentración mínima inhibitoria (CMI)

Para la obtención de la CMI, se realizó un ensayo antifúngico tanto con *B. cinerea* como *C. acutatum*, mediante el método de discos impregnados, que consistió en impregnar discos de papel filtro Whatman No. 5 (0.5 cm de diámetro) con 25 µL de del extracto hexánico en las concentraciones de 0.1, 0.05, 0.01 y 0.005 mg/mL en base al contenido de metil eugenol. Se aplicaron en el mismo ensayo, un control positivo (Tecto 60, 1 mg/mL) y un control negativo (etanol absoluto).

Cada disco se colocó sobre el medio nutritivo PDA, donde posteriormente se sembró un segmento de micelio (disco de 0.5 cm de diámetro) de cada hongo, éstos fueron realizados en cajas petri de 10 cm y cada experimento de realizó con una n=6. El crecimiento de micelio y porcentaje de inhibición fue determinado a los 8 días del cultivo. Una vez seleccionada la CMI del extracto hexánico, se probó esta concentración con la fracción F5 y con el metil eugenol de referencia o estándar (Sigma-Aldrich, México®).

Obtención de esporas

A los 15 días del cultivo tanto de *B. cinerea* como de *C. acutatum* en medio PDA en cajas Petri de 10 cm de diámetro, se adicionaron 10 mL de agua destilada bajo condiciones estériles y con una aza bacteriológica suavemente se realizó un raspado superficial para liberar los conidios. La suspensión de esporas fue extraída de los cultivos y filtrada a través de gasa estéril y se tomaron alícuotas (n=3) para el conteo de esporas en una cámara de Neubauer en microscopio óptico. Se prepararon suspensiones de conidios conteniendo 1×10^3 esporas/mL.

Efecto sobre la germinación de esporas

Para determinar el efecto del extracto hexánico de Santa María, la fracción activa F5 y el metil eugenol sobre la germinación de esporas, en un tubo Eppendorf conteniendo 100 µL de una suspensión de esporas en una cantidad de 1×10^3

esporas/mL, se aplicaron 100 μ L de cada solución en una concentración de 0.1 mg/mL de metil eugenol, obteniendo una concentración final de 0.05 mg/mL. También se aplicó el fungicida Tecto 60 (1 mg/mL) y DMSO (5%). Después de una hora de incubación a temperatura ambiente, se observaron alícuotas en el microscopio óptico para determinar el porcentaje de germinación de las esporas.

Ensayo con plantas de fresa cultivadas *in vitro*

Para este ensayo, se seleccionaron plantas de fresa homogéneas en tamaño, número de hojas y con un buen sistema radical, que fueron cultivadas en frascos de vidrio transparente de 10 cm de largo por 5 cm de diámetro, conteniendo agrolita como sustrato suplementado con medio nutritivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50% sin fuente de carbono (sacarosa) y sin agente gelificante.

Primeramente se aplicaron las esporas de ambos hongos en experimentos distintos y posteriormente cada uno de los tratamientos antifúngicos. Para evitar daños ocasionados a las hojas por el solvente del extracto, fracción activa o el metil eugenol, éste fue evaporado a sequedad total en rotavapor y resuspendido en una solución de dimetil sulfóxido (DMSO) AL 5 % (v/v, en agua). La aplicación se hizo de manera foliar con 250 μ L de cada solución en una concentración de 0.05 mg/mL, distribuyéndolos por toda la planta (n=10). Como control negativo se aplicó una cantidad igual de una solución de DMSO 5% y como control positivo se aplicó el fungicida Tecto 60 a una concentración de 1 mg/mL.

El proceso de la infección o desarrollo de la enfermedad fue evaluado cada 24 h, observando principales síntomas como marchitamiento, necrosis y muerte de las hojas, pecíolos o de la planta.

Análisis estadístico

Los datos de los bioensayos *in vitro* e *in vivo* fueron sometidos a un análisis de varianza (ANOVA, $p < 0.05$). El número de réplicas fue variable para cada

experimento. Para realizar la prueba de ANOVA, los datos se transformaron con la fórmula siguiente (Steel y Torrie, 1980):

$$\sqrt{X + 0.5}$$

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Mediante los bioensayos con discos impregnados, se aplicaron las diferentes concentraciones de extracto hexánico de *T. lucida* (0.1, 0.05, 0.01 y 0.005 mg/mL de metil eugenol) y se determinó el crecimiento del micelio a los 8 días del cultivo. Los resultados muestran un 100% de inhibición con la concentración de 0.1 mg/mL, porcentaje que se mantuvo con la concentración de 0.05 mg/mL, en ambos hongos. Con 0.01 y 0.005 mg/mL de extracto, se presentaron porcentajes de inhibición por abajo del 60%, en *B. cinerea*. En *C. acutatum*, se observó un 30% y 100% de inhibición con las concentraciones de 0.01 y 0.005 mg/mL (Cuadro 1).

Cuadro 1. Crecimiento y porcentaje de inhibición del extracto hexánico de Santa María (*T. lucida*) para determinar la CMI sobre el crecimiento de *B. cinerea* y *C. acutatum* (A los 8 días del cultivo).

Tratamiento [mg/mL]			<i>B. cinerea</i>		<i>C. acutatum</i>	
			Crecimiento (cm)	Inhibición (%)	Crecimiento (cm)	Inhibición (%)
Extracto	1	0.1	0	100*	0	100*
	2	0.05	0	100*	0	100*
	3	0.01	1.05 ± 0.3	56	1.75 ± 0.3	30
	4	0.005	1.91 ± 0.2	24	2.49 ± 0.19	0
Tecto 60	5	1.0	0	100*	0	100*
Etanol Absoluto	6	-	2.4 ± 0.2	0	2.5 ± 0.2	0

*Indica diferencia significativa (n=6, Tukey, α=0.05).

Con estos resultados se confirmó el efecto del 100% de inhibición con 0.1 mg/mL del extracto, considerada como la concentración letal para ambos hongos (CL₁₀₀), también pudo determinarse que la CMI correspondió a la concentración de 0.05 mg/mL, ya que con ésta, la inhibición aún se mantuvo al 100% para ambos hongos.

En la figura 1 se muestran los resultados de este experimento donde se observa que la inhibición disminuye en forma dependiente de la concentración, tanto para *B. cinerea* como para *C. acutatum* (Figuras 1 y 1B). A los 8 días del cultivo, se obtuvo un óptimo crecimiento de los hongos en el disco impregnado con etanol absoluto y un 100% de inhibición sobre el tratamiento con el fungicida comercial Tecto 60, se obtuvo el mismo resultado cuando se aplicaron las concentraciones de 0.1 y 0.05 mg/L del extracto de *T. lucida*. También se observa que al aplicarse las concentraciones de 0.01 y 0.005, muestran aún altos porcentajes de inhibición, lo cual corrobora el fuerte efecto inhibitorio del extracto.

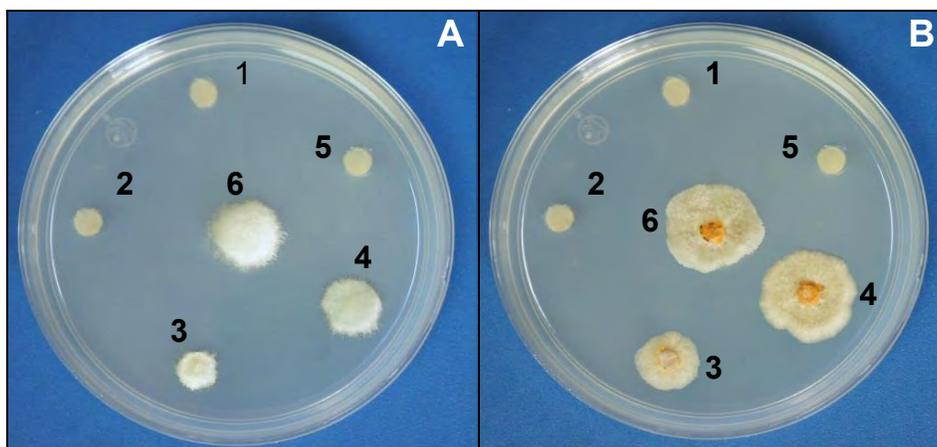


Figura 1. Bioensayos *in vitro* con el método de sensidiscos en *B. cinerea* (A) y en *C. acutatum* (B), para la determinación de la CMI aplicando el extracto hexánico de *T. lucida* en diferentes concentraciones; 1) 0.1; 2) 0.05; 3) 0.01; 4) 0.005 mg/mL; 5) Tecto 60; 6) etanol absoluto. A los 8 días de cultivo.

Con el propósito de determinar el porcentaje de inhibición que ejercen la fracción F5 del extracto hexánico de *T. lucida* y el metil eugenol, en la concentración CMI (0.05 mg/mL) del extracto, se realizaron los bioensayos en ambos hongos con el método de sensidiscos. En la figura 2 se muestran los resultados, donde se observa claramente el efecto inhibitorio del 100% de inhibición sobre *B. cinerea* (Figura 2A) y *C. acutatum* (Figura 2B) tanto de la fracción F5 como del metil eugenol, lo cual corrobora el efecto inhibitorio de la CMI, similar el ejercido por el extracto.

La CMI (0.05 mg/mL) del extracto hexánico de Santa María, la Fracción F5 y el metil eugenol, encontradas como letales (100%) son cantidades relativamente bajas si se comparan con otras de extractos vegetales reportadas. Los reportes indican efectos de 100% de inhibición con valores por arriba de 1 mg/mL de aceite esencial o de ciertos extractos vegetales, dependiendo del contenido de éstos (Momin y Nair, 2001). Sin embargo, hay metabolitos de origen vegetal que presentan actividad biocida en general en un orden de 0.001 a 0.01 mg/mL, como es el caso de la azadiractina de neem (*Azadirachta indica* Juss.) (Kumar *et al.*, 2000).

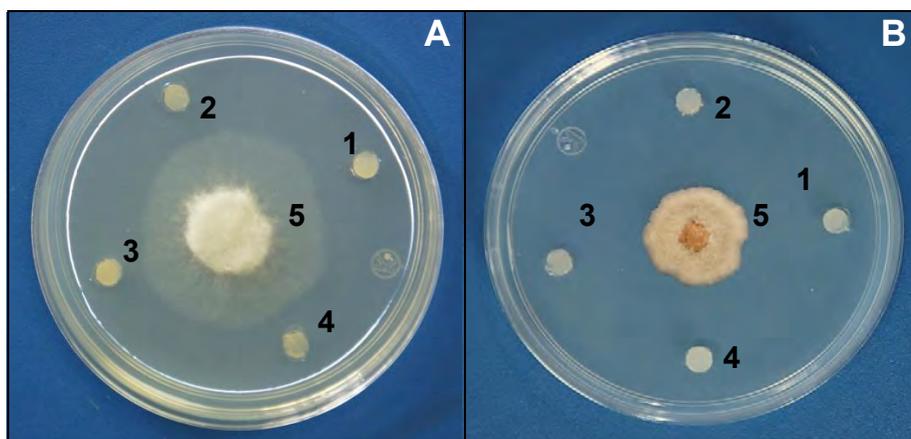


Figura 2. Bioensayos *in vitro* con el método de sensidiscos en *B. cinerea* (A) y en *C. acutatum* (B), para determinar el efecto inhibitorio con la CMI (0.05 mg/mL): 1) extracto hexánico; 2) fracción F5; 3) metil eugenol, 4) Tecto 60 (1 mg/mL); 5) etanol absoluto. A los 8 días de cultivo.

Con el fin de determinar si la CMI del extracto de *T. lucida* ejercía un efecto antifúngico, es decir que mataba al hongo, o un efecto fungistático, que solo detenía el crecimiento del micelio tanto de *B. cinerea* como de *C. acutatum*, los fragmentos de micelio cultivados por 15 días sobre discos impregnados con el extracto fueron removidos de éstos y re-cultivados sobre medio PDA sin extracto, incubándolos en condiciones óptimas de desarrollo del hongo. El efecto encontrado demostró un efecto fungicida, debido a que aún después de 15 días de cultivo de dichos fragmentos, éstos no presentaron crecimiento alguno. Observaciones al microscopio de estos fragmentos de micelio expuestos al extracto, hicieron notar una disrupción total del micelio, sin encontrar crecimiento o desarrollo de nuevas hifas (Figuras 3A, 3B, 3F y 3G).

Así mismo, se determinó el efecto del extracto, la fracción F5 y del metil eugenol, sobre la germinación de las esporas de *B. cinerea* y de *C. acutatum*. En la figura 3C y 3H se observan las conidias de *B. cinerea* y *C. acutatum* sin tratamiento, las que después de una hora de incubación con etanol absoluto, mostraron evidencias de germinación (Figuras 3D y 3I, respectivamente). Con Tecto 60, extracto hexánico, fracción F5 y metil eugenol, todos disueltos en etanol absoluto, no solo se inhibió la germinación de las esporas tanto de *B. cinerea* como de *C. acutatum*, si no que éstas se observaron destruidas. En las figura 3E y 3J, se muestra la ruptura de las esporas tanto de *B. cinerea* como de *C. acutatum*, respectivamente.

El rompimiento de las esporas, lisis o desorganización del micelio en hongos fitopatógenos se ha reportado por el efecto de algunos extractos vegetales: Apablaza *et al.* (2004) observaron este resultado al aplicar el extracto metanólico de *Quillaja saponaria* en micelio y esporas de *Erysiphe cichoracearum* y *Sphaerotheca fuliginea*; así mismo, Angulo-Escalante *et al.* (2009) observaron un efecto en la inhibición del crecimiento micelial, esporulación y alteraciones de las estructuras germinativas, al aplicar un extracto metanólico de semillas de *Swietenia humilis* sobre *Rhizopus stolonifer*, actividad que atribuyeron a la presencia de compuestos terpenoides.

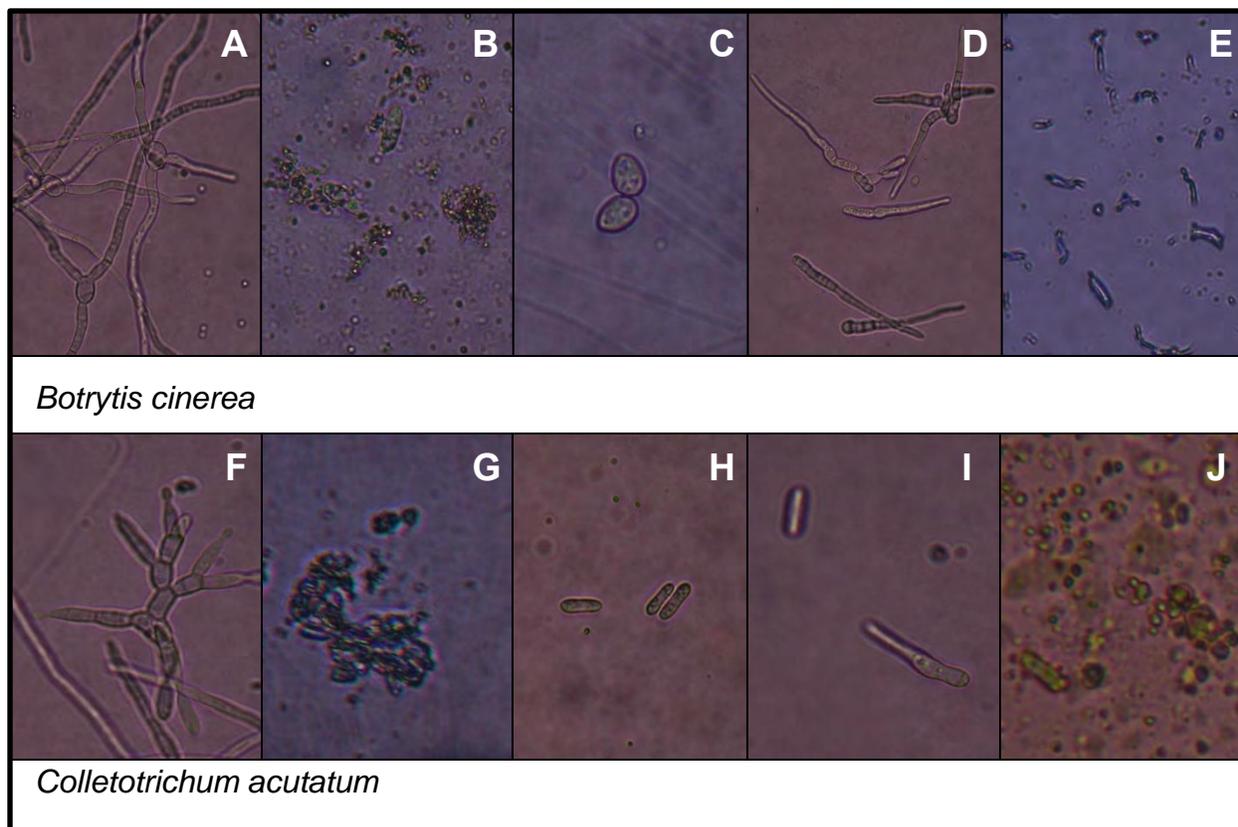


Figura 3. Efecto del extracto hexánico de *T. lucida* sobre el micelio y la germinación de esporas de *B. cinerea* y *C. acutatum*: micelio íntegro (A), micelio con extracto hexánico (B), esporas sin tratamiento (C), germinación de esporas (D) y esporas tratadas con extracto hexánico (E), de *B. cinerea*; micelio íntegro (F), micelio con extracto hexánico (G), esporas sin tratamiento (H), germinación de esporas (I) y esporas tratadas con extracto hexánico (J), de *C. acutatum*. Observaciones en microscopio óptico (60 X).

El efecto observado por el extracto, la fracción activa y el metil eugenol derivados de *T. lucida*, demuestra que la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* y de *C. acutatum*, es debido a la desorganización o ruptura celular en el micelio y la lisis de sus esporas, considerándolo como un efecto fungicida. Para determinar el efecto antigúngico *in vivo*, se aplicaron esporas tanto de *B. cinerea* como de *C. acutatum* en plantas de fresa cultivadas *in vitro*, tratándolas con la CMI del extracto hexánico de *T. lucida*, de la fracción F5 y de metil eugenol, disueltos en DMSO 5%.

En la figura 4 se observa el efecto antifúngico del extracto hexánico de *T. lucida* sobre *B. cinerea*, la fracción F5 y el metil eugenol, aplicados en la CMI (0.05 mg/L) en plantas micropropagadas de fresa bajo cultivo aséptico por 15 días en agrolita con medio nutritivo MS a la mitad de sus componentes (1/2 MS) con 20 g/L de sacarosa, sin reguladores de crecimiento. Las plantas de fresa no inoculadas, en las que se aplicó DMSO al 5%, no se observaron cambios como marchitamiento, clorosis y presencia de necrosis, mostrando un crecimiento saludable a los 15 días de cultivo (Figura 4A). Sin embargo, las que fueron inoculadas con la suspensión de esporas, desde los 5 días presentaron los síntomas iniciales de la enfermedad ocasionada por *B. cinerea*, como marchitamiento y leves lesiones necróticas en los bordes de las hojas. A los 15 días de la inoculación, las plantas observaron graves síntomas de la enfermedad con necrosis en hojas y tallo y un 100% de mortalidad (Figura 4B).

Las plántulas inoculadas, tratadas con el extracto hexánico, fracción F5 y metil eugenol solo mostraron síntomas iniciales de la enfermedad como la aparición de manchas necróticas en algunas de las hojas. El 100% de estas plantas se mantuvo viable mostrando un crecimiento y desarrollo similar a las plantas no tratadas (Figura 4C, 4D y 4E). Este crecimiento fue similar al observado cuando las plantas inoculadas fueron tratadas con el fungicida comercial Tecto 60 (Figura 4F).

Las plantas inoculadas con una suspensión de esporas de *C. acutatum* también mostraron los síntomas de la enfermedad (antracnosis) desde los 5 días del cultivo con un buen desarrollo de ésta a los 15 días del cultivo. En la figura 5 se muestran las plantas de esta fase de la experimentación, plantas no inoculadas a las que se les aplicó DMSO 5% con un crecimiento óptimo (Figura 5A); plantas inoculadas tratadas con DMSO 5%, con un 100% de mortalidad de las plantas, las que mostraron primeramente manchas cloróticas con necrosis en el borde, las cuales finalmente murieron (Figura 5B); las plantas de fresa tratadas con el extracto hexánico, fracción F5 y el metil eugenol con la CMI, no presentaron síntomas de la enfermedad a este tiempo de cultivo (Figuras 5C, 5D y 5E), al igual que al ser tratadas con Tecto 60 (Figura 5F).



Figura 4. Efecto antifúngico del extracto hexánico, fracción F5 y metil eugenol sobre *B. cinerea* en plantas de fresa cultivadas en condiciones *in vitro*: Planta sin inóculo de esporas, con DMSO 5% (A); Planta de fresa inoculada con esporas, con DMSO 5% (B); Plantas de fresa tratadas con 0.05 mg/L de extracto hexánico (C), fracción F5 (D), metil eugenol (E) y con 1 mg/L de Tecto 60 (F).



Figura 5. Efecto antifúngico del extracto hexánico, fracción F5 y metil eugenol sobre *C. acutatum* en plantas de fresa cultivadas en condiciones *in vitro*: Sin inóculo de esporas, con DMSO 5% (A); Planta de fresa inoculada con esporas, con DMSO 5% (B); Plantas de fresa tratadas con 0.05 mg/L de extracto hexánico (C), fracción F5 (D), metil eugenol (E) y con 1 mg/L de Tecto 60 (F).

En general, los síntomas tanto de la enfermedad del moho gris como de la antracnosis, causadas en plantas de fresa por *B. cinerea* y por *C. acutatum*, respectivamente, fueron observados en las plantas inoculadas sin los tratamientos antifúngicos, tales como marchitamiento, necrosis, clorosis y pudrición de hojas y tallos, para finalmente ocasionar la muerte de las plantas (Howard *et al.*, 1992; Holz *et al.*, 2007).

En algunos reportes se indica que al aplicar extractos vegetales etanólicos, éstos tienen efectos tóxicos y enmascaran la acción de los metabolitos en prueba, debiendo utilizar extractos o metabolitos disueltos en agua con la adición de detergentes como Tween, DMSO y otras sustancias surfactantes (Bobadilla-Álvarez *et al.*, 2002; Catiglioni *et al.*, 2002).

En esta investigación fue claro que los extractos con DMSO no presentaron toxicidad alguna y pudo observarse el efecto real contra el crecimiento o infección de *B. cinerea* y *C. acutatum* sobre plantas de fresa. Este efecto ejercido por el extracto hexánico, la fracción F5 y el principio activo metil eugenol, de Santa María (*T. lucida*), es un resultado prometedor para su uso como fungicida orgánico, lo cual indica el potencial del uso de los extractos derivados de plantas para controlar este tipo de fitopatógenos.

CONCLUSIONES

La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto hexánico de *T. lucida* para inhibir el crecimiento de ambos hongos en estudio fue de 0.05 mg/mL en base al contenido del metil eugenol. Se comprobó que el extracto hexánico, la fracción F5 y el metil eugenol puro, ejercen un efecto fungicida ya que con la CMI se muestra destrucción tanto del micelio como de las esporas. Con los ensayos en plantas de fresa, se determinó que con la CMI del extracto hexánico, de la fracción F5 y del metil eugenol puro, se pudo detener el desarrollo de la enfermedad, consiguiendo un 100% de supervivencia de las plantas a los 15 días del tratamiento.

LITERATURA CITADA

Apablaza, G., Díaz M., San Martín R. y Moya E. 2002. Control de oídio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de Quillay (*Quillaja saponaria*). Ciencia e Investigación Agraria, 29:83-90.

Angulo-Escalante, M.A., Armenta-Reyes E., García- Estrada R.S., Carrillo-Fasio, J.A., Salazar-Villa E. y Valdéz-Torres J.B. 2009. Extractos de semilla de *Swietenia humilis* Zucc. con actividad antifúngica en *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill. Revista Mexicana de Fitopatología, 27(2):84-92.

Bertelli, D, Plessi M. y Miglietta F. 2003. Effect of microwaves on volatile compounds in origanum. LWT- Food Science and Technology 36(6):555–560.

Bobadilla Álvarez, M., Zavaleta-Espejo G., Gil-Franco F., Pollack-Velásquez L. y Sisniegas-Gonzales M. 2002. Efecto bioinsecticida del extracto etanólico de las semillas de *Annona cherimolia* Miller “chirimoya” y *A. muricata* Linneaus “guanábana” sobre larvas del IV estadio de *Anopheles* sp. Rev. Peru. Biol., 9(2):64-73.

Castiglioni, E., Vendramim J.D. y Tamai M.A. 2002. Evaluación del efecto tóxico de extractos acuosos y derivados de meliáceas sobre *Tetranychus urticae* (Koch) (Acari: Tetranychidae). Agrocienca (Uruguay), 6: 75-82.

Fiori, A.C. G., Schwan-Estrada K.R.F., Stangarlin J.R., Vida J.B., Scapim C.A., Cruz M.E.S. y Pascholati S.F. 2000. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. J. Phytopathol., 148:483-487.

Fraire, C.M., Yañez M.M., Nieto A.D. y Vázquez G.G. 2003. Hongos patógenos en frutos de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.) en postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología, 21:285-291.

Guédez, C., Cañizález L., Castillo C. y Olivar R. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 29:34-38.

Holz, G., Coertze S. y Williamson B. 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. En: *Botrytis: biology, pathology and control* (Elad Y., Williamson B., Tudzynski P. y Denle N., Eds.), Springer, USA, pp. 9-27.

Howard, C.M., Maas J.L., Chandler C.K. y Albregts E.E. 1992. Anthracnose of strawberry caused by the *Colletotrichum* complex in Florida. Plant disease, 76:976-981.

Kumar, A., Rao A.R. y Kimura H. 2000 Radiosensitizing of neem (*A. Indica*) oil Phytotherapy Research, 16: 74-77.

Momin, R.A. y Nair M.G. 2001. Mosquitocidal, nematocidal, and antifungal compounds from *Apium graveolens* L. seeds. J. Agric. Food Chem., 49:142-145.

Murashige, T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plantarum, 15:473-497.

Nguefack, J., Leth V., Amvam-Zollo P.H. y Mathur S.B. 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. International Journal of Food Microbiology, 94:329-334.

Sahin, F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., Agar G. y Özer H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. Food Control 15(7): 549-557.

Singh, G., Marimuthu P., Catalan C. y De Lampasona M.P. 2004. Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. J. Sci. Food Agric., 84:1878-1884.

Singh, R., Sharma R.R. y Goyal R.K. 2007. Interactive effects of planting time and mulching of Chandler strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). Sci. Hort., 111:334-351

Steel, R.G.D. y Torrie J.H. 1980 Principles and procedures of statistics: A biomedical approach (2nd Ed.) McGraw-Hill Book Co., New York, 622 p.

Sutton, J.C. 1995. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En: *Colletotrichum: Biology, Pathology, and Control* (Bailey J.A. y Jeger M.J., Eds). CAB International, Wallingford, UK. pp. 523-537.

Tello, J., Paez J.I., Vega J.M., Duhart M.E. y Gonzalez L. 1996. Enfermedades del fresón. Hortoinformación suplemento Abril. 30 pp.

CAPÍTULO V

5. DISCUSIÓN GENERAL

La importancia de la actividad de los extractos de origen vegetal radica en su capacidad para inhibir el crecimiento del patógeno, algunos son considerados específicos por presentar un efecto antifúngico para un cierto grupo de hongos y muchos otros por exhibir una actividad de amplio espectro, sin embargo los estudios demuestran que no todo los extractos derivados de plantas tienen actividad antimicrobiana. Stauffer *et al.* (2000) evaluaron 98 extractos vegetales diferentes, de los cuales solo el 10% presentó actividad antimicrobiana contra hongos (*Colletotrichum* sp., *Penicillium italicum*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Alternaria* sp. y *Pythium* sp.), haciendo énfasis que son pocos los extractos que presentaron la inhibición. En este mismo sentido Montes *et al.* (2000) realizaron una revisión de 12 años de investigación sobre las propiedades antifúngicas de 206 especies vegetales contra 26 especies de hongos fitopatógenos, de los cuales solo entre el 32 y 51% de las plantas presentó un efecto contra los hongos y la respuesta de los patógenos varió desde la estimulación biológica hasta su total inhibición.

Aún más drástico los trabajos reportados por Mendoza *et al.* (2007), quienes evaluaron 97 extractos vegetales obtenidos de 37 especies vegetales, de los cuales ninguno de ellos presentaron inhibición sobre los patógenos *Phytophthora palmivora* y *Colletotrichum gloeosporioides*, hecho que atribuyeron a que las propiedades que poseen los metabolitos secundarios de las plantas, puede variar de acuerdo a su naturaleza química, parte o tipo de planta, concentración y al entorno en que éstas habitan o se cultivan, por lo que destacaron la necesidad de evaluar una mayor cantidad de extractos posibles para una amplia gama de organismos, sobre todo de plantas a las que se les atribuyan propiedades antimicrobianas como es el caso de las plantas medicinales.

Es por lo anterior, que en esta investigación se evaluó el efecto antifúngico de extractos hexánicos de tres plantas medicinales (*Agastache mexicana*, *Satureja macrostema* y *Tagetes lucida*) con referencia de poseer propiedades antimicrobianas o en particular antifúngicas. Aunque las tres plantas mostraron un efecto inhibitorio sobre *B. cinerea* y *C. acutatum*, el porcentaje de inhibición varió entre ellas, presentando un 100% de inhibición el extracto hexánico de Santa María (*Tagetes lucida*) sobre ambos hongos.

Aunque los extractos de las plantas contienen terpenos en su aceite esencial (Trease y Evans, 1991; Serrato y Quijano 1993; Lara y Márquez, 1996; Bello *et al.*, 2006; Céspedes *et al.*, 2006; Damián-Badillo *et al.*, 2008), solo los que componen al de *T. lucida* fueron efectivos sobre el crecimiento tanto de *B. cinerea* como de *C. acutatum*. La composición de terpenos y su concentración en los aceites esenciales de plantas, es primordial para presentar una alta actividad antifúngica.

Según el análisis cromatográfico por CG-EM se determinó la presencia de β -mirceno, *o*-cimeno, β -linalol, acetato de geraniol, estragol y metil eugenol, siendo este último el compuesto mayoritario del aceite esencial de *T. lucida*. Aunque estos terpenos ya han sido descritos para esta planta, se observó que el extracto hexánico de la parte aérea de esta planta presenta al metil eugenol como terpeno mayoritario (64%), composición efectiva contra el crecimiento de los dos hongos en estudio.

Generalmente la mezcla de terpenos y otros compuestos que componen un aceite esencial son los responsables de la actividad antifúngica (Lima *et al.*, 1992), sin embargo no siempre se presenta este sinergismo, pudiendo encontrar una respuesta antogónica en muchos aceites esenciales (Espinosa-García, 2001). Las hojas de las especies de la leguminosa *Hymenea* contienen óxido de cariofileno, un compuesto antifúngico que se encuentra dentro de una mezcla de sesquiterpenos, pero solo este es el único capaz de inhibir al hongo *Pestalotopsis subcuticularis*. Por otra parte los monoterpenos de las hojas de la Cupressaceae *Sequoia sempervirens* Endl., necesitan estar en determinadas proporciones para inhibir a los hongos endófitos de esa especie y ninguno de ellos los puede inhibir individualmente (Espinosa-García y

Langenheim, 1991). Con monoterpenos usados experimentalmente se ha visto que actúan diferencialmente contra varios hongos, algunas especies se inhiben con dosis bajas de monoterpenos, otras con dosis altas y otras más incluso son estimuladas por algunos compuestos (Hintikka, 1970). Es por ello, que se decidió separar en fracciones el extracto hexánico de Santa María (*T. lucida*), para analizar si el efecto se debía a la mezcla de terpenos del aceite esencial o a uno o más compuestos mayoritarios.

Lo anterior fue realizado ensayando las fracciones obtenidas del extracto hexánico de *T. lucida* y pudo comprobarse que solo la fracción F5 mostró un 100% de inhibición sobre *B. cinerea* y *C. acutatum*, de manera similar al ejercido por el extracto. Esta fracción está enriquecida con metil eugenol (94.4%) aunque en menor concentración contiene estragol y β -linalol, lo que corroboró la actividad fungicida del metil eugenol. Así mismo, este efecto fue comprobado al realizar los ensayos con metil eugenol grado reactivo, el que a la misma concentración presentó un 100% de inhibición en ambos hongos. Este resultado concuerda con los reportados para *Elettaria cardamomum* (Kubo *et al.*, 1991), *Ocimum gratissimum* (Matasyoh *et al.*, 2007), *Laurus nobilis* (Marzouki *et al.*, 2009) y *Pimenta pseudocaryophyllus* (Paula *et al.*, 2011), cuyos extractos son potentes antifúngicos y contienen como compuesto mayoritario al metil eugenol.

El extracto hexánico de *T. lucida* presentó el 100% de inhibición sobre los dos hongos bajo estudio a una concentración de 1 mg/mL en base al aceite total obtenido después de la extracción. Este porcentaje de inhibición se obtuvo al aplicar 0.1 mg/mL en base al contenido de metil eugenol tanto en el extracto como en la fracción activa F5. La concentración mínima inhibitoria (CMI) del extracto fue de 0.05 mg/mL en base al contenido del metil eugenol, esta concentración mostró el 100% de inhibición para F5 y el metil eugenol puro. La CMI para este extracto y la fracción F5 es considerablemente baja en comparación con otros extractos o compuestos antifúngicos. Según Aliaginis *et al.* (2001), concentraciones inhibitorias inferiores a 0.5 mg/mL deben ser consideradas como fuertes inhibidores del crecimiento de

microorganismos, por lo que el extracto y la fracción F5 de *T. lucida* deben de considerarse como potentes fungicidas, en particular con los que se ha probado.

Con la aplicación de la CMI del extracto, fracción activa F5 y metil eugenol puro, en micelio y esporas de *B. cinerea* y *C. acutatum*, se observó un efecto fungicida ya que se manifestaron cambios en las hifas y esporas, que provocó la lisis y finalmente la muerte de ambas estructuras. Los extractos vegetales con actividad antifúngica generalmente producen cambios morfológicos con crecimiento atípico del hongo, crean estructuras de resistencia llamadas esclerocios que no son comunes en condiciones normales o destruyen las membranas celulares tanto de hifas como de las esporas (Prangue *et al.*, 2005).

Generalmente los aceites esenciales poseen evidentes propiedades antimicrobianas, sin embargo, su mecanismo de acción aún no está definido, esto debido a su complejidad, aunque se reconoce que la acción antimicrobiana de los aceites esenciales depende de su carácter hidrofílico o lipofílico. Los terpenoides sirven como un ejemplo de agentes liposolubles que afectan la actividad de las enzimas catalizadoras de membrana, por ejemplo su acción en la respiración microbiana (Lucini *et al.*, 2006).

Entre los posibles mecanismos de acción de los terpenos contenidos en los aceites esenciales está la volatilidad y bajo peso molecular de éstos, de esta forma pueden atravesar estructuras de resistencia de la especie fúngica fácilmente. Así, tanto el daño a la membrana citoplasmática como una reducción en su contenido de ergosterol, promueven la formación de poros por los cuales difunden moléculas e iones (fundamentalmente K^+ y H^+), lo que finalmente compromete la viabilidad de la membrana. La pérdida del ergosterol de la membrana fúngica o la inhibición de su síntesis, son mecanismos relevantes, puesto que este compuesto tiene una función estructural en el hongo (Kalemba y Kunicka, 2003; Lucini *et al.*, 2006).

Los terpenos como el carvacrol y el timol, provocan una interrupción de la capa externa de lipopolisacáridos seguida de una desintegración parcial de la membrana

externa. También se ha reportado que el eugenol y carvacrol causan cambios morfológicos en los mohos como el *Cladosporium herbarum*, que al ser tratados con los componentes mencionados, el micelio es fracturado y se vuelve frágil, con protuberancias similares a vesículas; se observan un aumento en la ruptura de hifas, variación en su diámetro y disminución del número de conidios. Las deformaciones morfológicas podrían estar relacionadas a la acción del eugenol y carvacrol sobre algunas enzimas de la pared celular tales como las quitinasas y las glucanasas (Kalemba y Kunicka, 2003; Botelho *et al.*, 2007).

Se ha demostrado que los terpenos timol, carvacrol y eugenol son los más fuertes inhibidores de los procesos enzimáticos. Esto se atribuye a su característica lipofílica y sus grupos OH libres. Por otra parte, se ha encontrado que geraniol y linalol tienen un efecto menor por la esterificación de los grupos OH (Knoblock *et al.*, 1989; Pepeljnjak *et al.*, 2003). Se conoce que el cineol reduce la división celular y que el limoneno, el α -pineno y el β -pineno inhiben el consumo de oxígeno (Peñuelas *et al.*, 1996); también se sabe que el 1-8 cineol inhibe la respiración mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la síntesis de ADN (Koitabashi *et al.*, 1996).

En cuanto al efecto inhibitorio sobre la germinación o lisis de esporas en *B. cinerea* y *C. acutatum*, esto se ha reportado al aplicar extractos crudos de ajo (*Allium* spp.), chile (*Capsicum* spp.), nogal negro (*Juglans nigra*), liquidámbar (*Liquidambar styraciflua*), *Matricaria* spp., durazno (*Prunus persica*), peral (*Pyrus communis*) y tejo inglés (*Taxus canadensis*) (Wilson *et al.*, 1997).

Los resultados obtenidos en este trabajo son alentadores pues permitieron confirmar el efecto antifúngico del extracto hexánico de Santa María (*Tagetes lucida* Cav.), y que éste es debido al alto contenido del compuesto terpénico metil eugenol. El uso potencial de este extracto o la fracción activa como fungicidas en el cultivo de fresa se ve reflejado al haberse determinado la CMI y los efectos que estos tienen sobre el micelio y esporas de *B. cinerea* y *C. acutatum*.

CAPÍTULO VI

6. CONCLUSIONES GENERALES

De las plantas analizadas (*Agastache mexicana* ssp. *mexicana*, *Satureja macrostema* y *Tagetes lucida*), el extracto hexánico de *T. lucida* fue el más efectivo contra el crecimiento de micelio *in vitro* de *Botrytris cinerea* y de *Colletotrichum acutatum*, con un 100% de inhibición en ambos hongos.

El extracto hexánico de *T. lucida* presentó los compuestos volátiles metil eugenol, estragol, mirceno, α -cimeno, β -linalol y acetato de geraniol, como los terpenos mayoritarios, determinándose que la fracción F5 contiene al terpeno metil eugenol como mayoritario.

El extracto, la fracción F5 y el metil eugenol puro, presentaron un efecto fungicida ya que con la CMI (0.05 mg/mL) se observó ruptura tanto de las hifas como de las esporas en ambos hongos bajo estudio. Al aplicarse éstos en plantas de fresa, inoculadas tanto con *B. cinerea* como con *C. acutatum*, se demostró el efecto fungicida, logrando detener la enfermedad con un alto porcentaje de supervivencia de las plantas tratadas.

Estos resultados demuestran que la actividad antifúngica de Santa María se debe principalmente a los compuestos volátiles terpénicos, considerando al metil eugenol como el principal responsable del efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos *B. cinérea* y *C. acutatum*.

6.1. Perspectivas

Realizar pruebas en invernadero con plantas de fresa desafiadas al ataque tanto de *B. cinerea* como de *C. acutatum*, durante el ciclo de crecimiento y desarrollo, hasta la producción de frutos.

Determinar el número de aplicaciones efectivas del extracto o fracción activa durante la etapa de cultivo de fresa en invernadero.

Analizar los posibles efectos tóxicos del extracto y fracción activa durante el crecimiento y el desarrollo de plantas de fresa.

Evaluar los costos de producción y aplicación del extracto o fracción activo en los ensayos de invernadero.

CAPÍTULO VII

7. LITERATURA CITADA GENERAL

- Abdala, L. R. 1999.** Flavonoids of the aerial parts from *Tagetes lucida* (Asteraceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 27:753-754.
- Abreu-Guirado, O.A. y Cuéllar-Cuéllar A. 2008.** Estrategias en la selección de las plantas medicinales a investigar. *Rev. Cubana Plant. Med.*, 13(3):1-9.
- Adams, R.P. 2007.** Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream. VIII pp.
- Ahmad, A., Khan A., Manzoor N. y Khan L.A. 2010.** Evolution of ergosterol biosynthesis inhibitors as fungicidal against *Candida*. *Microbial Pathogenesis*, 48(1):35-41.
- Aliyiannis, N., Kalpoutzakis E., Mitaku S. y Chinou I.B 2001.** Composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Origanum* species. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49:4168-4170.
- Amadioha, A. y Uchendu P. 2003.** Post-harvest control of tomato fruit rot caused by *Fusarium solani* with extracts of *Azadirachta indica*. *Discovery and Innovation*, 15(1):83-86.
- Antonov, A., Stewart A. y Walter M. 1997.** Inhibition of conidium germination and mycelial growth of *Botrytis cinerea* by natural products. pp. 159-164. 50th Conference Proceedings of the New Zealand Plant Protection Society Incorporated. Palmerston, New Zealand. 546 p.
- Apablaza, G., Díaz M., San Martín R. y Moya E. 2002.** Control de oídio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de Quillay (*Quillaja saponaria*). *Ciencia e Investigación Agraria*, 29:83-90.
- APS, American Phytopathological Society, 1998.** Compendium of strawberry diseases (Maas J. L., Ed.), Second edition, Beltsville, Maryland. 98 p.
- Badii, M.H., Flores A.E., Foroughbakhlela R., Quiroz H. y Torres R. 1996.** Ecología del Manejo Integrado de Plagas (MIP) con Observaciones Sobre Control Microbiano de Insectos. Publicación Universidad Autónoma de Nuevo León - Avances Recientes en la Biotecnología de *Bacillus thuringiensis*- pp. 21-49.
- Bakkali, F., Averbeck S., Averbeck D. e Idaomar M. 2008.** Biological effects of essential oils- a review. *Food and Chemical Toxicology*, 46:446-475.

Bello, G.M.A. 1993. Plantas útiles no maderables de la Sierra purépecha, Michoacán, México, INIFAP. México. Folleto Técnico No 10. 115 p.

Bello, G.M.A. 2006. Catálogo de plantas medicinales de la comunidad Indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán. México. Libro Técnico No. 4. Campo Experimental Uruapan. CIRPAC. INIFAP. Michoacán, México. 138 p.

Bello, G.M.A., Molina T.J., Calderón M.J., García Ch.A. y Salgado G.R. 2006. Propiedades antimicrobianas y análisis fitoquímico de seis plantas medicinales de la comunidad indígena Nuevo San Juan Parangaricutiro, Michoacán, México. 2º Congreso de Investigación Científica. UMSNH, Morelia, Michoacán, México.

Bertelli, D., Plessi M. y Miglietta F. 2003. Effect of microwaves on volatile compounds in origanum. LWT- Food Science and Technology 36(6):555–560.

Bosquez-Molina, E., Bautista-Baños S. y Morales-López J. 2009. Aceites esenciales bioconservadores con alto potencial en la industria alimentaria. Industria Alimentaria, 31:12-24.

Botelho, M.A., Nogueira N.A.P. y Bastos G.M. 2007. Antimicrobial activity of the essential oil from *Lippia sidoides*, carvacrol and thymol against oral pathogens. Brazilian Journal of Medical and Biological Research, 40:349-356.

Bowers, J.H. y Locke J.C. 1999. Effect of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* Wilt in the greenhouse. Plant Disease, 84 (3):300-305.

Cáceres, A. 1996. Plantas de uso medicinal en Guatemala. Edit. Universitaria, Guatemala, p. 402.

Céspedes, C. L., Ávila G. J., Martínez A., Serrato B., Calderón-Múgica J. C. y Salgado-Garciglia R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). J. Agric. Food Chem., 54:3521-3527.

Cicció, J.F. 2004. A source of almost pure methyl chavicol: Volatile oil from the aerial parts of *Tagetes lucida* (Asteraceae) cultivated in Costa Rica. Revista de Biología Tropical, 52(4):853-857.

Contreras, N., Martínez J. y Stashenko E. 2006. Determinación de la actividad antioxidante *in vitro* de los aceites volátiles de cuatro plantas de uso tradicional mediante la medición de la peroxidación lipídica de aceite. Scientia et Technica, 30:365-370.

Cortinas, N.C., Cristán F.A. y Loredó M.O. 1996. Los plaguicidas. Gaceta Ecológica, México INE-SEMARNAP, 40:62-70.

Daferera D.J., Ziogas B.N. y Polissiou M.G., 2000. GC–MS analysis of essential oils from some Greek aromatic plants and their fungitoxicity on *Penicillium digitatum*. J. Agric. Food Chem., 48:2576-2581.

Damián-Badillo, L. M., Salgado-Garciglia R., Martínez-Muñoz R. E. y Martínez-Pacheco M. M. 2008. Antifungal properties of some Mexican medicinal plants. The Open Natural Products Journal, 1:27-33.

Dan, Y., Liu H.Y., Gao W.W. y Chen Sh.L. 2010. Activities of essential oils from *Asarum heterotropoides* var. *mandshuricum* against five phytopathogens. Crop Protection, 29(3):295-299.

De Corato, U., Maccioni O., Trupo M. y Di Sanzo G. 2010. Use of essential oil of *Laurus nobilis* obtained by means of a supercritical carbon dioxide technique against post harvest spoilage fungi. Crop Protection, 29(2):142-147.

Dorman, H.J. y Deans S.G. 2000. Antimicrobial agents from plants: Antibacterial activity of plant volatile oils. J. Appl. Microbial, 88(2):308-16.

Duke, S.O. 1990. Natural pesticides from plants. En: Advances in new crops (Janick J. y Simon J.E., Eds.), Timber Press, Portland, OR. pp. 511-517.

Espinosa-García, F.J., 2001. La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal. En: Relaciones químicas entre organismos. Aspectos básicos y perspectivas (Anaya A.L., Espinosa–García F.J. y Cruz-Ortega R., Coordinadores). Instituto de Ecología. Plaza y Valdés S. A. de C. V. México D. F.

Espinosa-García, F.J. y Langenheim J.H. 1991. Effect of some essential oil phenotypes coastal redwood on the growth of several fungi with endophytic stages. Biochemical Systematic and Ecology, 19:643-650.

FAOSTAT 2006. Database Gateway 2006.

<http://apps.fao.org/lim500/nphwrap.pl?Production=Crops.Primary&Domain=SUA8Language=espanol&servlet=1>.

Fiori, A.C.G., Schwan-Estrada K.R.F., Stangarlin J.R., Vida J.B., Scapim C.A., Cruz M.E.S. y Pascholati S.F. 2000. Antifungal activity of leaf extracts and essential oils of some medicinal plants against *Didymella bryoniae*. J. Phytopathol., 148:483–487.

Fraire C. M., Yañez M.M., Nieto A.D., y Vázquez G.G. 2003. Hongos patógenos en frutos de fresa (*Fragaria X ananassa* Duch.) en postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología, 21:285-291.

Girón, L.M., Freire V., Alonzo A. y Cáceres A. 1991. Ethnobotanical survey of the medicinal flora used by the Caribs of Guatemala. J. Ethnopharm., 34:173-187.

Green, A. 1971. Soft fruits, En: The Biochemistry of fruit and their products (Hulme A.C., Ed.), Chapter 11. Vol. 2., New York: Academic Press. pp. 375-410.

Grosvenor, P.W. y Gray D.O. 1996. Colutequinona and colutehydroquinona, antifungal isoflavonoids from *Colutea arborescens*. Life Sciences, 42:377-380.

González, E.J.M. 1993. Producción y comercialización de la fresa en la región de Irapuato, Gto. Tesis. Universidad Autónoma de Chapingo. Chapingo, México. 85 p.

Guédez, C., Cañizález L., Castillo C. y Olivar R. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, 29:34-38.

Gunashekar, M. 2008. Integrated Management in *Phytophthora* diseases. En: Advances in soil Born plant diseases (Naik M.K. y Devika-Rani G.S., Eds). New Indian Publishing Agency. New Dehli. pp 371-413.

Hernández, T., Canales M., Flores C., García A.M., Durán A. y Ávila J.G. 2006. Antimicrobial activity of *Tagetes lucida*. Pharmaceutical biology, 44:19-22.

Herrera, E.A. y Carsolio C. 1998. Contaminación y Conservación del Medio Ambiente. En Medio Ambiente, Control Biológico y Hongos Parásitos. Avance y Perspectiva. CINVESTAV, 17:195-204.

Hintikka, V. 1970. Selective effects of terpenes on wood decomposing Hymenomyces. Karstenia, 11:28-32.

Howell, C.R. 2003. Mechanisms employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: The history and evolution of current concepts. Plant Dis. 87:4-10.

InfoAgro. 2002. Plagas de los cultivos. España Disponible en: <http://www.tusplantas.com/jardin/jardines/>

Jeandet, P., Douillet-Breuil A.C., Bessis R., Debord S., Sbaghi M. y Adrian M. 2002. Phytoalexins from the *Vitaceae*: biosynthesis, phytoalexin gene expression in transgenic plants, antifungal activity, and metabolism. J. Agric. Food Chem., 50:2731-2741.

Juscafresca, S.B. e Ibar A.L. 1987. Fresas y fresones. Editorial Aedos. Barcelona, España. pp. 10–16.

Kader, A.A. 1991. Quality and its maintenance in relation to the postharvest. Physiology of strawberry. En: The strawberry into the 21st century (Dale A. y Luby J. J., Eds.), Timber Press, Portland, Oregon, USA. pp. 145-152.

- Kalemba, D. y Kunicka A. 2003.** Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry*, 10: 813-829.
- Knoblock, K., Pauli A., Ibler B., Weigand H. y Weiss N. 1989.** Antibacterial and antifungal properties of essential oil components. *Journal of Essential Oil Research*, 1:119-128.
- Koitababashi, R., Suzuki T., Kawazu T., Sakai A., Kuroiwa H. y Kuroiwa T, 1997.** 1,8- cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. *Journal of Plant Research*, 110:1-6.
- Kubo, I., Himejima M. y Muroi H. 1991.** Antimicrobial activity of flavor components of cardamom *Elettaria cardamomum* (Zingiberaceae) seed. *J. Agric. Food Chem.*, 39(11):1984-1986.
- Lara, O.F. y Marquez A.C. 1996.** Plantas medicinales de México. Composición, usos y actividad biológica. Universidad Nacional Autónoma de México. México, D.F. pp.1-5.
- Leite-Lima, M.E., Cordeiro I., Marx-Young M.C., Sobra M.E.G. y Moreno P.R.H. 2006.** Antimicrobial activity of the essential oil from two specimens of *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L. R. Landrum (Myrtaceae) native from Sao Paulo State-Brazil. *Pharmacologyonline*, 3:589-593.
- Lida, Y., Ki-Bong Oh., Saito M., Matsuoka H., Kurata H., Natsume M. y Abe H. 1999.** Detection of antifungal activity in *Anemarrhena asphodeloides* by sSensitive BTC method and isolation of its active compound. *J. Agric. Food. Chem.*, 47:584-587.
- Lima, G.O., Gompertz O.F., Paulo M.Q. y Griesbrecht A.M. 1992.** *In vitro* antifungal activity of essential oils against clinical isolates of dermatophytes. *Rev. Microbiol.*, 23(4):235-48.
- Linares, E. y Bye R.A. 1987.** A study of four medicinal plant complexes of México and adjacent United States. *J. Ethnopharm.*, 19:153-183.
- Lucini, E.I., Zunino M.P., López M.L. y Zygodlo A. 2006.** Effect of monoterpenes on lipid composition and sclerotial development of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Journal of Phytopathology*, 154:441-446.
- Marotti, M., Piccaglia R., Biavati B. y Marotti I. 2004.** Caracterización and yied evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. *J. of Essential Oil Research*, 16:440-444.
- Marzouki, H., Khaldi A., Chamli R., Bouzid S., Piras A., Falconieri D. y Marongiu B. 2009.** Biological activity evaluation of the oils from *Laurus nobilis* of Tunisia and Algeria extracted by supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research*, 23(3):230-237..

Matasyoh, L.G., Matasyoh J.C., Wachira F.N., Kinyua M.G., Thairu-Muigai A.W. y Mukiana T.K. 2007. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil of *Ocimum gratissimum* L. growing in Eastern Kenya. African J. of Biotech., 6(6):760-765.

Mendoza-Zamora, C. 1991. Histopatología y especies de *Tranzschelia* que atacan durazno y ciruelo en el estado de México. Revista Mexicana de Fitopatología, 10(1): 35-37.

Molina-Torres, J., García-Chavez A. y Ramírez-Chavez E. 1999. Antimicrobial properties of alkaloids present in flavouring plants traditionally used in Mesoamérica : affinin and capsaicin. J. Ethnopharm., 64:241-248.

Montes, B.R. 1996. Productos naturales de origen vegetal para el combate de fitopatógenos. Fitopatología. México D. F. Instituto Politécnico Nacional, 14 (1): 9-14.

Murashige, T. y Skoog F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue. Phys. Plant., 15:473-493.

Nash, D.L. 1976. Flora of Guatemala. Fieldiana:Botany, 24(12):383-384.

Nguefack, J., Leth V., Amvam Zollo P.H. y Mathur S.B. 2004. Evaluation of five essential oils from aromatic plants of Cameroon for controlling food spoilage and mycotoxin producing fungi. International Journal of Food Microbiology, 94:329-334.

Nychas, G.J.E. 1995. Natural antimicrobials from plants. En: New methods of food preservation (Gould G.W., Ed.), Chapman y Hall, London, UK. Capítulo 4. pp. 59-89.

Paula, J.A.M. 2011. Fitoquímica e atividades biológicas de *Pimenta pseudocaryophyllus* (Gomes) L.R. Landrum -Myrtaceae. Rev. Bras. Farmacogn. Braz J. Pharmacogn., 18: 265-278.

Peñuelas, J., Ribas-Carbo M. y Giles L. 1996. Effects of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase. Journal of Chemical Ecology, 22:801–805.

Pepeljnjak, S., Kosalec I., Kalodera Z. y Kustrak D. 2003. Natural antimycotics from Croatian plants. En: Plant-derived antimycotics. Current trends and future prospects (Rai, M. y Mares D., Eds.). Hartworth Press. N.Y. pp.49–79.

Perez, L., Valcarcel M.J., Gonzalez P. y Domecq B. 1991 Influence of *Botrytis* infection of the grapes on the biological aging process of Fino Sherry. Am. J. Enol., 42:58-62.

Phillips, D., Grant B.R. y Weste G. 1987. Histological changes in the roots of an avocado cultivar, Duke 7, infected with *Phytophthora cinnamomi*. *Phytopathology*, 77:691-698.

Prange, A., Modrow H., Hormes J., Kramer J., Kohler P. 2005. Influence of mycotoxin producing fungi (*Fusarium*, *Aspergillus*, *Penicillium*) on gluten proteins during suboptimal storage of wheat after harvest and competitive interactions between field and storage fungi. *J. Agricultural Food Chemistry*, 53(17):6930-6938.

Ramírez-Chávez, E., Lucas V.L., Virgen C.G. y Molina-Torres J. 2000. Actividad fungicida de la afinina y del extracto crudo de raíces de *Heliopsis longipes* en dos especies de *Sclerotium*. *Agrociencia*, 34: 207-215.

Ramos-García, M.L., Bautista-Baños S., Barrera-Necha L.L., Bosquez-Molina E., Alia-Tejagal I. y Estrada-Carrillo M. 2010. Compuestos antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Rev. Mex. Fitopatol*, 28(1):4-57.

Rodríguez, C. 2000. Plantas contra plagas. RAPAM. Texcoco. México. 133 p.

Ronquillo, E. 2007. Evaluación del potencial antimicrobiano de películas comestibles con aceites esenciales *in vitro* e *in situ*. Tesis de Maestro en Ciencias. Universidad Autónoma Metropolitana unidad Iztapalapa, Iztapalapa, D. F., México. 46 p.

Rzedowski, G.C. y Rzedowski J. 2001. Flora fanerogámica del Valle de México. 2ª. Ed. Instituto de Ecología, A.C. y Comisión Nacional para el conocimiento y uso de la biodiversidad, Pátzcuaro (Michoacán), pp. 925-927.

Rzedowski, J. y de Rzedowski G.C. 1985. Flora Fanerogámica del Valle de México. Tomo II. ENCBIPN e Instituto de Ecología. México. 586-590.

SAGARPA, 2006. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. www.sagarpa.gob.mx

SAGARPA-SIAP, 2010. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación y Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera Sistema de Información Agropecuaria de Consulta (SIACON). México: SAGARPA. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=350 Consulta 31 de Enero/2012.

Sahin, F., Güllüce M., Daferera D., Sökmen A., Sökmen M., Polissiou M., Agar G. y Özer H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control* 15(7): 549-557.

Schwab, W. y Raab T. 2004. Developmental Changes during strawberry fruit ripening and physico-chemical changes during postharvest storage. En: *Production*

practices and quality assessment of food crops. Vol. 3, Quality handling and evaluation (Dris R. y Jain S.M., Eds. Kluwer Academic Publisher, Netherlands. pp. 341-369.

Serrato, C.M.A. y Quijano M.L. 1993. Usos de algunas especies de *Tagetes*: revisión bibliográfica (1984 –1992). En: Proceedings of the I International Symposium and II National Meeting of Sustainable Agriculture: Importance and contribution of traditional agriculture. CEICADAR, Puebla, México. 228-238 p.

Serrato, B.E. 2002. Estudio fitoquímico de plantas medicinales. INIFAP-Morelia. Bol. Técnico10:1-10.

Silva, D.M.H. y Bastos C.N. 2007. Atividade antifúngica de óleos essenciais de espécies de *Piper* sobre *Crinipellis pernicioso*, *Phytophthora palmivora* e *Phytophthora capsici*. Fitopatologia Brasileira, 32:143-145.

Singh, G., Marimuthu P., Catalan C. y De Lampasona M.P. 2004. Chemical, antioxidant and antifungal activities of volatile oil of black pepper and its acetone extract. J. Sci. Food Agric., 84:1878-1884.

Singh, R., Sharma R.R. y Goyal R.K. 2007. Interactive effects of planting time and mulching of Chandler strawberry (*Fragaria x ananassa* Duch.). Sci. Hort., 111:334-351.

Sommer, N.F., Fortlage R.J., Mitchell F.G. y Maxie E.C. 1973. Reduction of postharvest losses of strawberry fruit from grey mold. J. Amer. Soc. Hort.Sci. 98(3):285-288.

Steel, R.G.D. y Torrie J.H. 1980 Principles and procedures of statistics: A biomedical approach (2nd Ed.) McGraw-Hill Book Co., New York, 622p.

Sutton, B.C. 1992. The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. En: *Colletotrichum*: Biology, Pathology, and Control (Bailey J.A. y Jeger M.J., Eds). CAB International, Wallingford, UK. pp. 523-537.

Takeda, F. y Janisiewicz W.J. 1991. Extending strawberry fruit shelf life with pyrrolnitrina. En: The Strawberry into the 21st Century. Proceedings of the Third North American Strawberry Conference, Houston, Texas. pp. 174-176.

Talbot, M. y Chau Khe V. 1998. Precooling strawberries. CIR942. Florida Cooperative Extensión Service. University of Florida. <http://edis.ifas.ufl.edu>. Última actualización Julio del 2002.

Tamaro, D. 1981. Manual de Horticultura. Ed. Gustavo Gili, S.A. Barcelona, España. pp. 337-340.

Tello, J., Paez J.I., Vega J.M., Duhart M.E. y Gonzalez L. 1996. Enfermedades del fresón. Hortoinformación suplemento Abril. 30 pp.

Thomas, P. 1998. Humid incubation period and plantlet age influence acclimatization and establishment of micropropagated grapes. *In vitro* cell. Dev. Boil. Plant, 34:52-56.

Trease, G. y Evans W. 1991. Farmacognosia. México, D.F., Interamericana McGraw-Hill. 910 p.

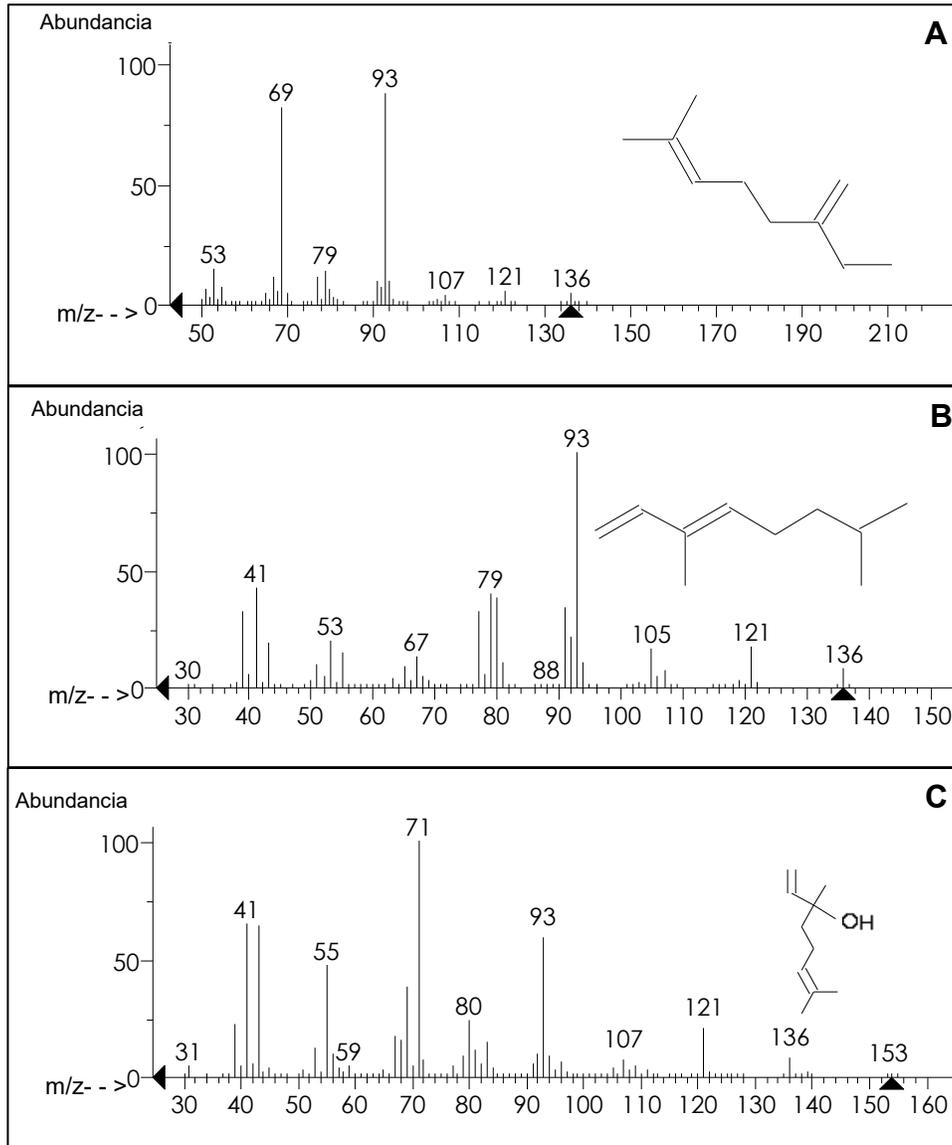
Turner B.L. y Nesom G.L. 1993. Biogeography, diversity and endangered or threatened status of Mexican Asteraceae. En: Biological diversity of Mexico: origins and distribution (Ramamoorthy T.P., Bye R., Lot A. y Fa J., Eds.). Oxford University Press, New York, USA. pp. 290-299.

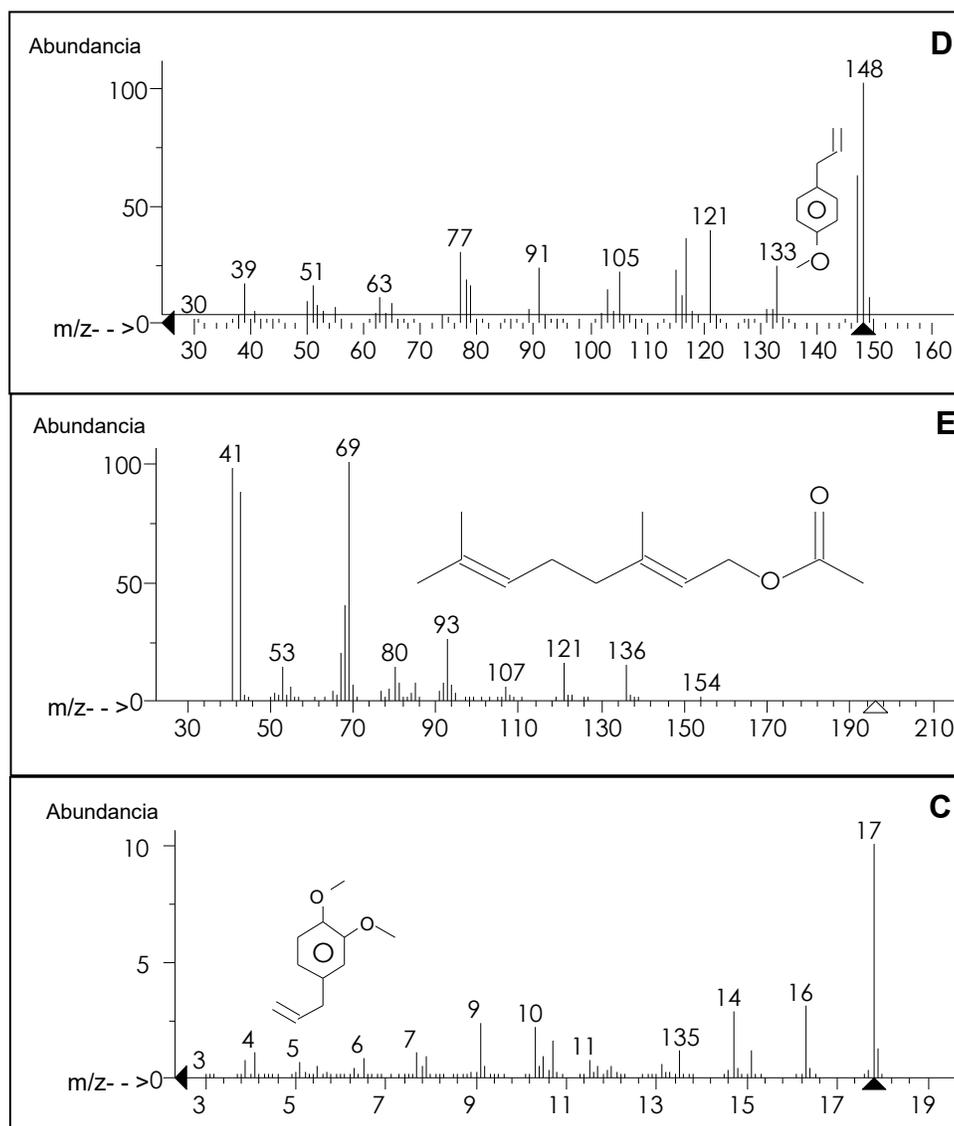
Velázquez-Becerra, C., Macías-Rodríguez L.I., López-Bucio J., Altamirano-Hernández J., Flores-Cortez I. y Valencia-Cantero E. 2011. A volatile organic compound analysis from *Arthrobacter agilis* identifies dimethylhexadecylamine, an amino containing lipid modulating bacterial growth and *Medicago sativa* morphogenesis *in vitro*. Plant and Soil, 339(1-2):329-340.

Voca, S., Duralija B., Druzic J., Skendrovic M., Nadica D., Zlatko C. 2006. Influence of cultivation systems on physical and chemical composition of strawberry fruits cv Elsanta. Agriculturae Conspectus Scientificus, 71(4):171-174.

ANEXOS

ANEXO I.- Espectros de masas de los metabolitos mayoritarios encontrados en el extracto hexánico y las fracciones activas de de *T. lucida*: A, β -Mirceno; B, *o*-cimeno; C, β -Linalol; D, Estragol; E, Acetato de geraniol; F, Metil eugenol.





ANEXO II. ARTÍCULO ENVIADO PARA SU PUBLICACIÓN

Essential oils composition and antifungal activity of three Mexican medicinal plants against *Botrytis cinerea* Pers: Fr. and *Colletotrichum acutatum* Simm.

Rodolfo Fulgencio-Negrete¹, Rafael Torres-Martínez¹, Yolanda García Rodríguez², Alejandra Hernández-García¹, Rodolfo López-Gómez¹, Mauro M. Martínez-Pacheco¹, Sylvia P. Fernández-Pavía³, Miguel A. Bello-González⁴, Marco A. Cortés-Rodríguez⁵ y Rafael Salgado-Garciglia^{1*}

¹Instituto de Investigaciones Químico Biológicas, Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo (UMSNH), Edif. B3, Ciudad Universitaria, Morelia, Michoacán 58030, México.

²Centro de Investigación en Ecosistemas, Universidad Nacional Autónoma de México, Morelia, Michoacán 58190, México.

³Instituto de Investigaciones Agropecuarias y Forestales, UMSNH). Km 9.5 Carretera Morelia-Zinapécuaro, Tarímbaro, Michoacán 58880, México.

⁴Facultad de Agrobiología Presidente Juárez, UMSNH, Paseo Lázaro Cárdenas S/N esq. Berlín, Uruapan, Michoacán 60190, México.

⁵Centro de Investigación y Desarrollo Edo. Michoacán - CIDEM, Calzada Juárez 1446, Morelia, Michoacán 58060, México.

*rafael.salgadogarciglia@gmail.com

Abstract

The composition of the essential oils of *Agastache mexicana* ssp. *mexicana*, *Satureja macrostema* and *Tagetes lucida* and its antifungal activity on *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum acutatum*, strains isolated from strawberry fruits were studied. Essential oils from the aerial parts of the plants were obtained by hexane maceration and analyzed by GC and GC-MS and evaluated for their in vitro antifungal activity. Among them, *S. macrostema* and *A. mexicana* extracts showed lower percentages of inhibition of the mycelia growth with less than 10% and 20% inhibition of *C. acutatum* and *B. cinerea*, respectively. The *T. lucida* extract greatly inhibited the growth of the mycelium in both fungi; the inhibition was 100% for this essential oil at 100 ppm, the MIC was 50 ppm. Comparative of three plant essential oils chromatographic analysis showed differences in the type and quantity of the majority compounds. The major terpenes in *S. macrostema* were pulegone and linalol, in *Agastache mexicana* were limonene and estragole and in Santa Maria were methyl eugenol and estragole.

Key words: *Agastache mexicana* ssp. *mexicana*, *Satureja macrostema*, *Tagetes lucida*, Terpenes.