



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**TESIS DOCTORAL**

**Actividad antifúngica *in vitro* e *in situ* del extracto de *Argemone mexicana* L. contra fitopatógenos en el cultivo de tomate**

Para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Agropecuarias

**PRESENTA**

**M. en C. Iridiam Hernández Soto**

Directora

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

Codirector

Dr. Antonio Juárez Maldonado

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., noviembre de 2024



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO  
INSTITUTO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS**

**TESIS DOCTORAL**

**Actividad antifúngica *in vitro* e *in situ* del extracto de *Argemone mexicana* L. contra fitopatógenos en el cultivo de tomate**

Para obtener el grado de  
Doctora en Ciencias Agropecuarias

**PRESENTA**

**M. en C. Iridiam Hernández Soto**

Directora

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

Codirector

Dr. Antonio Juárez Maldonado

Asesor

Dr. Gabriel Aguirre Álvarez

Tulancingo de Bravo, Hgo., México., noviembre de 2024

## OFICIO DE AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

04/noviembre /2024  
Asunto: Autorización de impresión

**Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado**  
**Directora de Administración Escolar**  
**Presente.**

El Comité Tutorial de la **TESIS** del programa educativo de posgrado titulado "**Actividad antifúngica *in vitro* e *in situ* del extracto de *Argemone mexicana* L. contra fitopatógenos en el cultivo de tomate**", realizado por el/la sustentante **Iridiam Hernández Soto** con número de cuenta: **245812** perteneciente al programa de **Doctorado en Ciencias Agropecuarias (Tradicional)**, una vez que ha revisado, analizado y evaluado el documento recepcional de acuerdo a lo estipulado en el Artículo 110 del Reglamento de Estudios de Posgrado, tiene a bien extender la presente:

### AUTORIZACIÓN DE IMPRESIÓN

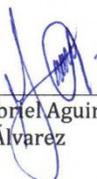
Por lo que el/la sustentante deberá cumplir los requisitos del Reglamento de Estudios de Posgrado y con lo establecido en el proceso de grado vigente.

**Atentamente**  
**"Amor, Orden y Progreso"**  
**Lugar, Hidalgo a 4 de noviembre de 2024**

El Comité Tutorial

  
Dra. Alma Delia  
Hernández Fuentes

  
Dr. Antonio Juárez  
Maldonado

  
Dr. Gabriel Aguirre  
Álvarez

## **AGRADECIMIENTOS**

Al Consejo Nacional de Humanidades, Ciencias y Tecnologías (CONAHCYT) por brindarme el apoyo económico para la realización de mis estudios de doctorado. Al Instituto de Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo por permitir mi formación profesional desde la ingeniería hasta el estudio de doctorado, mi estancia en este instituto ha sido muy enriquecedora he conocido a excelentes docentes y buenos amigos.

A la doctora Alma Delia por ser mi mentora estos seis años en mi formación como investigadora, por su apoyo, confianza en todo este tiempo, y sobretodo por la empatía que me ha tenido y demostrado, lo cual me ha permitido ser una madre presente en este último año.

Al doctor Antonio Juárez por el apoyo constante en este proyecto de investigación, por ser accesible ante cualquier duda y sobretodo por su amabilidad y disposición durante mi estancia en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

A mi esposo Antonio, por los consejos, la paciencia, por ser mi apoyo, por guiarme tanto en lo personal como en lo laboral, por ser mi compañero de vida y estar presente en cada momento, gracias por todo mi vida.

A mi mamá Chely, a mi papá don Gil, por ser unos padres presentes, siempre al pie del cañón ante cualquier contratiempo, por dejar de lado sus obligaciones para que yo pueda atender las mías, por viajar cada semana para que yo tenga la tranquilidad de que mi hija estará bien y pueda atender mis actividades del posgrado.

A mi hermano Dani, mis suegros señor Tirso y señora Estela, mis cuñadas Montse y Fey, a mi amigo Uriel todos ellos han sido un gran soporte y mi red de apoyo para poder llevar a cabo mi desarrollo profesional, han estado presentes en los tiempos buenos y no tan buenos durante estos tres años y medio, me han regalado palabras y acciones motivacionales para salir adelante y terminar de manera satisfactoria mis estudios de posgrado, continuar trabajando como docente así como en mi preparación profesional, y de igual manera ser buenos abuelos y tías con mi hija, cuidando a mi hija para que resuelva mis pendientes.

Finalmente, quiero agradecerme a mí, por tener la fortaleza, la paciencia, las ganas de salir adelante, por nunca renunciar, por siempre dar y tratar de dar más sin recibir, por ser yo en todo momento.

## **DEDICATORIA**

A mi hija Ada Isabella, se que en este momento ella es muy pequeña, pero con el tiempo comprendera que todo lo que hago es por ella y para ella, hija, cuando leas esto quiero que sepas que todo en esta vida se puede lograr, que no hay imposibles, que con determinación, paciencia y apoyo puedes lograr todo lo que te propongas. Hija, no voy a mentirte, ha sido difícil esta etapa donde soy madre y estudiante, pero siempre encuentro la manera de arreglármelas. Llegar a casa, verte sonreir y que me des las manitas hace que todo cobre sentido.

Isabella, eres más de lo que alguna vez pedi y soñe; con todo mi amor, te dedico este trabajo donde he puesto mucho esfuerzo y tiempo para poder llevarlo acabo.

Te ama mamá

## RESUMEN:

Las enfermedades fúngicas, como las causadas por *Phytophthora infestans* y *Fusarium oxysporum*, representan una amenaza significativa para la producción de tomate, generando grandes pérdidas agrícolas. Los métodos convencionales de control químico, aunque efectivos, plantean serias preocupaciones ambientales y de salud. En este contexto, los extractos de plantas, específicamente aquellos derivados de *Argemone mexicana* L., emergen como una alternativa ecológica prometedora para el control de estas enfermedades. En este estudio, se evaluaron los beneficios de los extractos de *A. mexicana* utilizando diferentes métodos de secado (temperatura ambiente y liofilización) para preservar compuestos bioactivos como fenoles y flavonoides, así como su capacidad antioxidante y actividad antifúngica. Los análisis realizados mediante cromatografía-espectrometría de masas (GC-MS) revelaron la presencia de doce compuestos en el extracto, la mayoría con propiedades antifúngicas y bioestimulantes. Las muestras liofilizadas demostraron conservar hasta un 200 % más de compuestos fenólicos, un 120 % más de flavonoides, y un 180 % más de capacidad antioxidante en comparación con las secadas a temperatura ambiente.

Los resultados indican que la aplicación del extracto de *A. mexicana* no solo redujo la severidad de *P. infestans* y *F. oxysporum*, sino que también aumentó el rendimiento de frutos de tomate, mejoró los niveles de pigmentos fotosintéticos, ácido ascórbico, fenoles y flavonoides y disminuyó la biosíntesis de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, malondialdehído (MDA) y anión superóxido en las hojas de plantas infectadas. Estos hallazgos sugieren que el extracto liofilizado de *A. mexicana* podría ser una solución viable y sostenible para el control de enfermedades fúngicas en el cultivo de tomate, ofreciendo una alternativa eficaz y ecológica frente a los métodos de control químico tradicionales.

**Palabras clave:** Biocontrol; Fitoprotección; Metabolitos secundarios; Patogenicidad; Resistencia; Sostenibilidad.

## **Abstract:**

Fungal diseases, such as those caused by *Phytophthora infestans* and *Fusarium oxysporum*, represent a significant threat to tomato production, generating large agricultural losses. Conventional chemical control methods, although effective, pose serious environmental and health concerns. In this context, plant extracts, specifically those derived from *Argemone mexicana* L., emerge as a promising ecological alternative for the control of these diseases. In this study, the benefits of *A. mexicana* extracts were evaluated using different drying methods (room temperature and freeze-drying) to preserve bioactive compounds such as phenols and flavonoids, as well as their antioxidant capacity and antifungal activity. Analyses performed using chromatography-mass spectrometry (GC-MS) revealed the presence of twelve compounds in the extract, most of them with antifungal and biostimulant properties. Freeze-dried samples were shown to retain up to 200 % more phenolic compounds, 120 % more flavonoids, and 180 % more antioxidant capacity compared to those dried at room temperature.

The results indicate that the application of *A. mexicana* extract not only reduced the severity of *P. infestans* and *F. oxysporum*, but also increased tomato fruit yield, improved the levels of photosynthetic pigments, ascorbic acid, phenols and flavonoids, and decreased the biosynthesis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, malondialdehyde (MDA), and superoxide anion in the leaves of infected plants. These findings suggest that freeze-dried *A. mexicana* extract could be a viable and sustainable solution for the control of fungal diseases in tomato crops, offering an effective and environmentally friendly alternative to traditional chemical control methods.

**Keywords:** Biocontrol; Plant protection; Secondary metabolites; Pathogenicity; Resistance; Sustainability.

## Contenido

1. INTRODUCCIÓN	1
2. ANTECEDENTES	3
3. MARCO TEÓRICO	5
3.1 <i>Solanum lycopersicum</i> L.	5
3.2 Enfermedades en plantas	6
3.3 Hongos fitopatógenos	6
3.3.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	6
3.3.2 <i>Phytophthora infentans</i>	7
3.4 Defensa de las plantas contra hongos fitopatógenos	9
3.5 Compuestos enzimáticos	10
3.6 Compuestos no enzimáticos	11
3.7 Efecto de los fitopatógenos en la fotosíntesis	12
3.8 Extractos vegetales en el control de enfermedades en plantas	12
3.9 Extractos vegetales como bioestimulantes agrícolas	16
3.10 <i>Argemone mexicana</i> L.	17
3.11 Métodos de extracción de metabolitos secundarios y formulación de biofungicidas	18
4. JUSTIFICACIÓN	20
5. HIPÓTESIS	21
6. OBJETIVOS	21
6.1 Objetivo general	21
6.2 Objetivos específicos	21
7. MATERIALES Y MÉTODOS	22
7.1 Material Vegetal	22
7.2 Obtención del extracto vegetal	22
7.3 Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante	23
7.3.1 Contenido fenólico total	23
7.3.2 Flavonoides	23
7.3.3 Capacidad antioxidante	23
7.4 Análisis por cromatografía-espectrometría de masas (GC-MS)	24
7.5 Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los extractos vegetales	25
7.6 Desarrollo y manejo del cultivo	26

7.7 Preparación de la inoculación y evaluación de la gravedad de la enfermedad	26
7.8 Aplicación de tratamientos	27
7.9 Análisis agronómico	28
7.10 Muestreo de hojas y frutos	29
7.11 Mediciones de pigmentos fotosintéticos	29
7.12 Prueba de biomarcadores de estrés	29
7.13 Medición de compuestos antioxidantes no enzimáticos	30
7.14 Análisis estadístico	31
8. RESULTADOS	32
8.1 Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante	32
8.2 Análisis por cromatografía-espectrometría de masas (GC-MS)	32
8.3 Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los extractos vegetales	34
8.3.1 <i>Fusarium oxysporum</i>	34
8.3.2 <i>Phytophthora infestans</i>	37
8.4 <i>P. infestans</i> severidad y desarrollo del cultivo	39
8.5 Contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas	42
8.6 Biomarcadores de estrés en hojas de tomate	44
8.7 Compuestos antioxidantes no enzimáticos	46
9. DISCUSIÓN	49
9.1 Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante	49
9.2 Análisis por cromatografía-espectrometría de masas (GC-MS)	50
9.3 Actividad antifúngica <i>in vitro</i> de los extractos vegetales	51
9.4 <i>P. infestans</i> severidad y desarrollo del cultivo	54
9.5 Contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas	56
9.6 Biomarcadores de estrés en hojas de tomate	57
9.7 Compuestos antioxidantes no enzimáticos	58
10. CONCLUSIONES	61
11. REFERENCIAS	62
12. ANEXOS	86
12.1 Artículos publicados	86
12.2 Congresos	89
12.3 Estancia	91

## Índice de cuadros

Cuadro 1. Extractos vegetales para el control de hongos fitopatógenos.....	4
Cuadro 2. Técnicas de extracción de metabolitos secundarios.....	19
Cuadro 3. Compuestos químicos identificados en el extracto de <i>A. mexicana</i> L.....	34

## Índice de figuras

Figura. 1. Principales síntomas de enfermedad en tomate.....	6
Figura. 2. Daños por <i>F. oxysporum</i> en plantas de tomate .....	7
Figura. 3. Síntomas y ciclo de la enfermedad de <i>P. infestans</i> .....	9
Figura. 4. Biosíntesis de metabolitos secundarios .....	13
Figura. 5. Mecanismos de acción de biofungicidas de origen vegetal contra hongos fitopatógenos .....	15
Figura. 6. Tallos, hojas y flores de chicalote.....	18
Figura. 7. Compuestos bioactivos extraídos por diferentes disolventes.....	19
Figura. 8. Aplicación y colecta de datos a lo largo del experimento .....	28
Figura. 9. Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante .....	33
Figura. 10. Actividad antifúngica contra <i>Fusarium oxysporum</i> .....	36
Figura. 11. Actividad antifúngica contra <i>Phytophthora infestans</i> . .....	38
Figura. 12. Tizón tardío en plantas de tomate. ....	39
Figura. 13. Parámetros agronómicos en plantas de tomate. ....	41
Figura. 14. Contenido de clorofilas en las hojas de tomate con diferentes tratamientos .....	43
Figura. 15. Biomarcadores de estrés en plantas de tomate .....	45
Figura. 16. Compuestos antioxidantes no enzimáticos en las hojas de tomate con diferentes tratamientos.....	48

## 1. INTRODUCCIÓN

El tomate (*Solanum lycopersicum* L.) es uno de los cultivos más relevantes a nivel mundial (Youssef et al., 2018) y se le reconoce como un alimento funcional debido a su alto contenido de licopeno, minerales, vitaminas  $\beta$ -caroteno y compuestos fenólicos que son esenciales para la salud humana (Castagna et al., 2014). Actualmente, las enfermedades de plantas causadas por hongos fitopatógenos representan una serie amenaza para la seguridad alimentaria, ya que provocan pérdidas de entre el 20 y 40 % después de que son cosechados (Ali et al., 2020). Entre las enfermedades más devastadoras y económicamente significativas que afectan el tomate se destacan *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*. *Fusarium oxysporum* es responsable de la marchitez vascular, que pueden reducir el rendimiento hasta un 60 %. Los primeros signos de esta enfermedad incluyen el amarillamiento del forraje y la caída de hojas (Ren et al., 2021). Las hojas infectadas muestran luego un oscurecimiento y finalmente se secan (Gonzalez, Yailen y Peteira., 2012). Por su parte, el tizón tardío, causado por *Phytophthora infestans* es una enfermedad letal que afecta tallos y hojas de tomate (Kumar et al., 2022), pudiendo destruir el cultivo en un plazo de 7 a 10 días cuando su incidencia es alta y las plantas no están protegidas. Se estima que el tizón tardío ocasiona pérdidas globales aproximadamente 6.7 mil millones de dólares anuales (Nowicki et al., 2012).

Hasta ahora, los fungicidas químicos han sido la estrategia más eficaz para controlar esta enfermedad, aunque su uso excesivo puede derivar en problemas de salud, resistencia en patógenos y contaminación ambiental (Zhang et al., 2022). Por ello, surge la necesidad de explorar y desarrollar productos ecológicos para el control de patógenos en plantas. Los fungicidas basados en plantas arvenses están ganando aceptación en la agricultura orgánica, ya que son seguros para cultivos destinados al consumo humano, y existen un mercado rentable entre los consumidores que están dispuestos a pagar más por alimentos producidos de forma orgánica (Misra, 2014). El uso de extractos vegetales ofrece una oportunidad significativa para desarrollar nuevos biofungicidas, debido a su contenido de metabolitos secundarios, como alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, lípidos, compuestos fenólicos, terpenos,

poliacetilenos, que tienen propiedades fitoprotectoras (Borges et al., 2018; Fielding et al., 2015). *Argemone mexicana* L., comúnmente conocida como chicalote, es una planta endémica de México y se encuentra ampliamente distribuida en todos los continentes (Conabio, 2024). El chicalote es una planta que contiene compuestos como berberina, deshidrocorydalmina, alocriptopina, oxiberberina, cisteína y fenilalanina, a los cuales se les atribuyen diversas actividades biológicas, incluyendo propiedades antimicrobianas, antiinflamatorias, antioxidantes, larvicidas, nematocidas, entre otras (Brahmachari et al., 2013).

Los extractos vegetales además de presentar actividad antifúngica, mejoran aspectos fisiológicos y bioquímicos en los cultivos (Osman et al., 2021); Aunque los cambios en el sistema antioxidante de las plantas durante la infección por patógenos han sido documentados, solo algunos estudios se han realizado sobre los cambios en el sistema antioxidante y la concentración de especies reactivas de oxígeno (ROS) en las hojas de las plantas de tomate sometidas a estrés por un agente patógeno. Hanaa et al. (2011), emplearon extractos acuosos de neem (*Azardiachta indica* A. Juss.) en plántulas de tomate infectadas con *Fusarium oxysporum* y reportan un aumento significativo en el crecimiento de brotes y raíces de las plántulas de tomate, además de inhibir el crecimiento en este fitopatógeno. Tighe Neira et al., 2013 evaluaron el efecto del extracto acuoso de ortiga (*Urtica dioica* L.) y *Ulex europaeus* L., en plántulas de chile (*Capsicum annum* L.), ambos extractos generaron un efecto en la producción de biomasa y concentración de compuestos fenólicos. Rodríguez et al., (2020) reportan que el extracto de *Rhus muelleri* Müller incremento la longitud y diámetro de tallo, peso seco de hojas, número y peso de frutos, y producción de fruto en plantas de tomate. Por lo anterior, se considera relevante evaluar la actividad antifúngica *in vitro* e *in situ* del extracto de *Argemone mexicana* L. contra *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans* y estudiar su papel en la mejora de los efectos fisiológicos y bioquímicos en plantas de tomate infectadas con un hongo fitopatógeno para desarrollar estrategias de control amigables con el medio ambiente y así reducir el uso de fungicidas químicos parcial o totalmente contra hongos fitopatógenos que infectan plantas de tomate.

## 2. ANTECEDENTES

La aplicación de fungicidas orgánicos a base de extractos en los sistemas de producción agrícola garantiza importantes beneficios para los agricultores, incluida la seguridad alimentaria, la reducción de fitopatógenos, la mejora de la calidad del producto que alcanza precios más altos (Tripathi et al., 2020). Los compuestos químicos de origen vegetal presentes en los extractos son específicos del organismo objetivo, lo que garantiza la seguridad de los organismos no objetivo, especialmente abejas polinizadoras y depredadores. Dependiendo de la fuente vegetal y las concentraciones utilizadas, los biofungicidas tienen cero o poco efecto alelopático en los cultivos (Hernández-Moreno et al., 2013). Ejemplos de algunos extractos con actividad antifúngica se muestran en el cuadro 1.

Cuadro 1. Extractos vegetales para el control de hongos fitopatógenos

Hongo fitopatógeno	Enfermedad	Extracto vegetal	Compuesto bioactivo con actividad biológica	Referencias
<i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Colletotrichum acutatum</i> ; <i>Diplodia corticola</i> ; <i>Phytophthora cinnamomic</i> ; <i>Fusarium culmorum</i>	Moho gris; Antracnosis; Cancro del tronco; Tinta del castaño; Marchitez vascular	Extracto hidroetanólico de <i>Myristica fragans</i> Houtt	Ácido tetradecanoico, ácido 9-octadecenoico, ácido n-hexadecanoico, ácido dodecanoico, ácido octadecanoico, veratona, gelsevirina y montanina	Cruz et al., 2024
<i>Botrytis cinerea</i> ; <i>Colletotrichum acutatum</i> ; <i>Diplodia corticola</i> ; <i>Phytophthora cinnamomic</i> ; <i>Fusarium culmorum</i>	Moho gris; Antracnosis; Cancro del tronco; Tinta del castaño; Marchitez vascular	Extracto hidroetanólico de <i>Curcuma longa</i> L.	$\beta$ -turmerona; $\alpha$ -turmerona; -ar-turmerona; $\alpha$ -atlantona; $\gamma$ -curcumeno; zingibereno; isoelemicina y giberelina	Cruz et al., 2024
<i>Alternaria alternata</i>	Mancha foliar	Extracto acuoso de <i>Dittrichia viscosa</i> L.	Ácidos cafeoilquínicos; flavonoides metoxilados; sesquiterpenos	Pane et al., 2023
<i>Colletotrichum acutatum</i>	Antracnosis	Extracto etanólico de cáscara de ajo	Trisulfuro de alilo; trisulfuro de alilo y metilo; disulfuro de alilo; disulfuro de alilo y trans-1-propenilo; sulfuro de alilo y metilo y 2-vinil-4H-1,3-ditiina	Teixeira et al., 2023
<i>Alternaria alternata</i> ; <i>Fusarium solani</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i>	Moho negro; Marchitez vascular	Extracto metanólico de <i>Cinnamomum camphora</i> (L.) J. Presl.	Éster mono(2-etilhexílico) del ácido 1,2-benzenodicarboxílico	Sobhy et al., 2023
<i>Alternaria alternata</i> ; <i>Fusarium oxysporum</i> ; <i>Rhizoctonia solani</i>	Moho negro; Marchitez vascular; Damping-off	Extractos de polifenoles: Mezquite ( <i>Prosopis glandulosa</i> Torr.), Cedro ( <i>Cedrus Trew</i> ) y Roble ( <i>Quercus</i> L.)	Antocianinas; flavonoles y flavonas	Salas-Gómez et al., 2023
<i>Fusarium oxysporum</i> ; <i>Rhizoctonia solani</i>	Marchitez vascular; Amortiguamiento	Extracto metanólico de <i>Eryngium campestre</i> L.	Ácido benzoico; Catecol; Quercetina; Ácido vainílico; Resveratrol; Naringenina y quinol	Al-Askar et al., 2023
<i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Fusarium solani</i> <i>Phytophthora capsici</i>	Marchitez vascular; Tizón del pimiento	Aceite esencial: canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> J. Presl), aceite de neem ( <i>Azadirachta indica</i> A. Juss), extracto de zapote ( <i>Diospyros digyna</i> (JFGmel.) Perr)	Aldehído cinámico; Kaempferol; Alcohol cinámico; Alcaloides; Aceites esenciales; Polifenoles; Taninos y saponinas	García-Ramírez et al., 2023
<i>Ralstonia solanacearu</i> ; <i>Phytophthora infestans</i> ; <i>Neopestalotiopsis javaensis</i>	Marchitez bacteriana del banano; Tizón tardío; Enfermedades de la sarna	Extracto metanólico de <i>Pernettya prostrata</i> (Cav.) y <i>Rubus roseus</i> Schott	Compuestos fenólicos	Ordóñez et al., 2023
<i>Pestalotiopsis clavispora</i> ; <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> ; <i>Lasioidiplodia pseudotheobromae</i>	Podredumbre de la corona; antracnosis; gomosis	Mezcla de etanol y acetato de etilo: extracto de <i>Lantana hirta</i> L., <i>Argemone ochroleuca</i> L. y <i>Adenophyllum porophyllum</i> (Cav.)	Extracto de <i>L. hirta</i> : fitol y $\alpha$ -sitosterol. En <i>A. ochroleuca</i> : tolueno y benceno, 1,3-bis(3-fenoxifenoxi)-. En <i>A. porophyllum</i> : ácido hexanodioico, bis(2-etilhexil) éster	Hernández-Ceja et al., 2021

### 3. MARCO TEÓRICO

#### 3.1 *Solanum lycopersicum* L.

El tomate cultivado (*Solanum lycopersicum* L.) se originó y se domesticó en el oeste de América del Sur y América Central desde México hasta Perú. El tomate pertenece a la división *Magnoliophyte*, clase *Magnoliopsida*, subclase *Asteridae*, orden *Solanales* y familia *Solanaceae*. El tomate se cultiva en todo el mundo, es clasificado botánicamente como fruta (baya) pero a menudo consumido como verdura (crudo, cocido y/o en forma procesada (Krishna et al., 2022). Aunque el tomate cultivado es una planta tropical, requiere condiciones de crecimiento moderadas y está ampliamente adaptado a diferentes climas, lo que lo hace cosmopolita. China, Estados Unidos, India, Turquía, Egipto e Italia son algunos de los principales países productores de tomates (Bihon et al., 2022). En México la producción de este cultivo es de 1,483,673.25 millones de toneladas anuales (SIAP, 2024). Además, es considerado un alimento funcional debido a su contenido de: vitamina A y C, fósforo, hierro,  $\beta$ -caroteno, antocianinas y licopeno) (Saffan et al., 2022).

Las condiciones óptimas para el crecimiento y la producción de este cultivo son: temperaturas diurnas de entre 23 y 25 °C, y nocturnas de 15 a 17 °C. La temperatura máxima que tolera es de 30 °C, y la mínima es de 8°C. La humedad relativa ideal es del 60 %, con un máximo del 70 % y un mínimo del 50 %. Requiere 12 horas de luz plena y 12 horas de oscuridad, así como una ventilación adecuada para garantizar un suministro adecuado de oxígeno y dióxido de carbono (Santin et al., 2024). El suelo debe mantenerse con una humedad ligeramente por debajo de su capacidad de campo, ya que esta planta es muy resistente a la sequía, pero extremadamente sensible al exceso de humedad. Además, presenta fotoperiodismo, lo que significa que necesita una variación de temperatura entre el día y la noche de 8 °C. Este cultivo también demanda cantidades adecuadas de calcio y potasio, y en promedio, cada planta consume aproximadamente 2.8 litros de agua por día (Li et al., 2024).

## 3.2 Enfermedades en plantas

Las enfermedades de las plantas causadas por hongos patógenos generan grandes pérdidas en los cultivos y representan una amenaza para la salud humana y animal. Desde que el Pacto Verde Europeo puso un fuerte énfasis en la necesidad de reducir el uso de protección química de las plantas, el interés en el control ecológico ha ido creciendo (Gwiazdowski et al., 2023). Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos ataca a uno o más tipos de plantas, las infecciones fúngicas son la principal causa de pérdidas económicas significativas en cultivos de interés comercial (Figura 1) (Agrios, 2005).



Figura. 1. Principales síntomas de enfermedad en tomate

Fuente: PortalFrutícola, 2021

## 3.3 Hongos fitopatógenos

### 3.3.1 *Fusarium oxysporum*

*Fusarium oxysporum*: está bien representada entre las comunidades de hongos de suelo, todas las cepas de *F. oxysporum* son saprofitas y pueden crecer y sobrevivir durante largos períodos en materia orgánica en el suelo y en la rizosfera de muchas especies de plantas, generalmente este fitopatógeno penetra en las raíces induciendo pudriciones en el sistema vascular de plantas agrícolas y ornamentales (Fravel et al.,

2003). Los primeros síntomas de la marchitez vascular incluyen el aclaramiento de las venas y las epinastias en las hojas, seguidos por un crecimiento retardado, amarilleo de las hojas inferiores, marchitamiento gradual, pérdidas de hojas y finalmente, la muerte de la planta (Figura 2). Durante la colonización por hongos, el tejido vascular adquiere un tono marrón, lo cual es visible claramente con cortes transversales del tallo (Michielse y Rep, 2009). Aunque se ha observado que *F. oxysporum* puede enfermar a muchas especies vegetales, principalmente: tomate, melón, frijol, plátano, algodón y garbanzos (Blanco et al., 2008). En plantas ornamentales como áster, begonia, claver, crisantemo, gladiolo, lirio y orquídeas (Gullino et al., 2002).



Figura. 2. Daños por *F. oxysporum* en plantas de tomate

Fuente: KOPPERT, 2021

### 3.3.2 *Phytophthora infestans*

El género *Phytophthora* contiene varias especies conocidas con amplios rangos de host y distribuciones que causan importancia económica enfermedades de las plantas que incluyen canchros, humectación, tizón foliar, pudrición de la raíz y la corona (Agrios, 2005). El tizón tardío del tomate, causado por *Phytophthora infestans*, es una enfermedad oomiceta devastadora que provoca la muerte del tallo y la hoja (Figura 3). En Europa, a finales de la década de 1840, el tizón tardío provocó la gran hambruna irlandesa. Hasta la fecha, el tizón tardío de las solanáceas sigue siendo una de las

enfermedades más devastadoras en las regiones productoras de todo el mundo y causa grandes pérdidas económicas (Bourket, 2020). *Phytophthora infestans* es un patógeno complejo cuyo genoma puede evolucionar con relativa rapidez para producir resistencia a los fungicidas.

Las especies de *Phytophthora* desarrollan distintas etapas celulares en su ciclo de infección (Hardham, 2007). Los esporangios multinucleados y las zoosporas móviles uninucleadas representan las etapas primarias de dispersión. Los esporangios de *P. infestans* que se forman en las partes aéreas de las plantas pueden volar o salpicar a nuevos huéspedes, donde pueden germinar directamente o liberar zoosporas para iniciar la infección. Las zoosporas descartan los flagelos y sintetizan una pared celular, formando un quiste. Estos germinan en horas y pueden ingresar al tejido del hospedador a través de aberturas naturales como los estomas, o formar un tubo germinal hinchado similar a un apresorio, debajo del cual ocurre la penetración de las células epidérmicas del hospedador (Hohl y Suter, 1976). Tras la penetración de la célula huésped, se forma una vesícula de infección primaria esférica a partir de la cual emergen hifas para ramificarse a través del tejido vegetal (Whisson et al, 2007). Las hifas de *P. infestans* crecen intercelularmente, proyectando haustorios en forma de dedos hacia las células huésped. Los haustorios son estructuras que forman una interacción íntima con las células huésped, eliminando la pared celular de la planta, pero dejando la membrana intacta para facilitar el intercambio molecular entre el patógeno y una célula vegetal viva (Avrova et al, 2008).

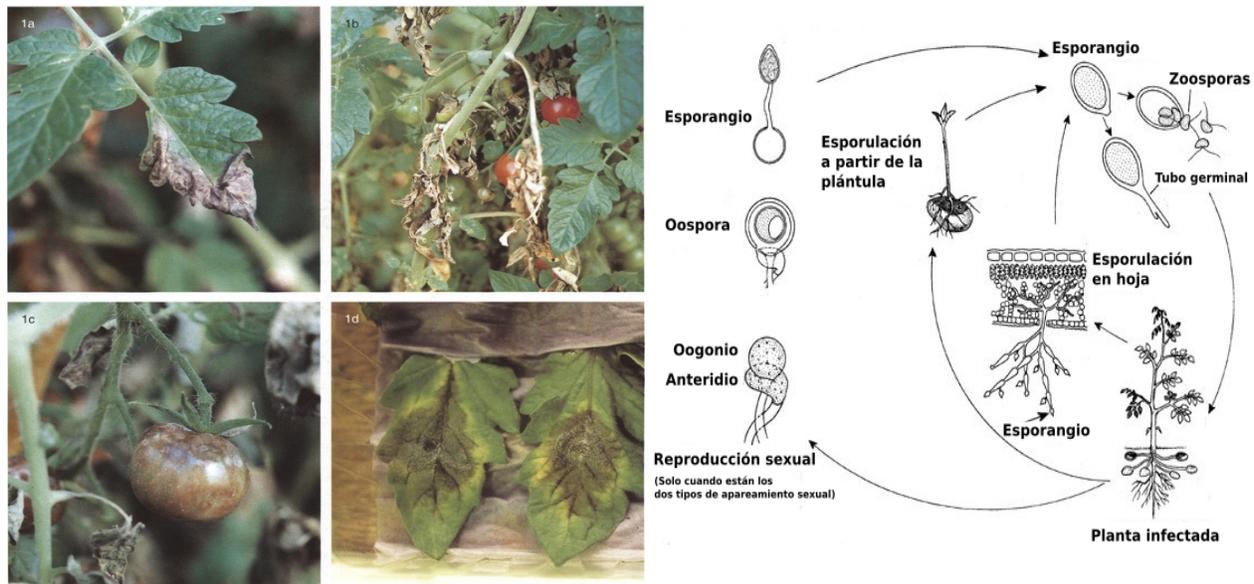


Figura. 3. Síntomas y ciclo de la enfermedad de *P. infestans*

Fuente: Griffith et al., 1995

### 3.4 Defensa de las plantas contra hongos fitopatógenos

La exposición de las plantas al ataque de patógenos, conduce a una desregulación o interrupción de la cadena transportadora de electrones, lo que tiene como consecuencia la sobreproducción de especies reactivas de oxígeno (ROS) (Magbanua et al., 2007). La producción de ROS es una importante respuesta defensiva de las plantas contra la infección patógena, sin embargo, la acumulación de ROS causa un desequilibrio entre su producción y los mecanismos de defensa, lo que da como resultado un estrés oxidativo (Lima et al., 2002). En las especies reactivas de oxígeno se incluyen radicales libres como superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) radical hidroxilo ( $\bullet OH$ ) y moléculas no radicales como peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) y oxígeno singlete (Chandra et al., 2015). El  $H_2O_2$ , está directamente involucrado en la muerte tanto de patógenos como de células huésped y en los enlaces cruzados oxidativos entre proteínas en las paredes celulares, que se vuelven más resistentes a la degradación por enzimas líticas y toxinas no selectivas liberadas por el patógeno (Mehdy et al., 1996). Aunque el  $H_2O_2$

es esencial para la señalización y la defensa de las plantas contra la infección por patógenos, puede reaccionar con el radical superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ) o con iones metálicos para formar un radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) (Lin et al., 2009). Estos radicales libres impactan las membranas celulares, causando daños a pigmentos, proteínas y ácidos nucleicos (Apel y Hirt, 2004). En respuesta a la producción de especies reactivas de oxígeno (ROS), las plantas generan compuestos tanto enzimático como no enzimáticos que actúan como eliminadores de estas ROS, neutralizando los radicales libres y ayudando a mantener el equilibrio del sistema (Anthony et al., 2017).

### 3.5 Compuestos enzimáticos

Como se mencionó, el sistema de defensa de las plantas también involucra la participación de compuestos enzimáticos como ascorbato peroxidasa (APX), glutatión peroxidasa (GPX), catalasa (CAT), superóxido dismutasa (SOD) y Fenilalanina amoniacal liasa (PAL) que eliminan ROS (Filha et al., 2011). La superóxido dismutasa (SOD) convierte el radical superóxido en oxígeno molecular y  $H_2O_2$ , esta enzima constituye la primera línea de defensa contra el estrés oxidativo (Bowler et al., 1992) mientras que la ascorbato peroxidasa (APX) cataliza la conversión de  $H_2O_2$  en agua y oxígeno (Asada, 1999). Las enzimas glutatión peroxidasa (GP) y catalasa (CAT) detoxifican el  $H_2O_2$  reduciéndolo a  $H_2O$  (Apel y Hirt, 2004) y Fenilalanina amoniacal liasa (PAL) es el principal precursor de la síntesis de fenilpropanoides en plantas que actúan como inhibidores de la formación de oxígeno singlete, captadores de radicales libres y agentes reductores contra el estrés abiótico y biótico. De esta forma, las plantas pueden estar preparadas para hacer frente a algún tipo de estrés, ya sea biótico o abiótico (Şirin y Aslım, 2018). El  $H_2O_2$  a menor concentración participa en las vías de señalización y las respuestas celulares, como la producción de proteínas relacionadas con el estrés, la regulación positiva de moléculas y enzimas antioxidantes y en la acumulación de solutos compatibles (Vierling y Kimpel, 1992; Miller et al., 2010). Pero a concentraciones más altas, oxida componentes celulares como lípidos, proteínas y ácidos nucleicos, inhibe el aparato fotosintético y puede iniciar reacciones en cadena que desencadenan la apoptosis celular (Zhu, 2002).

### 3.6 Compuestos no enzimáticos

El sistema no enzimático (Vitamina C, glutatión, fenoles, flavonoides, etc.) mantienen el equilibrio de las especies reactivas de oxígeno en diferentes reacciones celulares vegetales. El ascorbato (vitamina C) es el antioxidante más abundante en las plantas y se utiliza como cofactor de las enzimas redox. Se sintetiza en la mitocondria y luego se transporta a los cloroplastos por medio de un transportador de fosfato. En el cloroplasto, sirve para disipar la energía en forma de calor y eliminar los radicales libres durante el proceso de fotosíntesis (Miyaji et al., 2015). La función más importante del ascorbato en las células vegetales es la donación de electrones (ciclo del glutatión del ascorbato), donde la enzima ascorbato peroxidasa (APX) utiliza dos moléculas de ascorbato para reducir el  $H_2O_2$  a agua y monodehidroascorbato (MDA) este, a su vez, puede reciclarse a través de la enzima deshidroascorbato reductasa (Foyer y Noctor, 2011). El glutatión tiene funciones importantes en el desarrollo de plantas que no pueden ser realizadas por otros tioles o antioxidantes; interactúa con varias proteínas a través del intercambio de tiol-disulfuro. Algunas funciones incluyen vías biosintéticas, desintoxicación, bioquímica antioxidante y homeostasis redox. El glutatión se sintetiza a partir de aminoácidos constituyentes, como la cisteína, en diferentes compartimentos celulares y se mueve a través del apoplasto o el simplasto (Noctor et al., 2011). Actúa como un compuesto reductor de especies reactivas de oxígeno y reductores celulares y también cumple funciones de señalización. En el ciclo del glutatión del ascorbato, se utiliza para reducir el deshidroascorbato, tanto enzimático como no enzimático, y también se oxida a glutatión oxidado (GSSG); para regenerarse, es catalizada por la enzima glutatión reductasa y fosfato de nicotinamida-adenina-dinucleótido (NADPH) como poder reductor (Ahmad et al., 2010). Los antioxidantes, como los fenoles, flavonoides y otros compuestos bioquímicos que producen las plantas, desempeñan dos funciones clave. En primer lugar, previenen la oxidación de los lípidos catalizada por los radicales libres, en segundo lugar, actúan como agentes reductores, transformando los radicales libres en moléculas estables. Por lo tanto, la presencia de radicales libres también estimula la producción de antioxidantes (Antony et al., 2017). Las plantas son fuentes naturales de compuestos fenólicos, los cuales se acumulan como respuesta a la infección por patógenos (Ahuja et al., 2012). Los flavonoides,

compuestos del metabolismo secundario ampliamente distribuidos en las plantas, han sido identificados como inhibidores de infecciones causadas por patógenos. Su capacidad antioxidante se atribuye a su habilidad para neutralizar los radicales libres, bloqueando así su acción catalítica. Por lo tanto, cuando aumenta la concentración de especies reactivas de oxígeno, también se incrementa la cantidad de flavonoides libres, lo que reduce el daño potencial de los ROS sobre la integridad celular (Mathesius et al., 2018).

### 3.7 Efecto de los fitopatógenos en la fotosíntesis

La clorofila es muy importante para la fotosíntesis de la planta y está contenida en los fotosistemas I y II. Los hongos fitopatógenos pueden afectar negativamente la actividad fotosintética de las plantas a través de la necrosis que producen en las hojas debido a la reducción del contenido de clorofila (Dehgahi et al., 2015). Por lo tanto, mantener el contenido de clorofila en las plantas cuando son atacadas por patógenos es vital, ya que esto permitirá que la planta continúe realizando la fotosíntesis y por ende el resto de las funciones metabólicas que desencadenan en un favorable desarrollo y rendimiento del cultivo (Quiterio-Gutiérrez et al., 2019).

### 3.8 Extractos vegetales en el control de enfermedades en plantas

Las plantas producen de forma natural una variedad de productos de diferente naturaleza química, que se utilizan para el crecimiento y desarrollo de las plantas. Los metabolitos primarios proporcionan los suministros necesarios para procesos como la fotosíntesis, la translocación y la respiración. Los productos derivados de metabolismo primario que no participan directamente en el crecimiento y desarrollo, se conocen como metabolitos secundarios (Twaij y Hasan, 2022). Existen tres tipos principales de metabolitos secundarios de acuerdo a su biosíntesis: (a) terpenos y terpenoides, (b) alcaloides y (c) compuestos fenólicos. Y existen cuatro vías principales para la síntesis de estos metabolitos: (1) vía de ácido shikímico, (2) vía de ácido malónico, (3) vía de ácido mevalónico y (4) vía de no mevalonato (MEP) (Figura 4) (Ashraf et al., 2018). Los extractos de plantas contienen una multitud de sustancias bioactivas, que incluyen alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, lípidos, fenólicos, terpenos,

poliacetilenos y polienenos (Figura 5). Los científicos han explorado la diversidad de estas moléculas y su uso en el manejo integrado de plagas y patógenos (Isman, 2000).

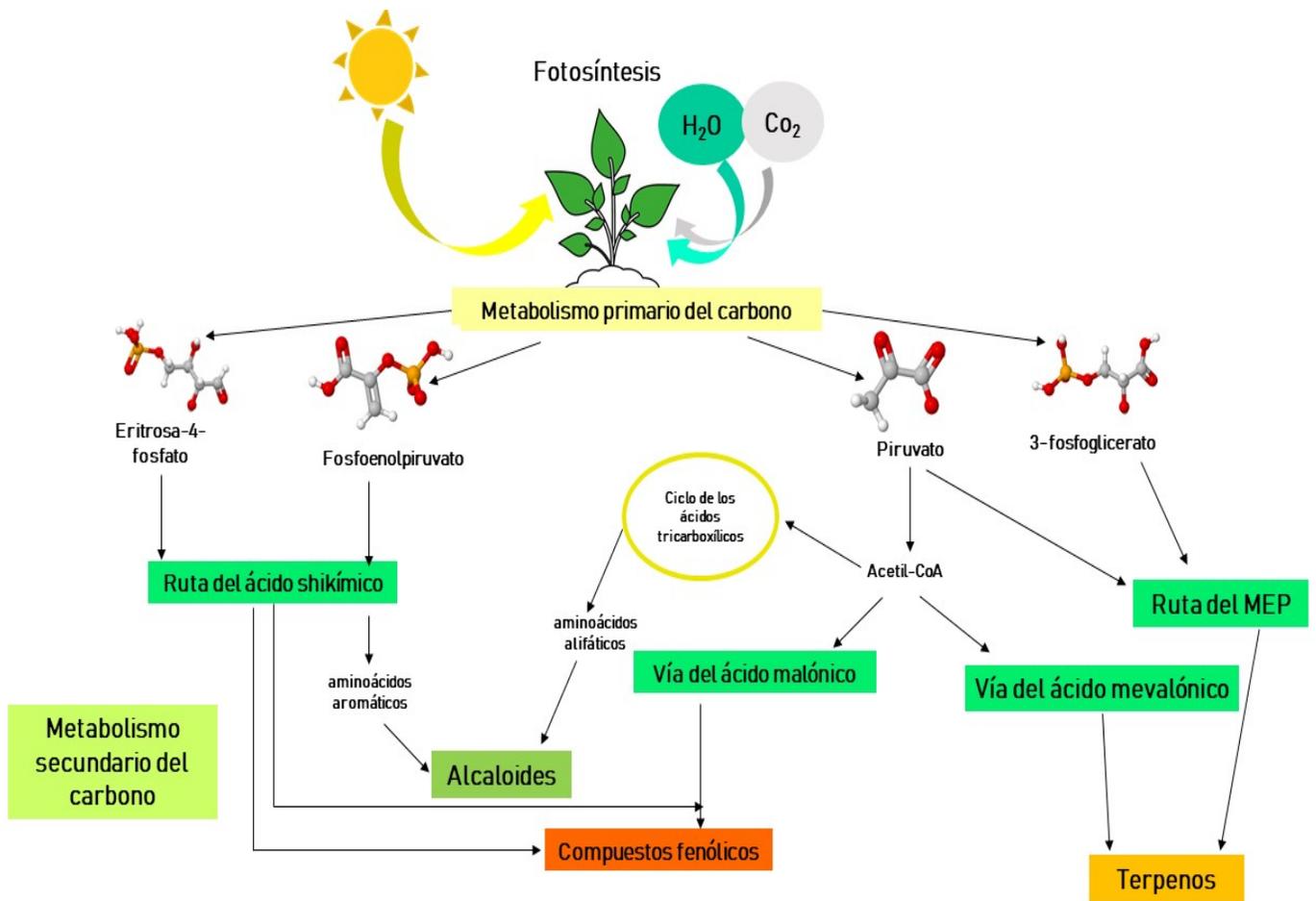


Figura. 4. Biosíntesis de metabolitos secundarios

Elaboración propia Canva © 2024

Los mecanismos de acción en hongos fitopatógenos son variables (Figura 6); se asume que los terpenos alteran las membranas celulares de los hongos. Esta membrana, que consiste en una bicapa lipídica que contiene fosfolípidos y ergosterol, puede ser desestabilizada por los terpenos debido a su naturaleza lipofílica. La incorporación de terpenos a la membrana altera su fluidez y permeabilidad, afectando

los gradientes iónicos y otras funciones importantes de la membrana celular. Además, los terpenos pueden destruir las mitocondrias, los orgánulos responsables de la producción de energía en la célula a través de la respiración celular y la fosforilación oxidativa. Al desestabilizar las membranas mitocondriales internas y externas, los terpenos impiden la producción adecuada de ATP y pueden liberar compuestos proapoptóticos que inducen la muerte celular (Cowan, 1999). Otro efecto crucial de los terpenos es la inhibición del transporte de electrones en la cadena de transporte de electrones mitocondrial. Este proceso, que tiene lugar en la membrana interna de las mitocondrias, es esencial para la creación de un gradiente de protones que impulsa la síntesis de ATP. Los terpenos interfieren en los complejos proteicos implicados en este transporte y detienen la creación del gradiente de protones y, por tanto, la producción de ATP. Por último, los terpenos también inhiben la ATPasa, una enzima que sintetiza ATP a partir de ADP y fosfato inorgánico, con la ayuda del gradiente de protones generado por la cadena de transporte de electrones (Hernández-Tenorio et al., 2022; Toffolatti et al., 2023).

Se especula que los compuestos fenólicos afectan las membranas celulares y mitocondriales de los hongos y causan su despolarización. Esta despolarización altera los gradientes iónicos que son importantes para la producción de energía y la homeostasis celular, lo que lleva a la disfunción y eventual muerte celular. Además, los compuestos fenólicos inhiben enzimas clave como las quitinasas (Palmieri et al., 2022). La inhibición de las quitinasas impide el mantenimiento y remodelación adecuados de la pared celular, debilitando así la estructura del hongo. Otro mecanismo de acción importante es la capacidad de los compuestos fenólicos para modular la expresión génica en hongos. Esta modulación afecta procesos vitales del patógeno, como la síntesis de proteínas importantes y la regulación del ciclo celular, alterando significativamente el crecimiento, desarrollo y reproducción del hongo (Tripathi et al., 2020).

Los alcaloides ejercen su efecto antimicrobiano a través de varios mecanismos bioquímicos. La intercalación con el ADN microbiano altera la replicación y transcripción de genes, lo que perjudica la capacidad del microorganismo para reproducirse y sintetizar proteínas importantes (Almeida et al., 2024)(Figura 5). Además, los alcaloides pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana, alterando los gradientes iónicos y la homeostasis celular, lo que conduce a la disfunción y muerte celular. Estos compuestos también causan inhibición competitiva al unirse a las proteínas microbianas, lo que perjudica su capacidad para interactuar con los polisacáridos del receptor del huésped, evitando así la colonización y la infección (Sulaiman et al., 2022).

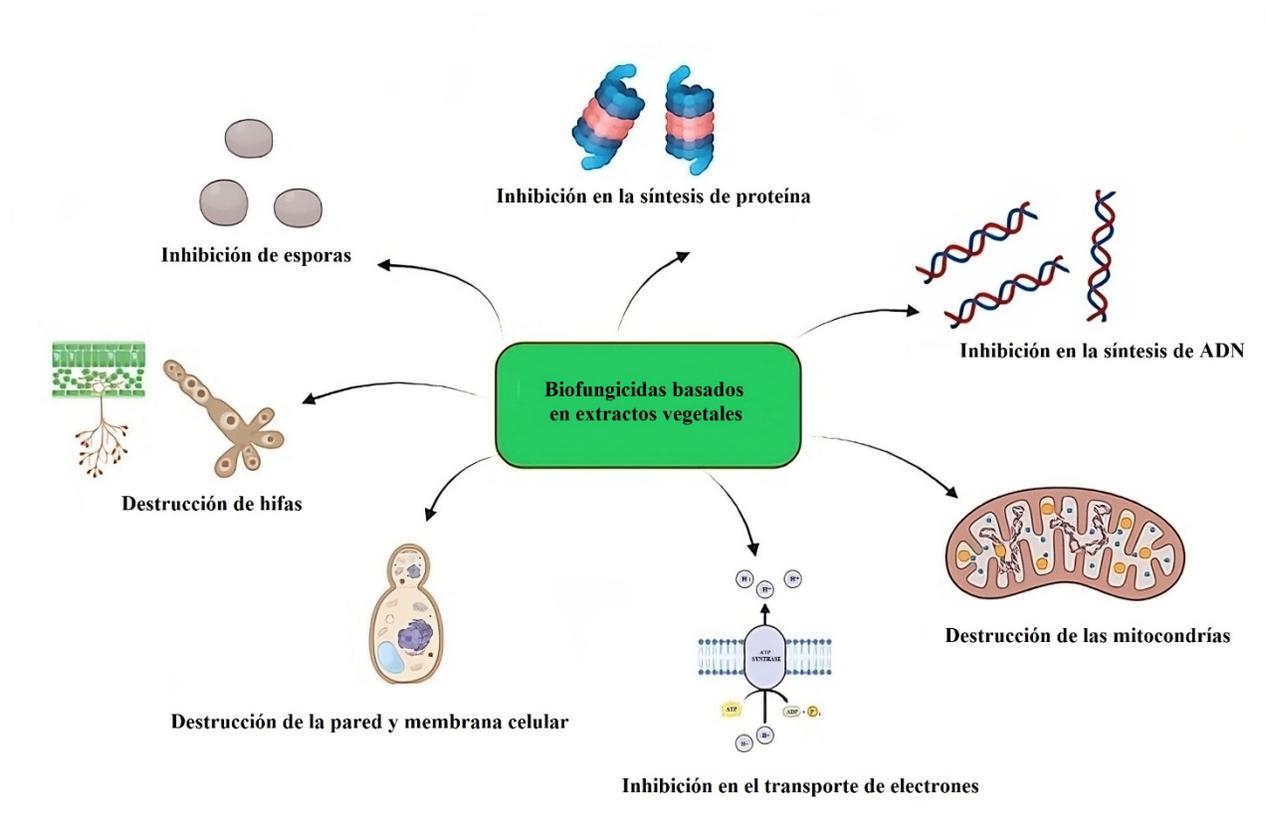


Figura. 5. Mecanismos de acción de biofungicidas de origen vegetal contra hongos fitopatógenos  
Elaboración propia BioRender © 2024

Aunque se han realizado ensayos con fundamentos científicos sobre las propiedades fungicidas de los productos vegetales y sus constituyentes, y además se han liberado en el mercado algunos productos de control de enfermedades basados en extractos o aceites esenciales de plantas, parece no ser suficiente para sustituirlo por los fungicidas sintéticos actuales, puesto que no siempre proporcionan el control de enfermedades deseado en el campo (Zaker, 2016). Los biofungicidas se pueden usar en combinación con fungicidas sintéticos para asegurar el control de enfermedades e ir realizando un cambio paulatino en el empleo de fungicidas convencionales. La adopción y el uso generalizado de biofungicidas permite producir alimentos con ningún residuo de fungicida o con un mínimo de residuos de fungicida, si los hubiera (Dos Santos Gomes et al., 2021).

Los residuos de los biofungicidas son menos dañinos para los organismos vivos y el medio ambiente, y son relativamente seguros incluso cuando se aplican cerca de la cosecha. Esto ayuda a los productores a satisfacer los deseos de los consumidores de alimentos más naturales, saludables y seguros con respecto al uso de fungicidas sintéticos (Opendor, 2011). Los biofungicidas están disponibles en su mayoría a precios relativamente más bajos en comparación con los fungicidas comerciales que se utilizan actualmente; Esto contribuye en gran medida a ayudar a mantener la producción al reducir el costo de producción (Abbey et al., 2019). Aunque la comercialización de biofungicidas se ve considerablemente desfavorecida por los sistemas de registro (Fravel, 2005).

### 3.9 Extractos vegetales como bioestimulantes agrícolas

Los bioestimulantes agrícolas se definen como todo material orgánico que, cuando se aplica en algún cultivo, genera efectos positivos fisiológicos y bioquímicos en la planta, sin que la respuesta sea atribuida a la aplicación de los nutrientes vegetales tradicionales (Fiol y Ungerfeld, 2009). En el contexto de una agricultura sostenible, se fomenta el empleo de estos bioestimulantes (Espinosa-Antón et al., 2020). Dependiendo de su composición y de los resultados esperados, los bioestimulantes pueden aplicarse al suelo o a las hojas (Shah et al., 2018). Sus efectos fisiológicos ocurren después de su entrada en los tejidos y células vegetales, donde estos

compuestos están involucrados en el metabolismo, la señalización y la regulación hormonal del crecimiento y desarrollo de la planta. Además de brindar apoyo antiestrés, estimular el crecimiento, mejorar la absorción de nutrientes y aumentar la productividad de los cultivos, los bioestimulantes también ayudan a romper la latencia, aumentan el tamaño de la fruta, mejoran el desarrollo del sistema radicular, aumentan las actividades de la fotosintética y otros tejidos vegetativos, mejoran el vigor y la uniformidad de las plantas, regulan floración, y estimulan el cuajado y la maduración. Todos estos efectos se suman a un crecimiento, desarrollo y productividad mejorados y equilibrados de los cultivos (Parađiković et al., 2018). Por otro lado, los bioestimulantes relacionados con la actividad hormonal de las plantas pueden cambiar el gradiente electroquímico de los protones formados a través de las membranas celulares, mediante la modulación de las bombas de protones (Zandonadi et al., 2016). Para ello, sin embargo, se deben tener en cuenta varios elementos de dicho manejo, como la dosis, el período de aplicación, la especificación de su duración, y la edad y etapa de desarrollo de la planta (Vargas-Hernández et al., 2017).

### 3.10 *Argemone mexicana* L.

En México se encuentran diversas plantas arvenses, entre las cuales se halla *Argemone mexicana* L., comúnmente conocida como chicalote (Espinosa-García et al., 1996). Esta es una hierba anual que se distingue por su líquido amarillo brillante en el tallo y el pedúnculo. Sus hojas son de un verde azulado con venas azul brillante, tienen los bordes dentados, y cada diente termina en una espina. Las flores son de color amarillento y los frutos son capsulas oblongas, elípticas y de tamaño variable (Figura 6). Es originaria de México y se encuentra en climas semicálidos y templados desde el nivel del mar hasta los 2750 msnm. Esta planta se le crece en terrenos agrícolas abandonados, zonas de cultivo y márgenes de caminos. Se caracteriza por contener alcaloides en todos los órganos, siendo la protopina y la berberina los más abundantes. En las flores se hallan flavonoides como 3-metoxi-quercetin. En las semillas se encuentran argemexitin, eriodictiol y luteolin, junto con un aceite fijo que contiene ácidos grasos argemonicos. Estos compuestos poseen diversas actividades biológicas.



Figura. 6. Tallos, hojas y flores de chicalote

### 3.11 Métodos de extracción de metabolitos secundarios y formulación de biofungicidas

Las plantas representan una valiosa fuente de compuestos químicos que se utilizan para desarrollar nuevos productos (Ayilara et al., 2024). Dadas las grandes diferencias entre los compuestos químicos y el gran número de especies de plantas, es necesario desarrollar un enfoque estandarizado e integrado para extraer dichos compuestos. La mayoría de estas técnicas se basan en el poder de extracción de los diferentes solventes utilizados y la aplicación de calor y/o mezcla (Bitwell et al., 2023). Para obtener estos compuestos, se utilizan técnicas convencionales y no convencionales (Cuadro 2) (Lefebvre et al., 2021). La eficiencia de extracción de cada método depende principalmente de la elección del solvente. La polaridad del compuesto objetivo es el factor más importante en la elección del solvente. La afinidad molecular entre solvente y soluto, transferencia de masa, seguridad ambiental, toxicidad humana y viabilidad financiera también deben considerarse al seleccionar un solvente para la extracción de compuestos bioactivos. Algunos ejemplos de compuestos bioactivos extraídos con diferentes solventes se pueden encontrar en la Figura 7 (Dhawan y Gupta, 2017; Selvamuthukumar y Shi, 2017; Gopalsatheeskumar, 2018; Fierascu et al., 2021).

Cuadro 2. Técnicas de extracción de metabolitos secundarios

Técnicas	
Extracción convencional	Extracción no convencional
Extracción Soxhlet	Extracción asistida por ultrasonidos
Maceración	Extracción por campo eléctrico pulsado
Hidrodestilación	Extracción asistida por enzimas
	Extracción asistida por microondas
	Extracción con líquido presurizado
	Extracción con fluidos supercríticos



Figura. 7. Compuestos bioactivos extraídos por diferentes disolventes.

Elaboración propia Canva ® 2024

#### 4. JUSTIFICACIÓN

Las enfermedades de las plantas representan una serie amenaza para la seguridad alimentaria, con pérdidas de cultivos que pueden alcanzar hasta el 43 % (Strange y Scott, 2005; Oerke, 2006). Para asegurar un rendimiento adecuado, es fundamental controlar las enfermedades de los cultivos de manera eficiente. Los fungicidas han sido ampliamente empleados por los agricultores debido a su acción rápida y efectiva en el control de enfermedades fúngicas. Sin embargo, las estrategias de manejo basadas en el uso de fungicidas no siempre han logrado resultados óptimos, ya que los patógenos han desarrollado resistencia a estos tratamientos (De Rodríguez et al, 2011). Además de las preocupaciones relacionadas con la salud, el uso inadecuado de pesticidas químicos genera diversos problemas ambientales, como la contaminación de aguas superficiales y subterráneas, efectos negativos en la microbiota del suelo y riesgos para la salud de los ecosistemas terrestres y acuáticos (Tilman et al., 2002).

En este contexto, los pesticidas botánicos, también conocidos como extractos o compuestos vegetales, han surgido como una alternativa para prevenir, destruir o controlar diversas plagas y enfermedades. Estos biofungicidas ofrecen ventajas significativas, como una menor toxicidad, rápida biodegradación, acción mas específica hacia una plaga particular, y en modo de acción dirigido que ayuda a mantener el equilibrio ecológico. Por lo tanto, representan una opción prometedora para desarrollar nuevos agentes de control biológico que sean tanto eficientes como seguros para los humanos (Marutescu et al., 2017). En consecuencia, es de gran relevancia investigar las propiedades antifúngicas de *Argemone mexicana* L. tanto *in vitro* como *in situ* contra fitopatógenos que afectan al tomate, así como los efectos fisiológicos y bioquímicos del extracto en plantas de tomate infectadas bajo condiciones de invernadero.

## 5. HIPÓTESIS

El extracto de chicalote presenta compuestos bioactivos con actividad antifúngica, además mejora aspectos fisiológicos y bioquímicos en plantas de tomate infectadas con un hongo fitopatógeno.

## 6. OBJETIVOS

### 6.1 Objetivo general

Determinar los compuestos bioactivos presentes en el extracto y evaluar la actividad antifúngica *in vitro* e *in situ* del extracto de *Argemone mexicana* L., así como los efectos fisiológicos y bioquímicos del extracto en plantas de tomate infectadas con un hongo fitopatógeno.

### 6.2 Objetivos específicos

Obtener y caracterizar el extracto de las hojas de chicalote mediante fenoles, flavonoides y actividad antioxidante ABTS y DPPH para los ensayos microbiológicos.

Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto en distintas concentraciones contra *Fusarium oxysporum* y *Phytophthora infestans*.

Determinar la severidad de la enfermedad en plantas de tomate infectadas con el fitopatógeno mayormente controlado de los bioensayos *in vitro* bajo condiciones de invernadero.

Evaluar los efectos fisiológicos y bioquímicos del extracto en plantas de tomate infectadas con un fitopatógeno en el ensayo *in situ*.

## 7. MATERIALES Y MÉTODOS

### 7.1 Material Vegetal

Se recolectaron muestras al azar de tallos con hojas de *Argemone mexicana* en etapa de desarrollo vegetativo, en el periodo de invierno en la región de Cuauhtepic de Hinojosa, Hidalgo, México, ubicada a 20 ° 09' 00"N, 98'00" W, a una altitud entre 2,200-2,900 m.s.n.m con una temperatura media anual de 20 °C. Las muestras colectadas fueron depositadas en bolsas de plástico y transportadas al laboratorio de Postcosecha de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH). Inmediatamente las hojas se separaron de los tallos. La mitad de la muestra total de hojas se secaron a la sombra a una temperatura de 24 ± 2 °C las hojas fueron extendidas en una superficie plana sanitizada por 15 días. El resto de las hojas se almacenaron a una temperatura de -70 °C (Thermo Scientific 703 Ultra-Low Freezer, Grand Island, NY, EE. UU.), y después fueron preservadas en una liofilizadora (Modelo 79480 LABCONCO, Kansas City, MO, USA), tanto las muestras secas a temperatura ambiente y las liofilizadas, se molieron en un molino de cuchillas (GM 200, Grindomix, Glen Mills Inc, Clifton, New Jersey, USA). Las muestras se almacenaron a 5 °C hasta su posterior análisis.

### 7.2 Obtención del extracto vegetal

El extracto de las hojas se obtuvo por maceración con acetato de etilo (200 mL) y 20 g de muestra de planta (secas a temperatura ambiente y liofilizadas) respectivamente. La maceración se mantuvo durante 7 días, para después filtrar el extracto dos veces a través de papel de filtro Whatman no. 1. El solvente en el extracto se eliminó al vacío, utilizando un evaporador rotativo (Büchi R-215, Flawil, Switzerland) por 4 horas a una temperatura de 40 °C y presión de 60 mbar, como lo indicó el equipo. El extracto se almacenó en un desecador a 26 °C y 0 % de humedad ambiental hasta su uso en los bioensayos (De Rodríguez et al., 2011).

## 7.3 Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante

### 7.3.1 Contenido fenólico total

La muestra respectiva se mezcló con 10 mL de etanol, posteriormente se colocó en un baño ultrasónico (Ultrasonic Cleaner, Mod. 32V118A, Freeport, IL, EE. UU.) durante 15 min y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min (centrífuga Thermo Scientific, Mod. .ST 16R, Waltham, MA, EE. UU.). El sobrenadante se utilizó para la determinación del contenido fenólico total, flavonoides y actividad antioxidante a través de los ensayos ABTS y DPPH. El contenido de fenoles totales se determinó mediante el reactivo de Folin-Ciocalteu siguiendo la metodología de Montaña-Herrera et al., (2022). Las muestras se leyeron en un espectrofotómetro (Genesys 150 UV/Visible, Daly City, CA, EE. UU.) a 725 nm cada tratamiento por triplicado. Los resultados se expresaron en miligramos de ácido gálico equivalente por gramo de peso seco (mg GAE g<sup>-1</sup> de peso seco).

### 7.3.2 Flavonoides

El contenido de flavonoides se determinó por el método descrito por Hernández-Fuentes et al. (2023). Se mezcló 0.5 mL del sobrenadante con 2 mL de una solución de AlCl<sub>3</sub> al 2 %, posteriormente se dejó reaccionar por 20 min; Las muestras se leyeron a una absorbancia de 415 nm en un espectrofotómetro, cada tratamiento por triplicado. Los resultados se expresaron en miligramos de quercetina equivalente por gramo de peso seco (mg QE g<sup>-1</sup> de peso seco).

### 7.3.3 Capacidad antioxidante

La determinación de la capacidad antioxidante mediante la inhibición del radical 2,2-Azino-bis (ácido 3-etilbenzotiazolina-6-sulfónico) (ABTS) se llevó a cabo según lo descrito por Re et al., (1999). Se hizo reaccionar el radical 7 M ABTS con persulfato de potasio 2.5 M (K<sub>2</sub>S<sub>2</sub>O<sub>8</sub>) y se agitó durante 16 horas en la oscuridad. Posteriormente, se mezcló 0.1 mL de la muestra con la solución ABTS y se dejó reposar por 10 min. Las muestras se leyeron a una absorbancia de 734 nm. Para obtener los resultados, se preparó una curva estándar de Trolox a una concentración de 0-50 mg L<sup>-1</sup>. Los resultados se expresaron en equivalentes micromoles de Trolox por gramo de peso seco (μM TE g<sup>-1</sup> peso seco). Se determinó la capacidad antioxidante por el método

DPPH, siguiendo la metodología descrita por Brand-Williams et al. (1995). Se preparó una solución etanólica a  $6 \times 10^{-5}$  M de DPPH, que se dejó en agitación en completa oscuridad durante 2 h. Luego, se mezclaron 0.5 mL de muestra con 2.5 mL de la solución de DPPH y se agitó la mezcla por 1 h a 4 °C. Inmediatamente se leyó la absorbancia de la mezcla a una longitud de onda de 515 nm. Los resultados se expresaron en equivalentes micromoles de Trolox por gramo de peso seco ( $\mu\text{M QE g}^{-1}$  de peso seco).

#### 7.4 Análisis por cromatografía-espectrometría de masas (GC-MS)

El análisis cromatográfico se realizó en un sistema GC 7890A de Agilent Technologies conectado a un GC/MSD 5975 en modo de escaneo sin división. La separación de metabolitos en los extractos se realizó en una columna DB17HT (30 m  $\times$  0.25 mm 1D  $\times$  0.15  $\mu\text{L}$ ) y un sistema de ionización a una energía de 70 eV. El helio fue el gas portador con un flujo constante de 3 mL/min. Se utilizó un volumen de inyección de 1  $\mu\text{L}$  a una temperatura de inyección de 270 °C. El programa de calentamiento del horno fue isotérmico: un minuto a 60 °C, seguido de un minuto a 30 °C, un minuto a 80, un minuto a 10 °C, un minuto a 110 °C, un minuto a 6 °C y finalmente 270 °C sostenido durante 40 min. Los espectros de masas de los compuestos se interpretaron utilizando la base de datos del Instituto Nacional de Estándares y Tecnología (NIST), siguiendo la metodología propuesta por Raja Rajeswari, RamaLakshmi y Muthuchelian (2011). Los resultados reportados fueron: tiempos de retención (RT) en minutos, nombre, fórmula molecular, peso molecular y área (%) de los componentes. Las soluciones analizadas se prepararon tomando 1 g de cada extracto seco y solubilizándolo en 20 mL de disolvente acetato de etilo. Las soluciones se filtraron a través de papel de filtro Whatman No. 1 para eliminar cualquier partícula sólida y garantizar que las soluciones utilizadas fueran claras y transparentes. Todos los productos químicos utilizados fueron de alta pureza y grado analítico de acuerdo con la metodología de Ullah et al. (2018).

## 7.5 Actividad antifúngica *in vitro* de los extractos vegetales

Las cepas fúngicas empleadas para esta investigación fueron donadas por el laboratorio de Química Ambiental de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo (UAEH) y por el laboratorio de Ecofisiología vegetal de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN). El efecto antifúngico de los extractos de hojas de *Argemone mexicana* L. El crecimiento de los hongos se realizó mediante el método de dilución en agar (Vásquez Covarrubias et al., 2013). Los extractos se incorporaron al medio de cultivo (PDA) después del proceso de esterilización del medio en autoclave (modelo AV07 Lorma, Medical Store, EE. UU.) durante 15 minutos a 121 °C y hasta que el medio alcanzó una temperatura menor a 50 °C. Las concentraciones de extractos empleadas fueron: 1000, 1500, 2000, 2500, 3000 y 3500 ppm. Para poder llevar a cabo el método de dilución del extracto en agar, el extracto fue resuspendido con el solvente acetato de etilo y para facilitar la homogeneización de los extractos en el medio, se agregó Tween 20 al 0.1 % de esta forma los tratamientos incluyeron tres testigos: el control (únicamente PDA), control dos (PDA con solvente) y control tres (PDA con tween 20), luego la mezcla se vertió en placas de Petri hasta su solidificación. Posteriormente, las placas de Petri se inocularon colocando, en el centro de la placa, un explante de 5 mm de diámetro de cada hongo. Todas las concentraciones se llevaron a cabo por quintuplicado. Las placas de Petri se incubaron a 28 ± 2 °C. Se midió el diámetro del crecimiento micelial (mm) tomando lecturas con un sensor digital Vernier modelo CALDI-6MP (Truper, MexicoTM). Las mediciones se tomaron cada 24 h durante 7 días. Para conocer la efectividad de los tratamientos se determinó el porcentaje de inhibición, utilizando el crecimiento del tratamiento control (placa de Petri con solo medio PDA) como referencia, y se calculó según lo informado por Hernández Soto et al., (2018):

$$\% \text{ growth} = [\varphi h / \varphi b] \times 100 \% \quad \text{Ecuación (1)}$$

$$\% \text{ CI} = 100 - \% \text{ growth} \quad \text{Ecuación (2)}$$

Donde  $\varphi h$  representa el diámetro (mm) de crecimiento del hongo.  $\varphi b$  es el diámetro del crecimiento de control negativo de microorganismos en cada evaluación y % CI es el porcentaje de inhibición del crecimiento.

## 7.6 Desarrollo y manejo del cultivo

El cultivo se estableció en un invernadero con cubierta de polietileno. Semillas de tomate Saladette 'El Cid F1' (Harris Moran, Davis, CA, USA) con crecimiento indeterminado se trasplantaron a bolsas de polietileno de color negro de 12 L utilizando como sustrato una mezcla de turba y perlita en una proporción 1:1 (v/v). La planta de tomate se cultivó en un solo tallo. Para la nutrición del cultivo se utilizó un sistema de riego en diferentes concentraciones durante diferentes periodos de crecimiento: 25 % en la etapa vegetativa, 50 % en la etapa de floración, 75 % durante el cuajado de frutos y 100 % durante el llenado y cosecha de frutos, según la metodología descrita por Steiner (1961). La temperatura y la humedad del invernadero se controlaron constantemente con la ayuda de un higrómetro digital. Las temperaturas oscilaron entre  $22 \pm 2$  °C y la humedad se mantuvo en  $\geq 70$  %. Se abrieron o cerraron las ventanas del invernadero y se realizó riego en los pasillos para mantener estas condiciones de temperatura y humedad. Se utilizó un sistema de drenaje por riego por goteo con diferentes niveles de riego en cada fase de crecimiento teniendo en cuenta la dinámica en el manejo, ambiente y desarrollo del cultivo: 100 mL para la etapa de germinación, 500 mL para la etapa de desarrollo vegetativo, 1500 mL para la etapa de floración y cuajado, y 2500 mL para la etapa de fructificación, según los métodos señalados por Flores (2007).

## 7.7 Preparación de la inoculación y evaluación de la gravedad de la enfermedad

La inoculación se preparó siguiendo el método descrito por Smith, Hammerschmidt y Fulbright (1991), con algunas modificaciones. *P. infestans* se obtuvo del "Centro de Ciencias Agrarias de la Universidad Autónoma de Aguascalientes, México". Este se propagó en agar papa dextrosa (PDA) y se incubó durante 18 días a 27 °C. El crecimiento fúngico, junto con el PDA y agua destilada estéril, se mezcló, se colocó en un matraz y se agitó. Luego se filtró la mezcla a través de una gasa estéril y se recogió el micelio. El líquido de las placas de Petri se concentró y se realizó un recuento de esporas en la cámara de Neubauer para ajustar a una concentración de  $(1 \times 10^6$  esporangios  $\text{mL}^{-1}$ ). Se inocularon plantas de tomate con segunda y tercera hojas jóvenes y desarrolladas con la suspensión de esporangios (2 mL por planta) 30 días

después del trasplante utilizando un cepillo de pelo de camello. Las plantas se cubrieron con una bolsa plástica perforada para lograr una humedad relativa  $\geq 70$  % alrededor del follaje, según lo propuesto por la metodología de Ortiz et al. (2016). La escala de severidad de *P. infestans* se determinó mediante el método descrito por Zárate-Martínez et al. (2018), con algunas modificaciones adaptadas a este patógeno. Esta escala tiene valores de 0 a 5; 0, las hojas no muestran signos de marchitez; 1, 1 a 10 % de las hojas presentan ligero marchitamiento marginal; 2, 11 a 25 % de las hojas están marchitas; 3, 26 a 49 % de las hojas presentan marchitez y lesiones en frutos; 4, 50 a 74 % de las hojas presentan marchitez con caída parcial de las hojas; y 5, todas las hojas están marchitas. El índice de gravedad se calculó mediante la fórmula descrita por Raupach et al. (1996):

$$IS = [\sum (NC \times NPC) \times 100\%] / (NTP \times CMA)$$

donde: IS= índice de gravedad; NC= número de clasificación; NPC= número de plantas en la clasificación; NTP= número total de plantas; CMA= clasificación más alta.

## 7.8 Aplicación de tratamientos

Se consideraron cinco tratamientos; T1, plantas sin inoculación y aplicación de extracto de chicalote; T2, plantas inoculadas y aplicación de extracto; T3, plantas inoculadas con el patógeno y fungicida comercial Captán; T4, plantas inoculadas con el patógeno sin tratamiento adicional y T5 plantas sin inoculación y sin tratamiento adicional. Cada planta de tomate en cada aplicación se asperjó mediante una bomba aspersora manual multipropósito con una solución de extracto a una concentración de  $3500 \text{ mg L}^{-1}$  solubilizada en 100 mL de agua y combinada con 1.5 mL de adherente Bionex®. Luego de una semana de inoculación, se aplicaron a cada planta  $100 \text{ mL}^{-1}$  del fungicida comercial Captán, seguido de cuatro aplicaciones más, cada una con dos semanas de diferencia, según la dosis recomendada por el producto ( $3 \times 10^6 \text{ mL}^{-1}$ ) y siguiendo la metodología descrita por El-Nagar et al. (2020) y Jasso de Rodríguez et al. (2020) (Figura 8).

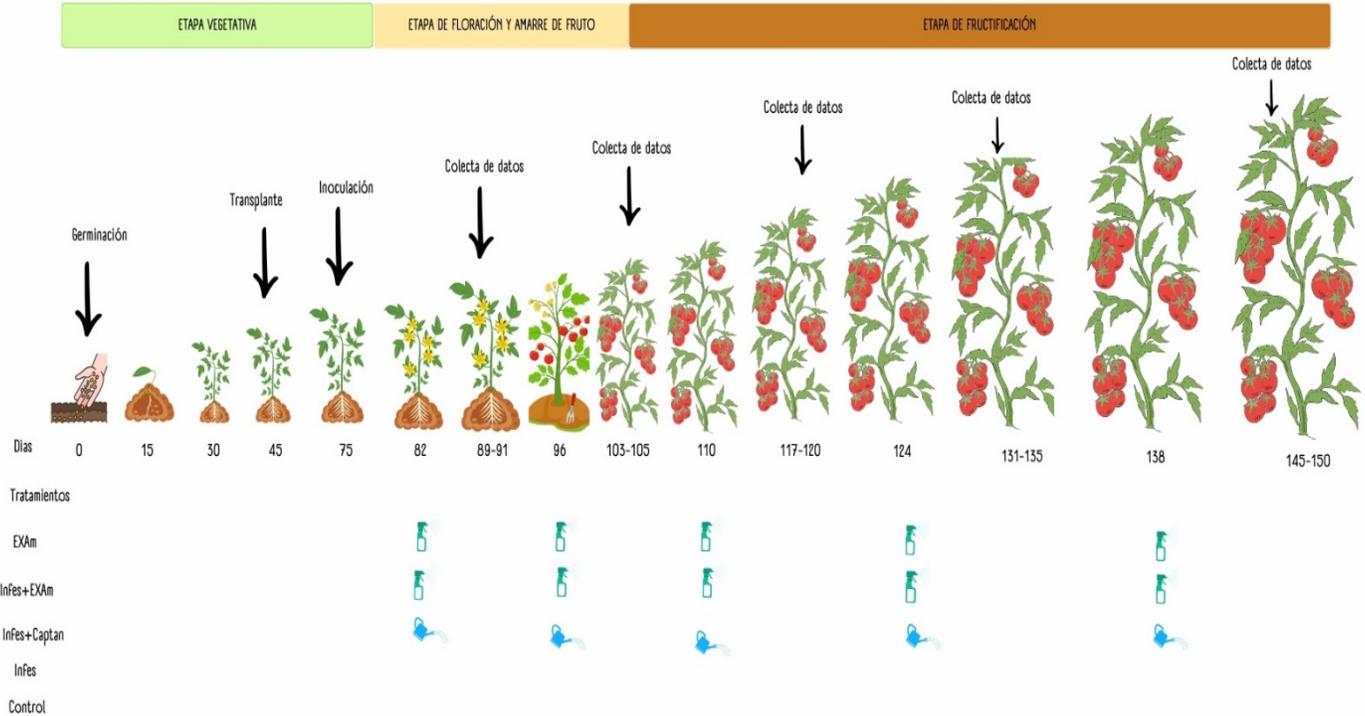


Figura. 8. Aplicación y colecta de datos a lo largo del experimento

Elaboración propia Canva ® 2024

### 7.9 Análisis agronómico

Se evaluó el efecto de los tratamientos sobre las variables agronómicas de las plantas de tomate; peso promedio de los frutos, número de frutos por planta, peso promedio de frutos por planta, diámetro del tallo y peso seco de la biomasa aérea y radicular. Las mediciones se tomaron una semana después de cada una de las cinco aplicaciones (Figura 8). Cuando las plantas tuvieron seis racimos, se eliminó el ápice de crecimiento de las plantas para facilitar el manejo del cultivo. El diámetro del tallo se midió con un pie de rey digital entre la primera y la segunda hoja en la base de la planta 105 días después del trasplante. El rendimiento de frutos, el peso promedio de los frutos y el número de frutos cosechados se calcularon con base en los datos de los cinco muestreos durante el tiempo de experimentación. Las plantas se cortaron en la superficie del sustrato 105 días después del trasplante y se midió el peso seco de las

raíces y brotes (tallos y hojas) luego de secarlos en una estufa de secado (Modelo HFA-1000DP CRAFT, CDMX, México) para 72 horas a una temperatura constante de 80 °C, según la metodología descrita por Hernández-Hernández et al. (2018).

#### 7.10 Muestreo de hojas y frutos

El muestreo se realizó una semana después de cada una de las cinco aplicaciones (Figura 8); las muestras estuvieron compuestas por tres plantas por tratamiento para cada bloque y cuatro hojas jóvenes completamente expandidas de cada planta (2da y 3ra hojas). A partir de los 60 días después del trasplante, la cosecha de frutos se realizó cada semana, cosechándose los frutos cuando tenían un índice de madurez comercial (completamente coloreados) en la etapa de maduración seis según la escala del Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, 2021). Las muestras se almacenaron a -70 °C (Thermo Scientific 703 Ultra-Low Freezer, Grand Island, NY, EE. UU.) y posteriormente se liofilizaron (Modelo 79480 LABCONCO, Kansas City, MO, EE. UU.) y se maceraron hasta obtener un polvo fino. Luego, esta muestra se utilizó para determinar pigmentos fotosintéticos, biomarcadores de estrés y compuestos antioxidantes no enzimáticos.

#### 7.11 Mediciones de pigmentos fotosintéticos

Se analizaron las concentraciones de clorofila a y b, y clorofila total en hojas liofilizadas. Una mezcla de 10 mg de hojas liofilizadas y 2 mL de hexano:acetona (3:2) se centrifugó a 12000 rpm durante 10 min a 4 °C. El extracto resultante se leyó en un espectrofotómetro a longitudes de onda de 645 y 663 nm. Las absorbancias resultantes se utilizaron para cálculos posteriores con las ecuaciones propuestas por Nagata y Yamashita (1992).

#### 7.12 Prueba de biomarcadores de estrés

El peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) se evaluó según la metodología descrita por Sergiev, Alexieva y Karanov (1997), con algunas modificaciones, se tomaron 10 mg de muestra liofilizada y se homogeneizaron con 1000 µL de ácido tricloroacético al 0.1 % frío en un baño de hielo. Después de centrifugar el homogeneizado a 12000 rpm durante 15 minutos a 4 °C, se mezclaron 250 µL del sobrenadante con 750 µL de tampón fosfato

de potasio 10 mM (pH 7,0) y 1000  $\mu$ L de yoduro de potasio (1 M). La absorbancia del sobrenadante se midió a 390 nm. Para medir la peroxidación lipídica en las hojas se utilizó la prueba del ácido tiobarbitúrico (TBA), que determina el contenido de malondialdehído (MDA) como producto final de la peroxidación lipídica. El MDA se determinó según la metodología descrita por Heath y Packer (1968), con algunas modificaciones. En total, se mezclaron 50 mg de muestra con 1000  $\mu$ L de ácido tiobarbitúrico (TBA) (0.1 %) y se centrifugaron (10000 rpm, 20 min, 4 °C). Luego se añadieron 500  $\mu$ L del sobrenadante a 1000  $\mu$ L de TBA (0.5 %) en ácido tricloroacético (20 %). La mezcla se incubó en agua a 90 °C durante 30 minutos, la reacción se enfrió con hielo y la muestra se centrifugó (10000 rpm, 5 min, 4 °C). Luego, se midió la absorbancia del sobrenadante a 532 nm para calcular la cantidad de complejo MDA-TBA utilizando un coeficiente de extinción de 155 mM<sup>-1</sup> cm<sup>-1</sup>. El contenido de anión superóxido (O<sub>2</sub><sup>•-</sup>) se determinó según la metodología descrita por Wang y Luo (1990), con algunas modificaciones. A un total de 20 mg de muestra liofilizada se les añadió 5 mg de PVP y se homogeneizaron con 1000  $\mu$ L de tampón fosfato 50 mM frío (pH 7,8). La mezcla se mantuvo incubada durante 30 minutos a una temperatura de 25 °C. Posteriormente, se combinaron 650  $\mu$ L de la solución incubada con 650  $\mu$ L de ácido aminobencenosulfónico (17 mM) y 650  $\mu$ L de 1-naftilamina (7 mM). La absorbancia se leyó a 530 nm.

### 7.13 Medición de compuestos antioxidantes no enzimáticos

El contenido de fenoles totales se obtuvo utilizando la metodología descrita por Singleton y Rossi (1965), con algunas modificaciones. Se homogeneizó un total de 100 mg de muestra liofilizada y 1 mL de una solución agua/acetona (1:1) durante 30 s. Los tubos de muestra se centrifugaron (17500 rpm, 10 min, 4 °C), luego se colocaron en un tubo de ensayo 18  $\mu$ L del sobrenadante, 70  $\mu$ L del reactivo de Folin-Ciocalteu y 175  $\mu$ L de carbonato de sodio (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>) al 20 %, y se agregaron 1750  $\mu$ L de agua destilada. Las muestras se colocaron en un baño de agua durante 30 min a 45 °C. Finalmente, la lectura se tomó a una longitud de onda de 750 nm. La concentración de flavonoides totales se determinó mezclando 20 mg de tejido liofilizado con más de 2 mL de metanol y posteriormente filtrando con un Filtro Whatman No. 1. Para la cuantificación se utilizó una mezcla de 1 mL de solución y 1 mL de AlCl<sub>3</sub> (2 %) se incubó en condiciones de

oscuridad durante 20 min. Luego se leyó la muestra a 415 nm, según la metodología descrita por Arvouet-Grand et al. (1994). El contenido de vitamina C se determinó según la metodología descrita por Klein y Perry (1982), la cual se leyó a 515 nm, y los resultados se expresaron como miligramos por 100 g de peso seco ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  de PS). El contenido de  $\beta$ -caroteno se determinó según los métodos descritos por Zscheile, Comar y Mackinney (1942) y Nagata y Yamashita (1992). Las absorbancias se leyeron a 453, 505, 645 y 663 nm y los resultados se expresaron en  $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  de PS. Los carotenoides amarillos ( $\beta$ -caroteno,  $\beta$ -criptoxantina, zeaxantina) fueron evaluados según los métodos reportados por Hornero-Méndez y Mínguez-Mosquera (2001). Las mediciones de carotenoides amarillos se expresaron como miligramos por 100 g de peso seco ( $\text{mg } 100 \text{ g}^{-1}$  PS). La cuantificación de proteínas se determinó mediante la técnica colorimétrica de Bradford, método reportado por Bradford (1976). Las muestras se leyeron a una longitud de onda de 630 nm en un lector de microplacas. Las proteínas totales se expresaron en  $\text{mg } \text{g}^{-1}$  de peso seco.

#### 7.14 Análisis estadístico

Se consideraron cinco repeticiones por tratamiento para los ensayos microbiológicos en un diseño completamente al azar. Se realizó una prueba de t-student ( $\alpha = 0.05$ ) para analizar los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. Para determinar las diferencias entre tratamientos en los ensayos microbiológicos, se realizó un análisis de varianza multivariado de medidas repetidas y prueba de Hotteling ( $\alpha = 0.05$ ). Para analizar las variables agronómicas y bioquímicas del tomate, en cada uno de los tratamientos se consideraron cinco repeticiones con tres plantas por unidad experimental, en un diseño de bloques completos al azar. Se realizó un análisis de varianza y la prueba de medias de diferencia mínima significativa de Fisher (LSD,  $\alpha = 0.05$ ). Para determinar las diferencias entre tratamientos en la severidad de *P. infestans*, se realizó un análisis de varianza multivariado de medidas repetidas y la prueba de Hotteling ( $\alpha = 0.05$ ). Todos los procedimientos estadísticos se realizaron utilizando el software Infostat 2020.

## 8. RESULTADOS

### 8.1 Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante

En las muestras de chicalote liofilizadas no se observó una degradación de los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante (Figura 9). En el contenido de fenoles (Figura 9A) se conservó un 200 % en plantas liofilizadas en comparación con el contenido de fenoles en las plantas secadas a temperatura ambiente. En el caso de los flavonoides (Figura 9B) estos se preservaron un 120 % en muestras liofilizadas en comparación al extracto obtenido de la planta secada en condiciones ambientales. Para la actividad antioxidante determinada mediante el radical ABTS (Figura 9C) esta disminuyó un 66 % en comparación a la actividad antioxidante presentada en la muestra liofilizada. Finalmente, en el caso del radical DDPH (Figura 9D) la capacidad antioxidante se preservó un 173 % en muestras liofilizadas en comparación a las muestras secas a temperatura ambiente.

### 8.2 Análisis por cromatografía-espectrometría de masas (GC-MS)

Se identificaron doce compuestos en este extracto, la mayoría con actividad antifúngica y bioestimulante, entre ellos: ácido hexadecanoico, éster metílico; Éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico, (Z,Z,Z)-; Éster 2-metil-1,2-etanodiol del ácido 2-propenoico; Succinato de dl-  $\alpha$ -tocoferol y 3,6-dimetil-4H-furo[3,2-c]piran-4-ona (Cuadro 3).

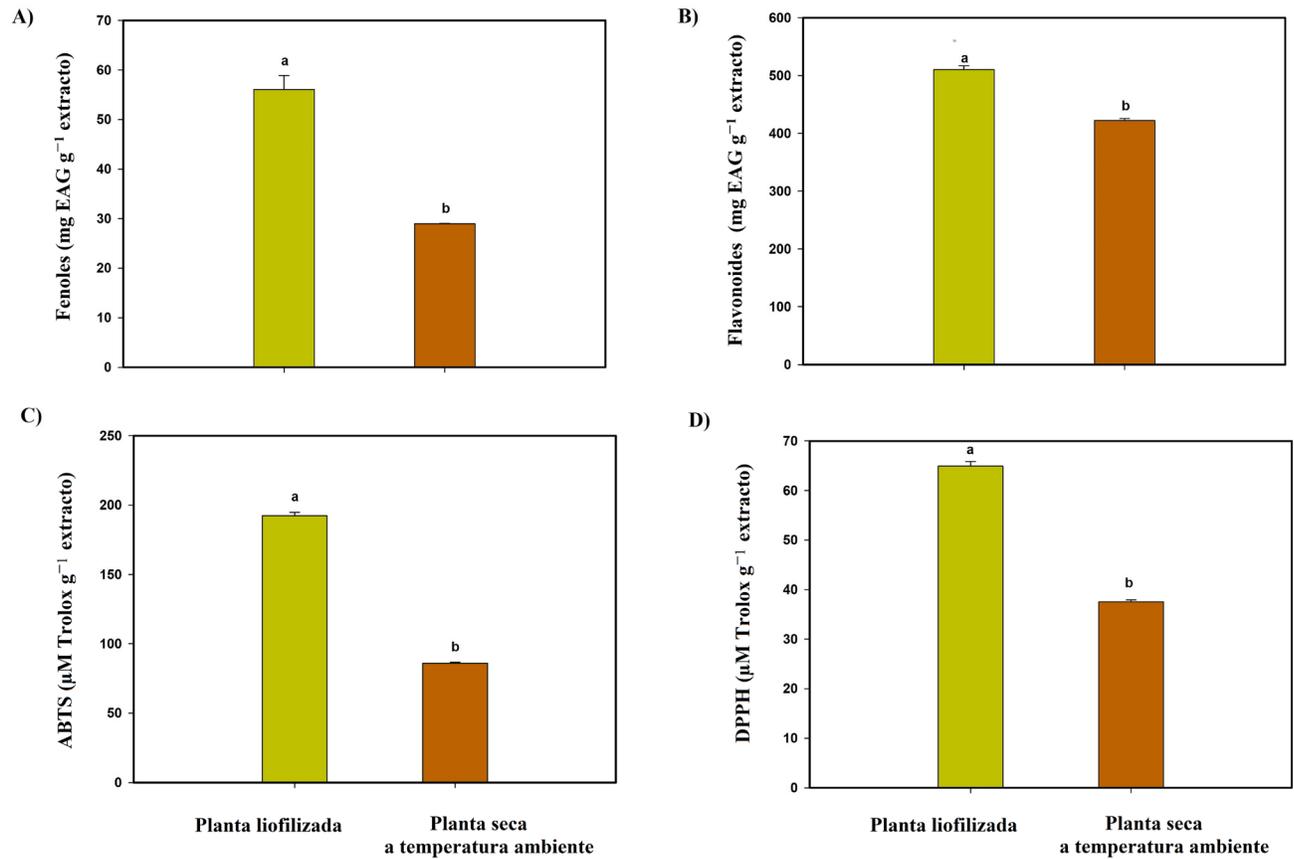


Figura. 9. Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante. **A)** Contenido de fenoles; **B)** Contenido de flavonoides; **C)** Capacidad antioxidante mediante el radical ABTS; **D)** Capacidad antioxidante mediante el radical DPPH. Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas según la prueba de t-student ( $\alpha = 0.05$ ).

Cuadro 3. Compuestos químicos identificados en el extracto de *A. mexicana* L.

TR (min)	Nombre del compuesto	Formula molecular	Peso molecular	Area (%)
6.22	2-propin-1-ol, acetato	C <sub>5</sub> H <sub>6</sub> O <sub>2</sub>	98	1.27
16.71	Éster metílico, ácido hexadecanoico	C <sub>17</sub> H <sub>34</sub> O <sub>2</sub>	270	14.50
17.76	ácido n-hexadecanoico	C <sub>16</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	256	13.54
20.30	Éster metílico, ácido 9,12,15-octadecatrienoico, (Z,Z,Z)-	C <sub>19</sub> H <sub>32</sub> O <sub>2</sub>	292	23.06
33.31	Éster 2-metil-1,2-etanodifílico, ácido 2-propenoico	C <sub>10</sub> H <sub>14</sub> O <sub>4</sub>	198	18.83
35.87	3,6-Diyodo Acridina	C <sub>13</sub> H <sub>7</sub> I <sub>2</sub> N	431	2.75
35.89	succinato de dl- $\alpha$ -tocoferol	C <sub>33</sub> H <sub>54</sub> O <sub>5</sub>	530	10.48
40.68	trans-1,2-ciclohexanodicarbonitrilo	C <sub>8</sub> H <sub>10</sub> N <sub>2</sub>	134	2.58
41.93	Ciclobutano, metil-	C <sub>5</sub> H <sub>10</sub>	70	0.07
43.57	Bencenometanamina, N-(1-metiletil)-	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> N	149	0.64
43.79	3,6-dimetil-4H-furo[3,2-c]piran-4-	C <sub>9</sub> H <sub>8</sub> O <sub>3</sub>	164	12.05
44.01	N-(9H-Fluoren-2-ilmetileno)-p-toluidina	C <sub>21</sub> H <sub>17</sub> N	283	0.23

Estos compuestos son el resultado de 12 réplicas por muestra.

### 8.3 Actividad antifúngica *in vitro* de los extractos vegetales

#### 8.3.1 *Fusarium oxysporum*

Los resultados para el hongo fitopatógeno *F. oxysporum* se muestran en la (Figura 10). En la (Figura 10A) se puede visualizar la actividad biológica presentada en los diferentes tratamientos evaluados con muestras secas a temperatura ambiente tras los 7 días de incubación. En la Figura (10B) se visualiza la actividad antifúngica de los

diferentes tratamientos considerados con muestras liofilizadas después de los 7 días de incubación. En la Figura (10C) se muestra el crecimiento del micelio con ambos extractos y sus respectivas concentraciones; La concentración de 3500 ppm en muestras liofilizadas redujo el crecimiento en un 100 % en comparación al tratamiento control en los primeros tres días de evaluación, comportamiento semejante se obtuvo con el fungicida comercial Captán. En el caso de la concentración de 3500 ppm, pero con las muestras secas bajo a temperatura ambiente estas redujeron en promedio un 14 % en los primeros tres días en comparación al tratamiento control. La concentración de 1000 ppm (Figura 10C) con muestras liofilizadas redujo un 38 % a lo largo de los 7 días de evaluación, en comparación con el tratamiento control; Mientras que las muestras secas a temperatura ambiente redujeron solo el 10 % en el mismo sentido de comparación. El tratamiento con acetato de etilo y Tween 20 no presentaron actividad antifúngica. En la (Figura 10D) se muestran los porcentajes de inhibición con el extracto de chicalote de muestra seca a temperatura ambiente. La concentración de 3500 ppm inhibió el 62.82 % a lo largo de los 7 días de evaluación, y la actividad antifúngica se incrementó un 47 % si se compara con la concentración de 1000 ppm. En la (Figura 10E) se muestran los porcentajes de inhibición con el extracto de chicalote de muestra liofilizada. La concentración de 3500, 3000 y 2500 ppm, presentaron actividad fungicida en los primeros 3 días de evaluación, sin embargo, la concentración de 3500 ppm incrementó la actividad biológica en un 10 % y 56 % respectivamente. La actividad antifúngica se redujo un 73 % con la concentración de 1000 ppm si se compara con la concentración de 3500 ppm (Figura 10E).

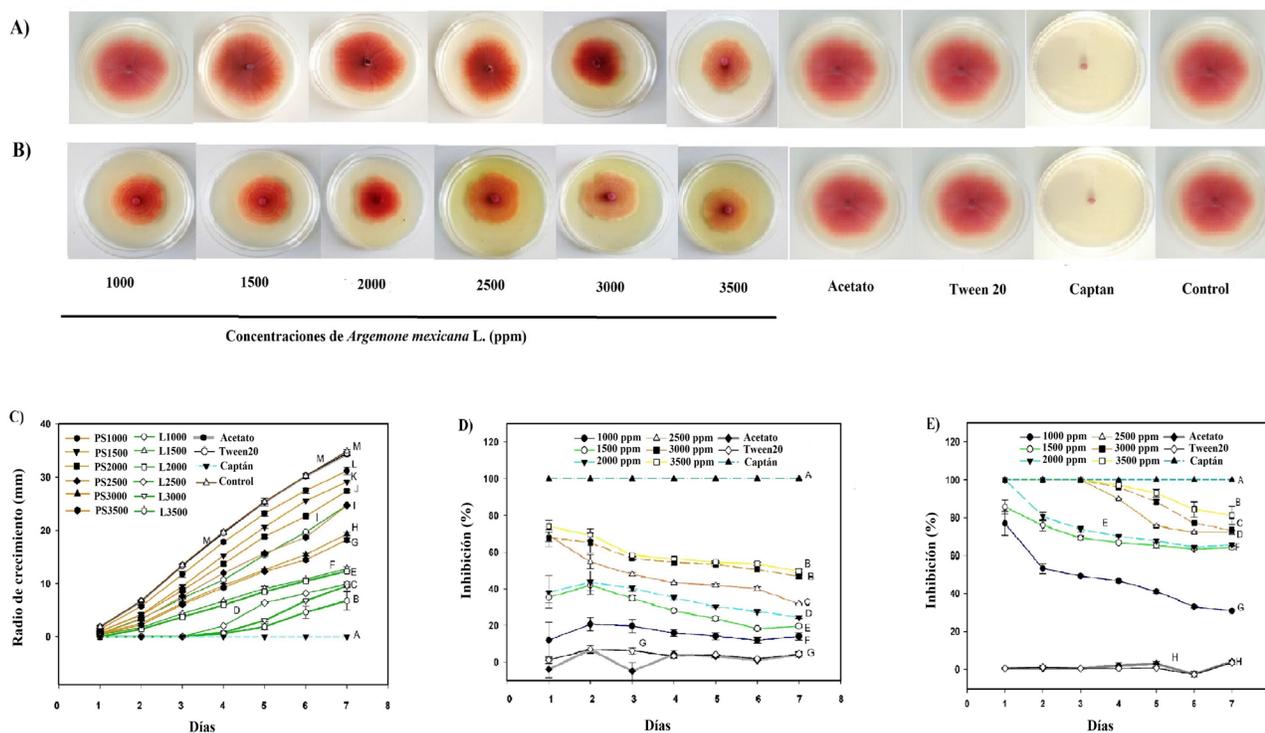


Figura. 10. Actividad antifúngica contra *Fusarium oxysporum* A) actividad antifúngica contra *F. oxysporum* de los diferentes tratamientos del extracto con muestra seca a temperatura ambiente; B) Actividad antifúngica con los diferentes tratamientos del extracto con muestra liofilizada después de 7 días; C) Crecimiento de *F. oxysporum* con ambos extractos; D) % de inhibición del extracto vegetal de *Argemone mexicana* con muestra seca a temperatura ambiente; E) % de inhibición del extracto vegetal con muestra liofilizada. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según la prueba de Hotteling ( $\alpha= 0.05$ ). N = 5 error estándar.

### 8.3.2 *Phytophthora infestans*

Los resultados de *P. infestans* se muestran en la (Figura 11). En la (Figura 11A) se presenta la actividad biológica de los diferentes tratamientos evaluados con muestras secas a temperatura ambiente. En la Figura (11B) se visualiza la actividad antifúngica de los diferentes tratamientos considerados con muestras liofilizadas ambas después de los 7 días de incubación. Los resultados del crecimiento del micelio con ambos extractos se muestran en la (Figura 11C) el extracto con muestra liofilizada a una concentración de 3500 ppm presentó actividad fungicida a lo largo de los 7 días comportamiento semejante al del fungicida comercial Captán, la concentración de 3000 ppm redujo el crecimiento en un 77 % en comparación al tratamiento control, la siguiente concentración que presentó actividad biológica relevante fue 2500 ppm, esta redujo el crecimiento 60 % en el mismo sentido de comparación. Con el extracto a base de planta seca a temperatura ambiente, solo la concentración de 3500 ppm mostró actividad biológica notable con un 29 % en comparación al control, si se compara la actividad antifúngica de esta concentración, pero con el extracto a base de muestra liofilizada esta se incrementó en un 71 %. El porcentaje de inhibición del extracto a base de muestra seca a temperatura ambiente se presenta en la (Figura 11D). La concentración de 3500 ppm se incrementó en un 69% en comparación a la inhibición presentada por la concentración de 1000 ppm; La concentración de 3000 ppm aumentó su actividad antifúngica en un 47 % en comparación a la concentración de 1500 ppm. El porcentaje de inhibición del extracto a base de muestra liofilizada se presenta en la (Figura 11E). La concentración de 3500 ppm presentó una actividad fungicida a lo largo de los 7 días de evaluación. La concentración de 3000 ppm presentó el mismo comportamiento en los primeros 4 días, después el porcentaje de inhibición se redujo un 14 % en comparación a la concentración de 3500 ppm, en el caso de la concentración de 2500 ppm la actividad fungicida duro solo al día 2 de evaluación, el resto de los días el porcentaje de inhibición se redujo un 30 % en el mismo sentido de comparación; Aunque el porcentaje de inhibición se incrementó 72 % con la concentración de 2500 ppm en comparación a la concentración más baja considerada en este experimento.

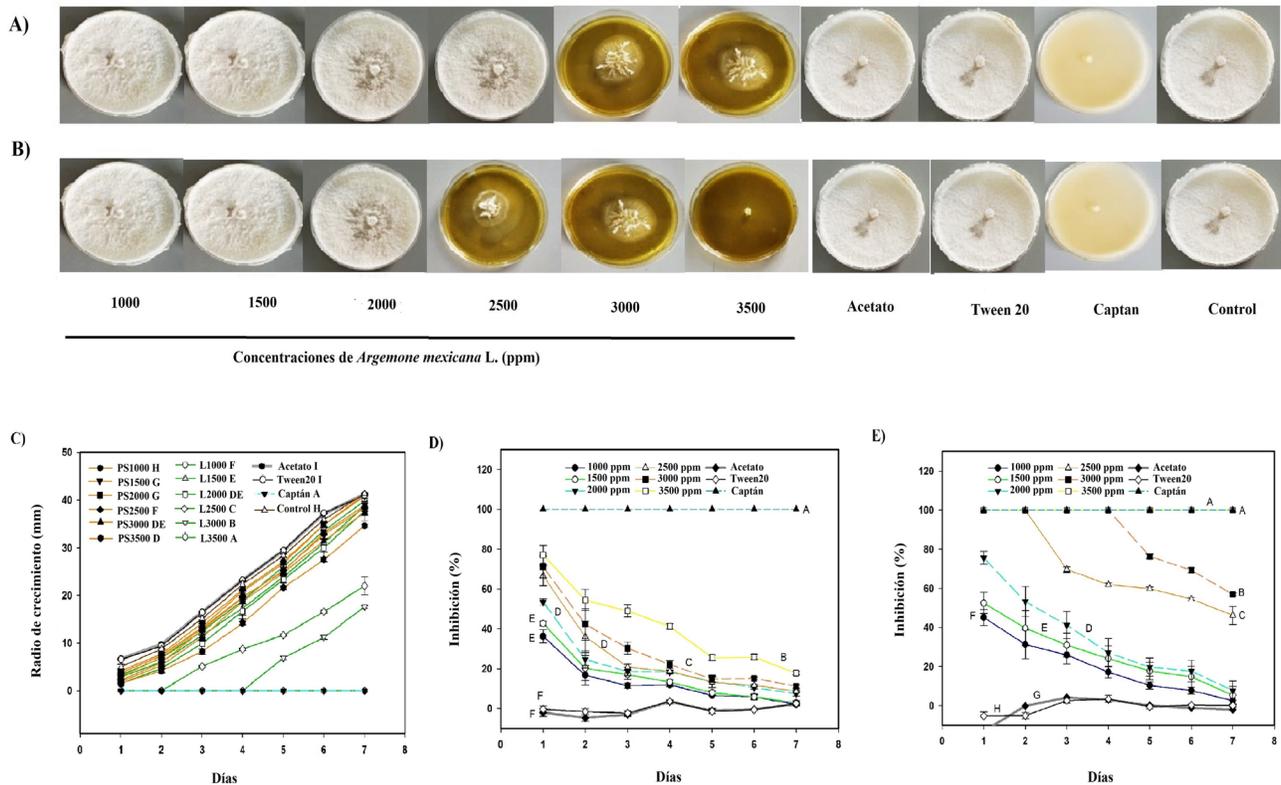


Figura. 11. Actividad antifúngica contra *Phytophthora infestans*. **A)** actividad antifúngica contra *P. infestans* de los diferentes tratamientos del extracto con muestra seca a temperatura ambiente; **B)** Actividad antifúngica con los diferentes tratamientos del extracto con muestra liofilizada después de 7 días; **C)** Crecimiento de *P. infestans* con ambos extractos; **D)** % de inhibición del extracto vegetal de *Argemone mexicana* con muestra seca a temperatura ambiente; **E)** % de inhibición del extracto vegetal con muestra liofilizada. Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según la prueba de Hotteling ( $\alpha = 0.05$ ). N = 5 error estándar.

#### 8.4 *P. infestans* severidad y desarrollo del cultivo

La gravedad de la enfermedad disminuyó con la aplicación de extracto de *A. mexicana* y Captán. El tizón tardío alcanzó una gravedad del 90 % en el tratamiento con Infes (Figura 12A ), pero el tratamiento con Infes+EXAm disminuyó la gravedad de la enfermedad en un 48 %. En comparación, el Captán redujo la gravedad de la enfermedad en un 69 % durante todo el ciclo vegetativo del cultivo. En las primeras semanas después de la inoculación, cuando *P. infestans* fue más efectivo, los tratamientos Infes+ EXAm e Infes+Captán redujeron la gravedad de la enfermedad en un 57.7 % y 71 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento Infes. Durante la etapa de fructificación (75 días después del trasplante) los signos de la enfermedad fueron menos graves (Figura 12B ). Los tratamientos EXAm y control permanecieron libres de enfermedades durante toda la evaluación, lo que era de esperar ya que las plantas en estos tratamientos no fueron inoculadas con *P. infestans* (Figura 12B ).

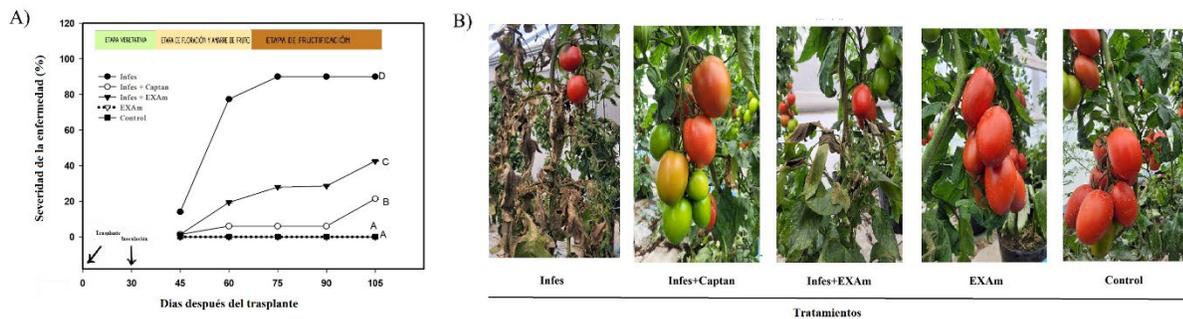


Figura. 12. Tizón tardío en plantas de tomate. (A) Severidad de *P. infestans* en plantas de tomate a lo largo de 105 días después del trasplante. (B) Signos de la enfermedad en plantas 75 días después del trasplante tratadas con diferentes tratamientos. Infes: plantas inoculadas con *P. infestans*; Infes+Captán: plantas inoculadas con fungicida comercial; Infes+EXAm: plantas inoculadas con aplicación de extracto de *A. mexicana*; EXAm: plantas sanas con aplicación de extracto de *A. mexicana*; Control: plantas sanas sin ninguna aplicación adicional. Las barras representan el error estándar de la media. Significancia del análisis de varianza de medidas repetidas ( $\alpha = 0.05$ ). Letras diferentes entre tratamientos indican diferencias significativas según la prueba de Hotteling ( $\alpha = 0.05$ )

El análisis de parámetros agronómicos (Figura 13) mostró que el tratamiento EXAm aumentó el rendimiento del cultivo en un 128 % en comparación con el tratamiento control. El tratamiento Infes redujo el rendimiento del cultivo en un 12 % en comparación con el tratamiento EXAm, pero el tratamiento Infes+EXAm aumentó el rendimiento del cultivo en un 127 % y el tratamiento Infes+Captán aumentó el rendimiento del cultivo en un 113 % en comparación con el tratamiento Infes (Figura 13A). El número de frutos por planta se redujo en un 23 % con el tratamiento Infes, en un 8 % con el tratamiento Infes+EXAm y en un 16 % con el tratamiento Infes+Captán respecto al tratamiento EXAm. El número de frutos aumentó en un 115 % con el tratamiento EXAm en comparación con el tratamiento de control (Figura 13B). Se observaron patrones similares para el peso promedio de frutos por planta (Figura 13C). El tratamiento Infes redujo el peso promedio de los frutos en un 11 % respecto al tratamiento EXAm, pero aumentó el peso de los frutos en un 110 % respecto al tratamiento control. Incluso en plantas enfermas con la aplicación de extracto (Infes+EXAm) y fungicida comercial (Infes+Captán), el peso del fruto aumentó en promedio 102 % en el mismo sentido de comparación.

A lo largo del ciclo vegetativo, el diámetro del tallo se redujo en promedio un 15 % en los tratamientos Infes+EXAm e Infes+Captán. Sin embargo, el diámetro del tallo aumentó en un 110 % con el tratamiento EXAm en comparación con el tratamiento de control y se redujo en un 23 % en el tratamiento Infes en comparación con el tratamiento EXAm (Figura 13D). Aunque la aplicación foliar de extracto de chicalote afectó el rendimiento y el desarrollo del cultivo, no hubo diferencias significativas en el peso seco aéreo (Figura 13E) y de raíces (Figura 13F).

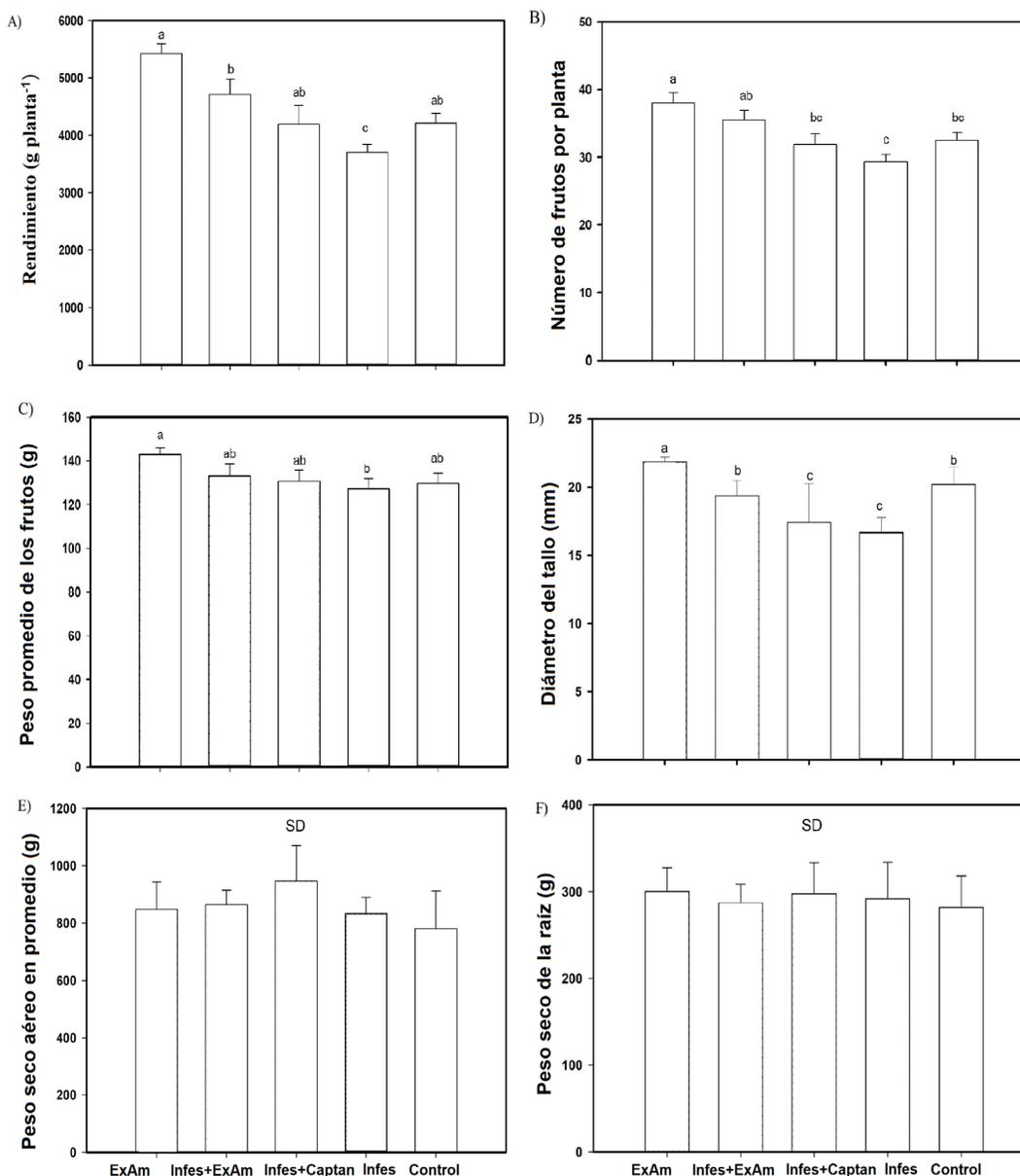


Figura. 13. Parámetros agronómicos en plantas de tomate. A) Rendimiento de los frutos por planta B) número de frutos por planta C) peso promedio del fruto D) diámetro del tallo E) peso seco aéreo en promedio F) peso seco de la raíz. EXAm: Plantas sanas y aplicaciones del extracto de *A. mexicana*; Infes+EXAm: Plantas inoculadas y aplicaciones del extracto *A. mexicana*; Infes+Captán: Plantas inoculadas y aplicaciones del fungicida comercial; Infes: Plantas inoculadas con *P. infestans*; Control: Planta sana sin ninguna aplicación adicional. Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas según la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).  $n = 5$  error estándar.

## 8.5 Contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas

El contenido de pigmentos fotosintéticos fue variable a lo largo de las diferentes evaluaciones en el ciclo vegetativo del cultivo (Figura 14). El contenido de clorofila a (Figura 14A) aumentó en un 157 % con Infes+EXAm en comparación con el control a los 45 ddt (etapa de floración y cuajado). A los 60 y 75 ddt (etapa de floración y cuajado, etapa de fructificación) EXAm e Infes+EXAm aumentaron el contenido de clorofila a en un 129 % y 121 %, respectivamente, en comparación con el control. Aun así, la clorofila a se redujo en un 35 % con el tratamiento Infes+Captán en la misma comparación de tiempo. En los días 90 y 105 después del trasplante (etapa de fructificación), el contenido de clorofila se redujo en un 52 % con el tratamiento Infes, pero aumentó en un 150 % con el tratamiento EXAm en comparación con el tratamiento control.

El contenido de clorofila b (Figura 14B) disminuyó en promedio un 47 % con el tratamiento Infes+Captán en comparación con el tratamiento control a lo largo de las diferentes evaluaciones del ciclo vegetativo. Entre los 60 y 75 ddt (etapa de floración y cuajado, etapa de fructificación), el contenido de clorofila b se redujo en un 78 % con el tratamiento Infes+Captán. En estas mismas evaluaciones, los tratamientos EXAm e Infes+EXAm aumentaron el contenido de clorofila b en un 117 % y 133 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento control. Entre 90 y 105 ddt (etapa de fructificación), el contenido de clorofila b se redujo en un 48 % con el tratamiento Infes, pero aumentó en un 138 % con el tratamiento EXAm en comparación con el tratamiento control.

En general, los valores más altos de contenido de clorofila total (Figura 14C) se observaron en el tratamiento de control excepto a los 45 ddt (etapa de floración y cuajado) y a los 60, 75 y 90 después del trasplante (etapa de floración y cuajado y etapa de fructificación) cuando los tratamientos EXAm e Infes+EXAm aumentaron el contenido total de clorofila en un 129 %, 154 %, 110 % y 124 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento control. A lo largo de las diferentes evaluaciones durante el ciclo vegetativo, el contenido de clorofila total disminuyó considerablemente con el tratamiento Infes+Captán. A los 60 y 75 ddt (floración y cuajado, etapa de fructificación), el contenido total de clorofila se redujo en un 68 % con el tratamiento

Infes+Captán en comparación con el tratamiento control. Entre los días 90 y 105 después del trasplante (fructificación), el contenido total de clorofila se redujo con los tratamientos Infes+EXAm, Infes+Captán e Infes en un 48 %, 47 % y 52 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento de control, y aumentó en un 148 % con el tratamiento EXAm en comparación con el tratamiento Infes.

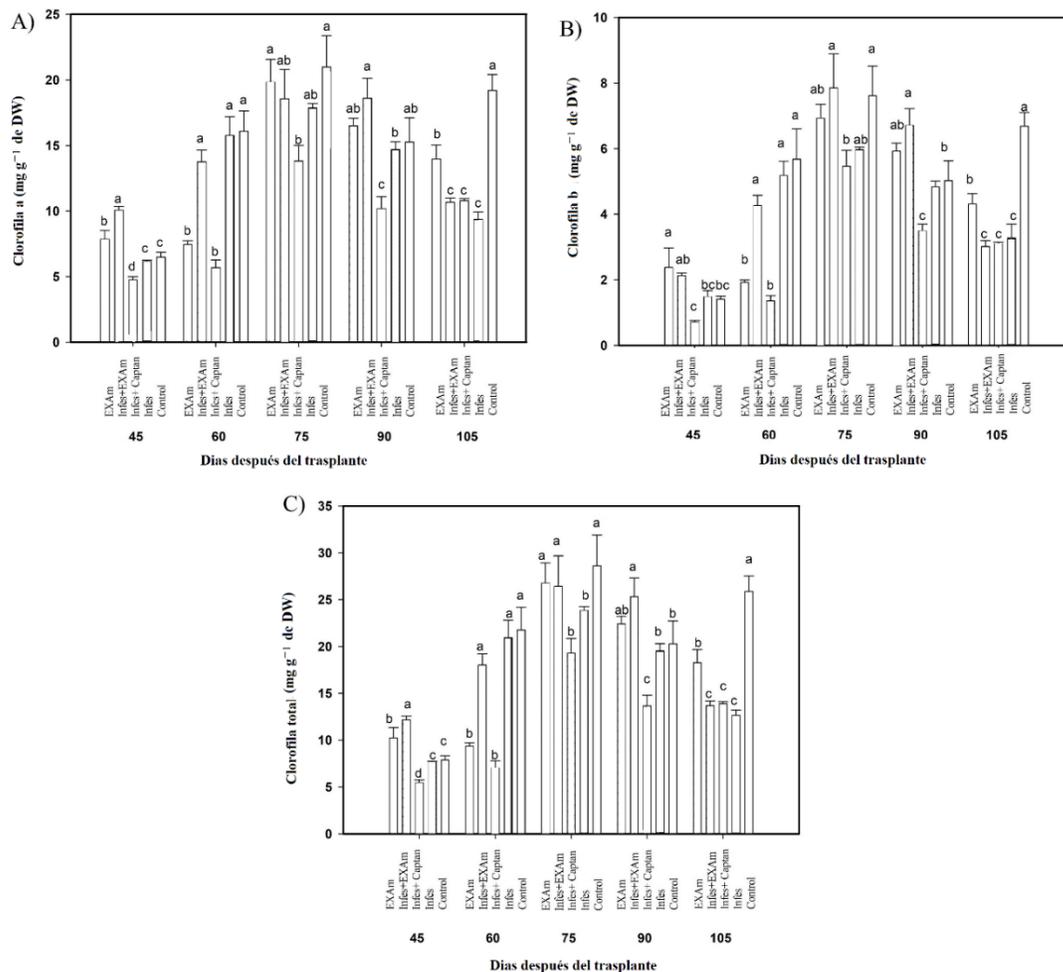


Figura. 14. Contenido de clorofilas en las hojas de tomate con diferentes tratamientos. **A)** clorofila a **B)** clorofila b **C)** clorofila total. EXAm: Plantas sanas y aplicaciones del extracto de *A. mexicana*; Infes+EXAm: Plantas inoculadas y aplicaciones del extracto *A. mexicana*; Infes+Captán: Plantas inoculadas y aplicaciones del fungicida comercial; Infes: Plantas inoculadas con *P. infestans*; Control: Planta sana sin ninguna aplicación adicional. Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas según la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). n = 5 error estándar.

## 8.6 Biomarcadores de estrés en hojas de tomate

El contenido de peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ) en hojas de tomate mostró diferencias significativas entre tratamientos en algunos períodos de evaluación (Figura 15A). Aunque no hubo diferencias significativas en el contenido de  $H_2O_2$  entre tratamientos a los 45 ddt (etapa de floración y cuajado), entre los 60 y 75 ddt (etapa de floración y cuajado, etapa de fructificación), el contenido de  $H_2O_2$  aumentó con la Los tratamientos Infes+EXAm e Infes en un 151 % y 200 %, respectivamente, respecto al tratamiento EXAm, que fue el tratamiento con menor contenido de  $H_2O_2$  con un 10 % menos que el tratamiento control. En los días 90 y 105 ddt (fructificación) los valores más altos de  $H_2O_2$  se produjeron con el tratamiento Infes, pero el contenido de  $H_2O_2$  se redujo en un 58 % con el tratamiento EXAm, en un 60 % con el tratamiento Infes+EXAm y en un 65 % con el tratamiento control respecto al tratamiento Infes.

El contenido de malondialdehído (MDA) (Figura 15B) no se observaron diferencias significativas entre los tratamientos. Aun así, a los 45 ddt (etapa de floración y cuajado), el contenido de MDA se redujo en un 35 % y un 28 % con los tratamientos EXAm e Infes+EXAm, respectivamente, en comparación con el tratamiento control. Entre los 60 y 75 días después del trasplante (etapa fenológica de floración y cuajado, etapa de fructificación), así como entre los 90 y 105 ddt (fructificación), la síntesis de MDA aumentó con todos los tratamientos previamente inoculados con *P. infestans*. En contraste, EXAm y el tratamiento de control informaron las concentraciones más bajas de MDA, como se esperaba. Los tratamientos Infes+EXAm, Infes+Captán e Infes aumentaron el contenido de MDA en 133 %, 120 % y 145 %, respectivamente, respecto al tratamiento control entre los 60 y 75 ddt (etapa de floración y cuajado, etapa de fructificación). Entre 90 y 105 ddt (fructificación), el tratamiento Infes+Captán aumentó aún más el contenido de MDA en un 17 % y 18 % en comparación con los tratamientos Infes+EXAm e Infes, respectivamente.

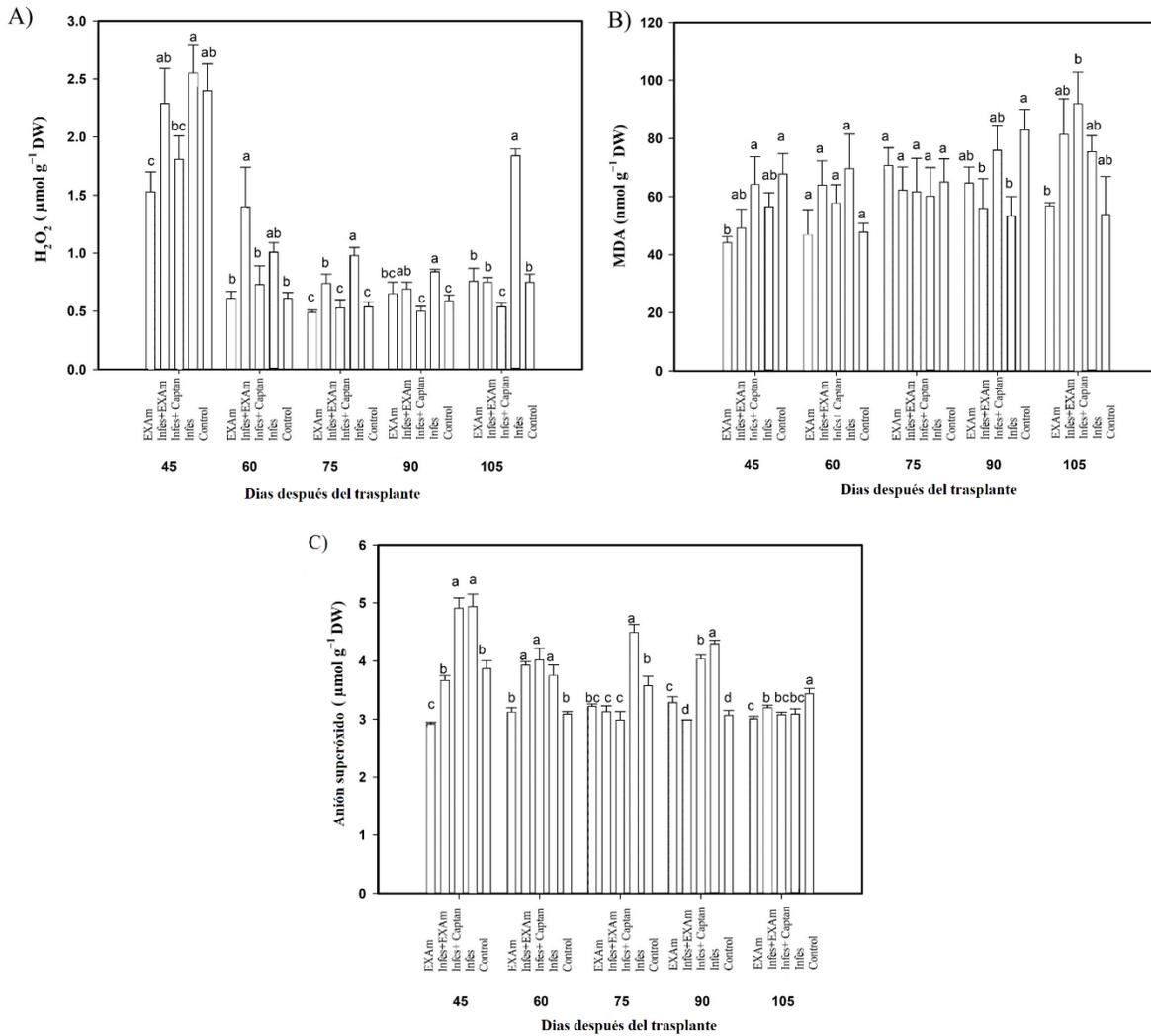


Figura. 15. Biomarcadores de entres en plantas de tomate. **A)** peróxido de hidrógeno (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) **B)** malondialdehído (MDA) y **C)** anión superóxido en hojas de tomate con diferentes tratamientos. EXAm: Plantas sanas y aplicaciones del extracto de *A. mexicana*; Infes+EXAm: Plantas inoculadas y aplicaciones del extracto *A. mexicana*; Infes+Captán: Plantas inoculadas y aplicaciones del fungicida comercial; Infes: Plantas inoculadas con *P. infestans*; Control: Planta sana sin ninguna aplicación adicional. Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas según la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ). n = 5 error estándar.

En la mayoría de las evaluaciones durante el ciclo vegetativo de este cultivo, la concentración del anión superóxido (Figura 15C) aumentó con el tratamiento Infes, aumentando en promedio un 145 % a los 45 ddt (etapa de floración y cuajado) y entre los 60 y 75 ddt (etapa de floración y cuajado de fruto, etapa de fructificación) en comparación con el tratamiento control. A los 45 ddt (etapa de floración y cuajado), el contenido de anión superóxido se redujo en un 26 % y 6 % con los tratamientos EXAm e Infes+EXAm, respectivamente, en comparación con el control y en un 41 % y 28 %, respectivamente, en comparación con el control. el tratamiento Infes. Entre 60 y 75 ddt (etapa de floración y cuajado, fructificación) y entre 90 y 105 ddt (fructificación), los tratamientos EXAm y/o Infes+EXAm redujeron la concentración de anión superóxido en un promedio de 5 % y 8 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento de control. Entre 90 y 105 ddt (etapa de fructificación), el tratamiento control incrementó la síntesis de superóxido en un 114 % en comparación con el tratamiento EXAm.

### 8.7 Compuestos antioxidantes no enzimáticos

El contenido de fenol se redujo en un promedio del 21 % con el tratamiento Infes en comparación con el tratamiento de control a lo largo de todas las evaluaciones durante el ciclo vegetativo (Figura 16A). En algunas evaluaciones, la diferencia fue considerable. Por ejemplo, a los 45 ddt (etapa de floración y cuajado), el contenido de fenol se redujo en un 43 % con el tratamiento Infes en comparación con el tratamiento de control. Durante la etapa de floración y cuajado de frutos (60 días después del trasplante), el contenido de compuestos fenólicos aumentó en un 127 % con el tratamiento EXAm respecto al tratamiento control. El contenido de flavonoides difirió significativamente entre los tratamientos (Figura 16B), con los tratamientos Infes+Captán e Infes reduciendo el contenido de flavonoides en un 22 % y 25 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento de control, y el tratamiento EXAm aumentó el contenido de flavonoides en un 113 % en promedio respecto al tratamiento control en los diferentes tiempos de evaluación. El contenido de vitamina C no cambió con la presencia de *P. infestans* (Figura 16C). El contenido de  $\beta$ -caroteno aumentó un 106 % con el tratamiento Infes+EXAm respecto al tratamiento control a los 60 y 75

días después del trasplante (etapa fenológica de floración y cuajado, etapa de fructificación; (Figura 16D). El tratamiento Infes+Captán redujo el contenido de  $\beta$ -caroteno en promedio un 38 % en comparación con el tratamiento control. Entre 60 y 75 días después del trasplante (etapa fenológica de floración y cuajado, fructificación), los carotenoides amarillos (Figura 16E) se redujeron en promedio un 30 % con el tratamiento Infes+Captán respecto al tratamiento control, y aumentaron un 113 % comparado con el tratamiento EXAm respecto al tratamiento control. El contenido de proteína (Figura 16F) aumentó con los tratamientos EXAm e Infes+EXAm, en un 127 % y 124 %, respectivamente, en comparación con el tratamiento control a los 60 y 75 ddt (etapa fenológica de floración y cuajado, etapa de fructificación). A los 90 y 105 ddt (etapa de fructificación), el tratamiento Infes redujo el contenido de proteína en un 30 % respecto al tratamiento control.

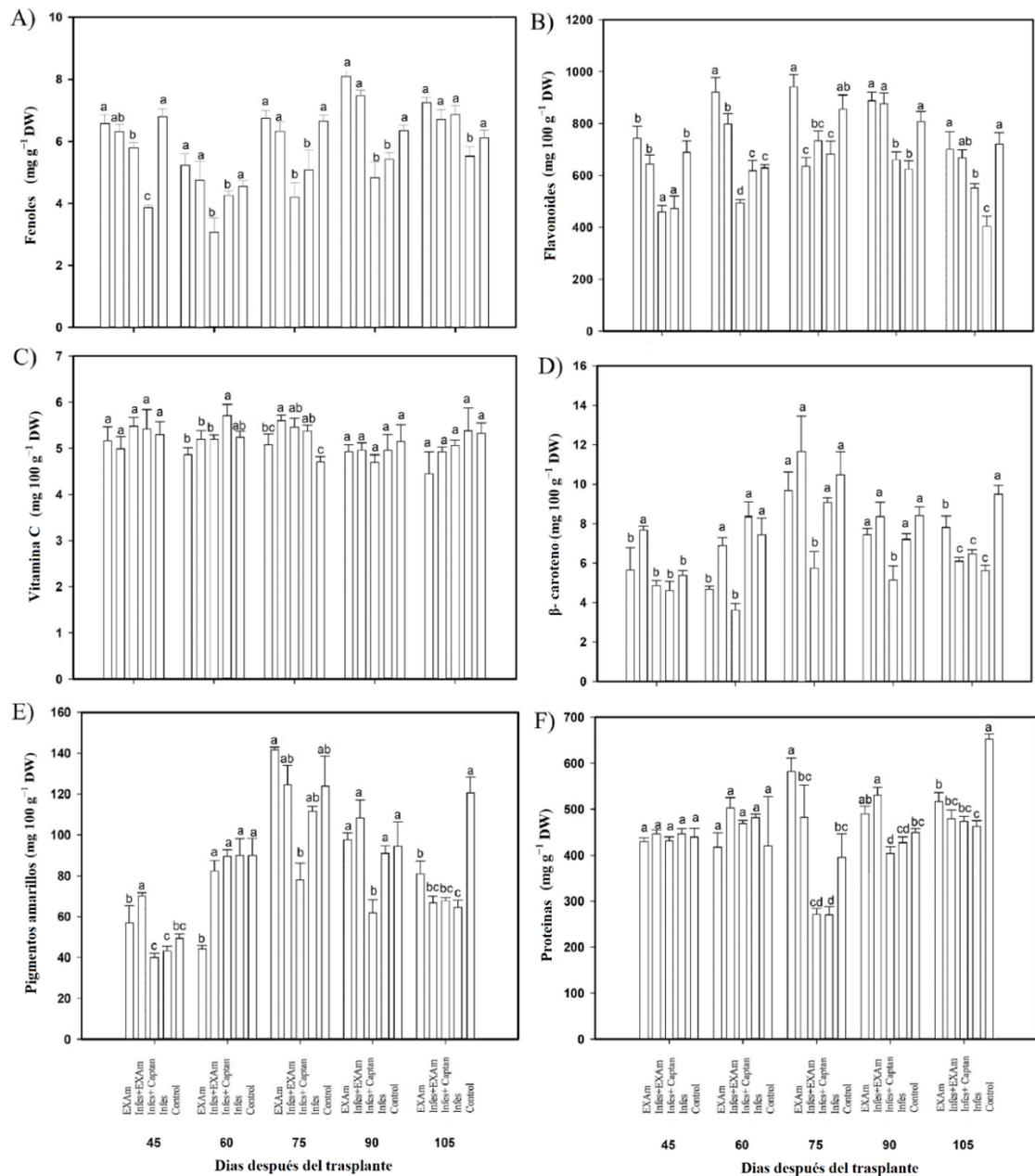


Figura. 16. Compuestos antioxidantes no enzimáticos en las hojas de tomate con diferentes tratamientos. **A)** fenoles **B)** flavonoides **C)** vitamina C **D)**  $\beta$ -Carotenoides **E)** Pigmentos amarillos **F)** Proteínas EXAm:Plantas sanas y aplicaciones del extracto de *A. mexicana*; Infes+EXAm: Plantas inoculadas y aplicaciones del extracto *A. mexicana*; Infes+Captán: Plantas inoculadas y aplicaciones del fungicida comercial; Infes: Plantas inoculadas con *P. infestans*; Control: Planta sana sin ninguna aplicación adicional. Letras diferentes en las barras indican diferencias significativas según la prueba de diferencias mínimas significativas de Fisher ( $\alpha = 0.05$ ).  $n = 5$  error estándar.

## 9. DISCUSIÓN

### 9.1 Compuestos bioactivos y capacidad antioxidante

En esta investigación los compuestos bioactivos y capacidad antioxidante (Figura 10) se conservaron en las hojas de *Argemone mexicana* L. liofilizadas y esto puede deberse a que la liofilización al vacío permite preservar compuestos térmicamente sensibles y propensos a la oxidación a medida que se va eliminación de agua (Bhatta et al., 2020). La liofilización conduce al desarrollo de cristales de hielo dentro de la matriz de la planta; Los cristales de hielo pueden resultar en una mayor ruptura de la estructura celular de la planta, lo que puede permitir un mejor acceso al solvente y extracción. Además, las temperaturas más bajas en el proceso permiten la máxima retención de nutrientes y compuestos bioactivos (Asami et al., 2003). Con el secado a temperatura ambiente hay poca o ninguna ruptura celular y existe el efecto adicional del calor, que puede causar degradación de fenoles y flavonoides (Dixon y Paivan., 1995). Sin duda, la elección del método de secado es fundamental para conservar compuestos fitoquímicos, pero existen otros factores a considerar como lo es: la etapa fenológica de la muestra vegetal y factores ambientales (e.g., la región geográfica, el clima y las especificaciones del suelo) (Akyüz y Ersus, 2021). Fisiológicamente, la liofilización previene la desnaturalización de proteínas y la pérdida de actividad enzimática, factores clave en la conservación de compuestos antioxidantes (Bhatta et al., 2020). Además, la formación de cristales de hielo dentro de los tejidos durante el proceso puede facilitar la ruptura de las paredes celulares, permitiendo un mayor acceso a los compuestos bioactivos encapsulados dentro de las células, que de otro modo serían menos accesibles en métodos de secado que implican calor. Esta preservación también se ve influenciada por el estado fenológico de la planta, ya que diferentes etapas de desarrollo pueden tener variaciones significativas en la concentración de estos compuestos debido a que la regulación fisiológica de la síntesis y acumulación de metabolitos secundarios (Diwathe et al., 2024).

Ebrahimi et al. (2022) evaluaron el impacto de diferentes métodos de secado en hojas de remolacha azucarera (*Beta vulgaris* L.), los autores reportan que las hojas liofilizadas evitaron la degradación en el contenido de compuestos bioactivos. En otra investigación realizada por Youssef et al. (2014) analizaron el efecto de diferentes

secados en hojas de verdolaga (*Portulaca oleracea* L.), ellos reportan que en las hojas liofilizadas se preservaron el contenido de compuestos fenólicos, flavonoides y capacidad antioxidante (ABTS Y DPPH). Martínez-Las Heras et al., 2014 reportaron que, en términos de contenido de fenoles totales, flavonoides y capacidad antioxidante el método de secado por liofilizado fue uno de los métodos óptimos para conservar la composición fitoquímica de las hojas de caqui (*Diospyros kak* L.f.), lo anterior mencionado coincide a lo observado en esta investigación (Figura 9).

## 9.2 Análisis por cromatografía-espectrometría de masas (GC-MS)

En el extracto de *Argemone mexicana* L. se encontraron los siguientes compuestos, algunos con reportes previos de actividad biológica y bioestimulante (Cuadro 3). Aun así, es importante mencionar que estos compuestos no han sido probados contra *P. infestans*; y aunque el éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico (Z,Z,Z) ha sido evaluado como bioestimulante, el cultivo de tomate no ha sido considerado en la evaluación; lo que convierte a esta investigación en el primer reporte del extracto de *A. mexicana* como potencial antifúngico contra el tizón tardío y como bioestimulante en plantas de tomate. Según la revisión de la literatura, se ha informado que el éster metílico del ácido hexadecanoico tiene actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos como *Alternaria solani* (Abubacker y Deepalakshmi, 2013) y se ha informado que está involucrado en las vías de señalización de las plantas en respuesta al estrés y en estimular el crecimiento en *Perilla* sp. (Ahn et al., 2020); Se ha informado que el ácido n-hexadecanoico tiene actividad antibacteriana y actividad eliminadora de radicales DPPH y H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Saravanakumar et al., 2018); Se ha informado que el éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico (Z,Z,Z) presente en extractos botánicos de *Linum usitatissimum* L. tiene actividad antifúngica y bioestimulante potencial en el rendimiento de los cultivos de soja (Kocira et al., 2021); El éster 2-metil-1,2-etanodílico del ácido 2-propenoico ha mostrado actividad antifúngica contra fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* (Septiyanti et al., 2019); El succinato de dl-  $\alpha$ -tocoferol, uno de los antioxidantes más potentes, previene la propagación de la peroxidación lipídica (Munné-Bosch, 2005); y se ha demostrado que la 3,6-dimetil-4H-furo[3,2-c]piran-4-ona atrae avispas polinizadoras (Freitas et al., 2020).

### 9.3 Actividad antifúngica *in vitro* de los extractos vegetales

La actividad biológica mostrada por los extractos vegetales contra *Fusarium oxysporum* (Figura 10) y *Phytophthora infestans* (Figura 11) puede explicarse debido al poder antioxidante que tienen los fenoles y flavonoides; La capacidad antioxidante está relacionada con actividad antifúngica (Xoca-Orozco et al., 2018; Fernández et al., 2021). Las plantas malezas son una fuente disponible pero no completamente explorada de compuestos bioactivos donde se incluyen compuestos fenólicos y flavonoides con posibles beneficios en el control de fitopatógenos (Nurzyńska-Wierdak, 2023). Específicamente *A. mexicana* contiene flavonoides tales como: luteolina; eriodictiol; isorhamnetina-3-O- $\beta$ -D -glucopianósido; quercetina; mexitina y compuestos fenólicos como: ácido tánico; ácido cafeico; ácido ferúlico; ácido benzoico: ácido cinámico; ácido vainílico, todos ellos con reportes de actividad biológica (Brahmachari et al., 2013).

Los compuestos fenólicos juegan un papel importante en los mecanismos de defensa de las plantas contra el estrés causado por muchos factores ambientales y diversos patógenos, la principal ruta para la biosíntesis en plantas es la ruta del ácido shikímico, dentro de estos compuestos se incluyen grupos hidroxilo fenólicos, flavonoides, flavonas, ácidos fenólicos y ésteres fenólicos (Simonett et al., 2020). Algunos ácidos fenólicos como: clorogénico, ferúlico y benzoico, pueden ser fungicidas efectivos contra *Fusarium oxysporum* (Przybylska-Balcerek et al., 2022). Los compuestos fenólicos inhiben el crecimiento, reproducción, respiración, y cualquier otra función esencial de los microorganismos (Gordo, 2018). Esta acción la realizan mediante mecanismos como la oxidación de enzimas, cuando los compuestos fenólicos interactúan con enzimas, especialmente aquellas que contienen sitios activos ricos en aminoácidos con capacidad para transferir electrones, pueden ocurrir reacciones de oxidación (es decir, añadir átomos de oxígeno) en enzimas específicas como el sistema enzimático *P450* oxidasa-dependiente que es esencial para las funciones vitales de los microorganismos; Esta oxidación inactiva las enzimas y, por lo tanto,

detiene o reduce las actividades metabólicas cruciales del patógeno (Rodríguez-Maturino et al., 2015).

Por otro lado, los diferentes mecanismos incluyen procesos físicos y químicos. Por ejemplo: en fitopatógenos tratados con extractos vegetales las membranas se sensibilizan, lo que deriva en la destrucción del ácido linoleico y provoca hidrólisis de los fosfolípidos en ácidos grasos libres y lisofosfátidos (Arafa et al., 2022). Este proceso conduce finalmente a la lisis de las membranas celulares en los hongos (Radzuhn y Lyr, 1984). Aunque los mecanismos de acción no están del todo dilucidados se sabe que algunos fitoquímicos se dirigen a los sistemas de membranas intracelulares lo que aumenta la permeabilidad mitocondrial y liberan citocromo c en las células fúngicas, reprimiendo la activación del receptor de la membrana plasmática, alterando la corriente de protones y colapsando el gradiente electroquímico de protones. a través de las membranas mitocondriales, como consecuencia, la síntesis de ATP disminuye y provoca la muerte celular (Kawai y Yamagishi, 2009). Los extractos vegetales también inhiben la respiración microbiana, con diferentes modos de acción: algunos inhiben la NADH oxidoreductasa (complejo I), otros la succinato-deshidrogenasa (complejo II), el citocromo bc1 (complejo III) y algunos desacoplan la fosforilación oxidativa. Estas acciones afectan profundamente el funcionamiento celular de los organismos afectados. En consecuencia, se inhibe la producción de ATP y se interrumpe el metabolismo celular posterior (Guo et al., 1991). Otros mecanismos de acción incluyen alteraciones en la mitosis y la división celular de los hongos, los metabolitos secundarios presentes en los extractos se unen a la  $\beta$ -tubulina en los microtúbulos, inhibiendo su proliferación y suprimiendo su inestabilidad dinámica (Gupta et al., 2004), lo que altera la alineación cromosómica en la placa metafásica y las interacciones microtúbulos-cinetocoro causando pérdida de cromátidas y cromosomas (Rathinasamy y Panda, 2006) esto interfiere con la síntesis de ácidos nucleicos mediante la inhibición de la actividad de la ARN polimerasa I, bloqueando así la síntesis de ARNr al nivel de la transcripción (Bahadir et al., 2012).

Cuando el hospedero detectan la presencia de *P. infestans* se activan los mecanismos de defensa mediante una mayor síntesis de compuestos fenólicos, lo que a su vez

conlleva a expresión de genes de resistencia como lo son: *PGSC0003DMG401024510*, *PGSC0003DMG402002721*, *PGSC0003DMG400026006*, *PGSC0003DMG400014013*, *PGSC0003DMG400026277* (Hao et al., 2018); Además la interacción de estos genes y los genes de avirulencia *RXLR* provoca una respuesta hipersensible (HR), una muerte programada localizada de cualquier célula infectada con *P. infestans*. En otras palabras, cuando el hospedero tiene el gen de resistencia que coincide con un gen de avirulencia *RXLR* del patógeno, este es capaz de detectar la proteína secretada por el patógeno y desencadenar una respuesta inmunológica que limita la infección o la previene por completo (Ivanov et al., 2021).

Existen investigaciones donde se reporta que el uso de extractos vegetales activa la expresión de genes de  $\beta$ -1,3-glucanasa y quitinasa (Banani et al., 2018), lo que provoca el inicio de la respuesta de defensa inducida a nivel enzimático y de transcripción. Las  $\beta$ -1,3-glucanasas son proteínas PR-2 capaces de dañar la pared celular de muchos hongos patógenos, mientras que la quitinasa actúa sobre los enlaces C en la quitina, un componente importante y común de la pared celular fúngica (Thanseem et al., 2005). El reconocimiento de la quitina fúngica desencadena una cascada de señales químicas, activando genes de respuesta que sintetizan proteínas como la fenilalanina amoniaco-liasa (PAL) responsable de la producción de flavonoides y fenoles a través de una ruta de biosíntesis que involucra a la fitohormona ácido salicílico como molécula señal (López-Moya et al., 2019). En el caso específico de los flavonoides contra *F. oxysporum*, su actividad antioxidante afecta las especies reactivas de oxígeno fúngicas procedentes de las mitocondrias del patógeno, las cuales intervienen en la formación del tubo germinal y de hifas (Tucuch-Pérez et al., 2021) esta actividad podría relacionarse con la actividad antifúngica de *A. mexicana* observada en esta investigación (Figura 10). Aunque la actividad antifúngica no puede ser atribuida solo a estos metabolitos secundarios, ya que puede actuar simultáneamente o por separado. Ochoa-Fuentes et al., 2012 evaluaron *in vitro* extractos vegetales contra *F. oxysporum*, en esta investigación se reporta que a concentraciones superiores a las 2500 ppm los extractos de chirimoya (*Annona cherimola* Mill.) y canela (*Cinnamomum zeylanicum* J. Presl) presentaron una actividad

fungistática en este hongo. En otra investigación realizada por Juárez-García, 2023 evaluaron el extracto de la maleza *Argemone ochroleuca* L. contra *F. oxysporum*, donde se reporta una inhibición del 66 % después de una semana de evaluación, lo que coincide con lo aquí observado (Figura 10). Gamboa-Alvarado et al., 2022 emplearon extractos vegetales de plantas silvestres contra *P. infestans* los autores reportan una actividad fungistática con concentraciones de 20000 ppm, lo cual es 570 % superior a la concentración más alta empleado en esta investigación y que además logro una actividad fungicida en este fitopatógeno. Burbano-David et al., 2021 evaluaron extractos vegetales de plantas silvestre contra *P. infestans*, en esta investigación se inhibió el crecimiento por completo después de una semana de evaluación, lo que coincide con lo reportado en esta investigación (Figura 11).

#### 9.4 *P. infestans* severidad y desarrollo del cultivo

Un 90 % de la severidad de la enfermedad en plantas de tomate inoculadas con *Phytophthora infestans* estuvo relacionada con proteínas efectoras que manipulan la fisiología de la planta huésped para facilitar la colonización del patógeno (Whisson et al., 2007; Haas et al., 2009). La respuesta inmune de la planta puede desencadenar la muerte celular programada para limitar la propagación del patógeno (Jones y Dangl, 2006 ). Aun así, en este experimento, la muerte celular programada aumentó la infectividad de *P. infestans* porque *P. infestans* tiene una fase biotrófica y necrotrófica durante su ciclo de vida (Figura 12) (Zuluaga et al., 2016).

La aplicación foliar de extracto de *A. mexicana* en plantas inoculadas redujo la gravedad de la enfermedad en un 48 % (Figura 12A), probablemente debido a compuestos presentes en el extracto, tales como: ácido hexadecanoico, éster metílico; Éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico, (Z,Z,Z); Éster 2-metil-, 1,2-etanodifílico del ácido 2-propenoico, de los cuales se ha informado que tienen actividad antifúngica (Abubacker y Deepalakshmi, 2013; Kocira et al., 2021; Septiyanti et al., 2019). Los constituyentes de origen vegetal pueden exhibir diferentes modos de acción contra fitopatógenos, que incluyen: interferencia con las membranas celulares de fosfolípidos, lo que resulta en un mayor perfil de permeabilidad y pérdida de constituyentes celulares (Omojate Godstime et al., 2014); inhibición de la síntesis de

celulasa, quelación de metales necesarios para la actividad de enzimas microbianas y polimerización en estructuras cristalinas que pueden actuar como barrera física durante el ataque de patógenos (Skadhauge, Thomsen y Von Wettstein, 1997); interrupción de la cadena de transporte de electrones y desaceleración de todas las funciones dependientes de ATP, inhibición de la síntesis de ADN y actividad helicasa, comprometiendo la división celular y terminación de la replicación cromosómica, lo que resulta en la inhibición del crecimiento de fitopatógenos (Fontana et al., 2022).

La presencia de *P. infestans* afecta el desarrollo y el rendimiento de los cultivos, así como la calidad de la fruta, con pérdidas totales de rendimiento en tomates que alcanzan hasta 112 millones de dólares anuales (Nowicki et al., 2012). Se estima que los costos del control del tizón tardío en tomate superan los 5 mil millones de dólares anuales en todo el mundo (Galeano García et al., 2018). La aplicación de extracto de *A. mexicana* incrementó el rendimiento de las plantas de tomate en un 146 % en comparación con el rendimiento de las plantas inoculadas con *P. infestans* (Figura 12A). Turóczi et al. (2020) evaluaron el extracto de *Populus nigra* L. en plantas de papa previamente inoculadas con *P. infestans*. Informaron de una disminución de la gravedad mediante aplicaciones foliares de *P. nigra*. Islam et al., (2013) observaron una reducción del rendimiento del 48.2 % en plantas de tomate con presencia de *P. infestans* y un aumento del rendimiento del 126 % con la aplicación foliar de extractos botánicos en comparación con el tratamiento control, similar a los resultados del presente estudio. El aumento del rendimiento en plantas de tomate podría atribuirse a los compuestos presentes en el extracto de *A. mexicana* que han reportado actividad bioestimulante: ácido hexadecanoico, éster metílico; y éster metílico del ácido 9,12,15-octadecatrienoico Z,Z,Z (Abubacker y Deepalakshmi, 2013 ; Kocira et al., 2021 ). El aumento del rendimiento observado en este estudio también puede deberse a la aplicación foliar de extractos de plantas, que se ha demostrado que ayuda a las plantas a tolerar el estrés causado por patógenos, aumenta la calidad del producto y minimiza la necesidad de fertilizantes y fungicidas (Caruso et al., 2019).

Las variables de peso aéreo (Figura 13E) y raíz seca (Figura 13F) no mostraron diferencias estadísticas entre los tratamientos en este estudio, probablemente porque

ninguna de las plantas en el estudio murió prematuramente, a pesar de que algunas estaban enfermas. Todas las plantas podrían continuar creciendo y produciendo frutos durante todo su ciclo productivo debido a que la variedad Cid F1 es indeterminada, lo que permite que la actividad del meristemo apical continúe durante el estrés biótico, como uno de los mecanismos de respuesta al estrés de la planta. Esta variedad continúa creciendo como parte de su estrategia de supervivencia, intentando producir semillas antes de que la enfermedad cause daños irreversibles (Julio et al., 2016; Krishna et al., 2022).

### 9.5 Contenido de pigmentos fotosintéticos en las hojas

En promedio, el contenido de clorofila a, b y clorofila total se redujo en un 50 % en las plantas inoculadas (Figura 14). *P. infestans* provoca cambios notables a nivel fisiológico, como reducción de la tasa fotosintética, cambios en la transpiración, cambios en la permeabilidad de las membranas, aumento de la frecuencia respiratoria y alteraciones en los perfiles de expresión tisular (Arévalo-Marín et al., 2021). La aplicación de extracto de *A. mexicana* incrementó el contenido de pigmentos fotosintéticos en un promedio de 133 % (Figura 14). Naboulsi et al. (2022) reportaron un aumento del 114 % en clorofila a y 150 % en clorofila b en plantas de tomate sometidas a estrés abiótico y tratadas con aplicaciones foliares del extracto vegetal a base de *Crataegus oxyacantha* L., lo que se alinea con las observaciones de este estudio y puede ser relacionado con que la aplicación de extractos de plantas contribuye a una síntesis más notable de pigmentos fotosintéticos en las hojas (González et al., 2013). Bioestimulantes de origen botánico, como *DtDREB2A*, *DtMYB30*, *DtNAC019*, *DtNAC72*, *DtNAC19*, *DtNAC69*, *DtZIP63*, *DtABF3*, *DtHB12*, *GRMZM2G439784*, *GRMZM2G324221*, *GRMZM2G164129* y *GRMZM2G163866* están involucrados en eventos de señalización y expresión genética y se ha informado que transmiten señales durante desarrollo de la planta, activando defensas contra estímulos provocados por patógenos, regulando la respuesta de la planta ante infecciones (González-Morales et al., 2021).

## 9.6 Biomarcadores de estrés en hojas de tomate

En condiciones óptimas de crecimiento, los niveles de especies reactivas de oxígeno, incluidos los radicales superóxido, el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), los radicales hidroxilo ( $OH^*$ ) y el oxígeno singlete ( $^1O_2$ ), son bajos en los orgánulos de las plantas (Nadarajah, 2020), pero aumentan durante el estrés, dañando proteínas y lípidos y provocando daño y muerte celular (Verma et al., 2021). En las interacciones entre plantas y patógenos, los niveles altos de malondialdehído (MDA) indican un estrés oxidativo severo (Behiry et al., 2022). La sobreproducción de especies reactivas de oxígeno y la peroxidación lipídica están relacionadas con el crecimiento deficiente de las plantas y la calidad de los frutos, y con la producción de metabolitos secundarios en cultivos comerciales (Ren et al., 2022). Los niveles de MDA aumentaron en un 120 % cuando las plantas se rociaron con el fungicida comercial Captán, pero las especies reactivas de oxígeno y el contenido general de malondialdehído se redujeron en un 31 % cuando las plantas se rociaron con extracto de *A. mexicana* (Figura 15B). Naboulsi et al. (2022) reportaron una disminución del 44,78 % en el contenido de MDA de plantas de tomate sometidas a estrés abiótico y aplicaciones de extracto de espino (*Crataegus oxyacantha* L.). Behiry et al. (2022) encontraron que los niveles de MDA y  $H_2O_2$  no diferían estadísticamente con las aplicaciones foliares de extracto de árbol botella (*Chorisia speciosa* St. Hil.) en plantas de tomate sometidas a estrés por *Rhizoctonia solani* en comparación con el control, lo que se alinea con los hallazgos de este estudio. La actividad reducida podría atribuirse al compuesto ácido n-hexadecanoico y succinato de dl- $\alpha$ -tocoferol presente en el extracto de *A. mexicana*, que se ha informado que muestra actividad contra especies reactivas de oxígeno (Saravanakumar et al., 2018) y mejora la actividad fotosintética, tasa de transpiración, conductancia estomática y actividad antioxidante, que se correlacionan fuerte y positivamente con el desarrollo óptimo de la planta (Campobenedetto et al., 2021; Hernández-Herrera et al., 2022). Los fungicidas contribuyen a la peroxidación lipídica de la membrana y a la disfunción mitocondrial en las células vegetales, lo que explica el aumento de MDA observado en plantas que recibieron pulverizaciones foliares de Captán, ya que los fungicidas químicos no discriminan entre células vegetales y fúngicas (Gorshkov et al., 2020).

Con respecto al aumento del anión sueroxido en las hojas de tomate con el tratamiento control, se esperaría que por el hecho de no estar sometidas a estrés biotico, los niveles de superóxido deberían mantenerse bajos. Sin embargo, incluso en condiciones normales, la generación de especies reactivas de oxígeno (ROS), como el anión superóxido, es un subproducto inevitable de los procesos metabólicos, especialmente durante la fotosíntesis y la respiración (Foyer y Noctor, 2016). Aunado a ellos influyen factores como la intensidad de la luz, tasa de fotosíntesis, o la senescencia natural de las hojas (Gill y Tujeta, 2010).

### 9.7 Compuestos antioxidantes no enzimáticos

El contenido de fenol se redujo en promedio un 32 % en las plantas inoculadas y se incrementó un 69 % con la aplicación del extracto de *A. mexicana* ( Figura 16A ) debido a que la presencia de fitopatógenos provoca cambios desfavorables que comprometen la síntesis de compuestos antioxidantes no enzimáticos incluidos compuestos fenólicos (Aina et al., 2022). Estos hallazgos coinciden con los hallazgos de Ertani et al. (2014) , quienes informaron que el contenido de fenol aumentó en hojas de pimiento (*Capsicum chinensis* L.) luego de la aplicación de extractos de alfalfa (*Medicago sativa* L.) y uva (*Vitis vinifera* L.). Según los resultados de este estudio, así como los reportados en la literatura, los extractos de plantas pueden modificar la síntesis de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos como resultado de una mayor expresión del gen *DET2* (Taha et al., 2020), lo que beneficia la defensa de la planta ante la presencia de patógenos (Aitouguinane et al., 2020).

El contenido de flavonoides aumentó en un 113 % en plantas de tomate rociadas con extracto de *A. mexicana* ( Figura 16B ), un resultado similar al de Giordano et al. (2022), quienes informaron un aumento del 141 % en el contenido de flavonoides con la aplicación de extractos de plantas tropicales en el cultivo de lechuga (*Lactuca sativa* L.). La aplicación de extractos de plantas activa el metabolismo secundario al aumentar la expresión de genes que codifican la enzima PAL, que convierte la fenilalanina en ácido cinámico y luego en ácido cumárico. A partir del ácido cumárico se sintetizan flavonoides que inhiben las enzimas patógenas al quelar los metales

necesarios para su actividad y alterar las membranas, lo que afecta su función (Schiavon et al., 2010; Ertani et al., 2011; Mierziak, Kostyn y Kulma, 2014). Esto también ayuda a explicar la disminución en la gravedad de la enfermedad observada en plantas de tomate inoculadas con *P. infestans* y rociadas con extracto de *A. mexicana*.

El contenido de vitamina C en las plantas aumento significativamente durante las etapas de floración y fructificación, especialmente en los días 45, 60 y 75 despues del trasplante (Figura 16C). Este incremento es notable en el dia 75, donde se observo un aumento promedio del 133 % en el contenido de vitamina C en plantas asperjadas cpm extracto de *Argemone mexicana* L. en comparación con el tratamiento control. Aunque la aplicación de este extracto no genero diferencias significativas en otras etapas de crecimiento, su efecto en la fase de fructificación coincide con lo reportado por Abd El-Hamied y El-Amary (2015) donde la aplicación de extracto *Moringa oleifera* Lam en perales aumentó el contenido de vitamina C.

La vitamina C es un antioxidante común en los organismos vivos, especialmente en las plantas. Tiene diversas funciones, como desintoxicar los radicales libres, regular el desarrollo de las plantas, la floración y responder a patógenos, además de actuar como cofactor enzimático (Egea et al., 2022; Mellidou et al., 2021). En este contexto, la mayor concentración de vitamina C observada durante las etapas de floración y fructificación podría estar relacionada con la necesidad de la planta de contrarrestar el estrés oxidativo asociado con el desarrollo de órganos reproductivos y la formación de frutos (Mellidou et al., 2021; Egea et al., 2022). La aplicación de extractos vegetales, como el de *A. mexicana*, puede potenciar estos mecanismos antioxidantes, lo que explicaría el incremento observado en la vitamina C (Figura 16C).

La variación en el contenido de vitamina C observada probablemente se deba a que el contenido de vitamina C está influenciado por la etapa de desarrollo de la planta y por el estrés (Kukavica y Jovanovic, 2004). Además, cuando está presente un hongo fitopatógeno se expresan genes como *MDHAR* y *DHAR* (Paciolla et al., 2019), y específicamente en plantas de tomate se sobreexpresa *HZ24*. *HZ24* es un factor

transcripcional que se une a los promotores *GMP*, *GME2* y *GGP*, que elevan los niveles de vitamina C y reducen el estrés oxidativo en las plantas (Hu et al., 2016).

Los carotenoides son pigmentos naturales presentes en las plantas que desempeñan un papel crucial en la estabilización de las membranas y la protección de la fotosíntesis contra el daño causado por especies reactivas de oxígeno (ROS) (Giuliano, 2017; Simkin Andrew, 2021). En este estudio, el contenido de  $\beta$ -caroteno aumentó en un promedio de 84 % en las plantas de tomate que recibieron la aplicación foliar de extracto de *A. mexicana*, en comparación con el tratamiento con Infes (Figura 16D). Estos resultados coinciden con Giordano et al. (2022) quienes informaron un aumento de  $\beta$ -caroteno en plantas de lechuga (*Lactuca sativa* L.) después de la aplicación foliar de extractos de plantas tropicales. Los extractos de plantas contienen fitohormonas, carbohidratos, aminoácidos y proteínas que retrasan la oxidación del  $\beta$ -caroteno y estimulan la expresión de genes como *GmNAC018*, *GmNAC030*, *GmNAC039* y *GmNAC043*, que retrasan la senescencia de las hojas (Fraga et al., 2021; Yuniati et al., 2022), que es crucial para la biosíntesis de carotenoides y otros pigmentos naturales (Azaizeh et al., 2005). Los extractos de plantas ofrecen un enfoque prometedor y sostenible para los agricultores en sus sistemas agrícolas (Ali, Ramsubhag y Jayaraman, 2021).

Los carotenoides amarillos tienen funciones distintas en los orgánulos subcelulares, funcionan como pigmentos accesorios en la fotosíntesis de los cloroplastos y se depositan de diferentes maneras en los cromoplastos (Khoo et al., 2011; Tanaka, Sasaki y Ohmiya, 2008). Los valores de carotenoides amarillos aumentaron en las plantas que recibieron la aplicación foliar de extracto de *A. mexicana* en comparación con los demás tratamientos evaluados (Figura 16E). Esto coincide con los hallazgos de Khan et al. (2019) que el contenido de carotenoides en plantas de zanahoria (*Daucus carota* L.) aumentó bajo estrés biótico y con la aplicación de *Phyllanthus amarus* Schumacher y Thonn. Los extractos botánicos inducen la síntesis de enzimas críticas en las vías del ácido mevalónico (MVA) y del metileritritol 4-fosfato (MEP), que son responsables de la producción de carotenoides amarillos. Esta biosíntesis está asociada a la generación de precursores de hormonas vegetales, como el ácido

abscísico y las estrigolactonas, junto con moléculas señalizadoras, como el  $\beta$ -ciclocitral, la zaxinona y el ancoreno, que influyen en el desarrollo de las plantas y en su capacidad para resistir el estrés provocado por patógenos (Godlewska et al., 2019; Zheng, Giuliano y Al-Babili, 2020; Godlewska et al., 2020).

Las proteínas son importantes en el metabolismo vegetal y están involucradas en todos los procesos metabólicos de las plantas (Sariñana-Aldaco et al., 2022). El contenido de proteína no difirió significativamente entre tratamientos. Aun así, disminuyó en las plantas de tomate inoculadas con *P. infestans* y aumentó en las plantas que recibieron aspersiones foliares de extracto de *A. mexicana* (Figura 16F). Estos resultados coinciden con los de Ertani et al. (2016), quienes informaron que la aplicación de extractos de plantas de espino, piel de uva roja y arándano aumentaron el contenido de proteínas en plantas de maíz (*Zea mays* L.) en un 115 %, en promedio. Cuando aumenta el estrés del cultivo, aumenta la generación de ROS, provocando un estrés oxidativo más significativo, que puede disminuir la producción de proteínas (González-Moscoso et al., 2019), explicando la disminución del contenido de proteínas observada en este estudio. Por el contrario, el aumento en el contenido de proteínas observado está relacionado con el hecho de que los bioestimulantes contienen hormonas vegetales, como las citoquininas, que reducen los niveles de ARNm y proteínas de las proteasas, evitando un aumento en la actividad proteolítica (Veerasingam, He y Huang, 2007). Promover la síntesis de citoquininas es beneficioso para el cultivo, pero es vital utilizar el tipo correcto de bioestimulante, la dosis correcta y el momento óptimo de aplicación (Del Buono, Regni y Proietti, 2023).

## 10. CONCLUSIONES

Esta investigación demostró que el extracto de *Argemone mexicana* contiene compuestos que tienen actividad antifúngica y bioestimulante. La presencia de *Phytophthora infestans* redujo el rendimiento del cultivo de tomate. Aun así, la aplicación foliar del extracto de *Argemone mexicana* disminuyó la gravedad de la enfermedad en un 48 % y aumentó el rendimiento del cultivo. La aplicación de extracto de *A. mexicana* también generó un aumento de clorofila y compuestos antioxidantes no enzimáticos como fenoles, flavonoides,  $\beta$ -caroteno, carotenoides

amarillos y proteínas, lo que ayudó a las plantas a tolerar el estrés causado por *P. infestans*. Estos hallazgos sugieren que el extracto de *A. mexicana* puede ser una alternativa ecológica a los fungicidas químicos para mitigar los efectos adversos de los fitopatógenos en los cultivos de tomate al inducir el crecimiento y activar el sistema antioxidante.

## 11. REFERENCIAS

- Abbey, J. A., Percival, D., Abbey, L., Asiedu, S. K., Prithiviraj, B., y Schilder, A. (2019). Biofungicides as alternative to synthetic fungicide control of grey mould (*Botrytis cinerea*)—prospects and challenges. *Biocontrol science and technology*, 29(3), 207-228.
- Abd El-Hamied, S. A., y El-Amary, E. I. (2015). Improving growth and productivity of “pear” trees using some natural plants extracts under north sinai conditions. *Journal of Agriculture and veterinary Science*, 8(1), 1-9.
- Abubacker MN, Deepalakshmi T. (2013). *In vitro* antifungal potential of bioactive compound methyl ester of hexadecanoic acid isolated from *Annona muricata* linn (annonaceae) leaves. *Biosciences Biotechnology Research Asia*, 10, 879-884.
- Agrios, G. (2005). Plant Pathology. Quinta edición. Editorial Elsevier Academic Press 1, 1-992.
- Ahmad, P., Jaleel, C. A., Salem, M. A., Nabi, G., y Sharma, S. (2010). Roles of enzymatic and nonenzymatic antioxidants in plants during abiotic stress. *Critical reviews in biotechnology*, 30(3), 161-175.
- Ahn, C.H., Lee, S., Park, J.R., Hwang, T.M., Joo, J.C. (2020). Harvested microalgal biomass from different water treatment facilities—its characteristics and potential use as renewable sources of plant biostimulation. *Agronomy*, 10,1-12.
- Ahuja, I., Kissen, R., y Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. *Trends in plant science*, 17(2), 73-90.

- Aina, O., Bakare, O. O., Daniel, A. I., Gokul, A., Beukes, D. R., Fadaka, A. O., y Klein, A. (2022). Seaweed-derived phenolic compounds in growth promotion and stress alleviation in plants. *Life*, 12(10), 1-22.
- Aitouguinane, M., Bouissil, S., Mouhoub, A., Rchid, H., Fendri, I., Abdelkafi, S., y Delattre, C. (2020). Induction of natural defenses in tomato seedlings by using alginate and oligoalginates derivatives extracted from Moroccan brown algae. *Marine drugs*, 18(10), 521.
- Akyüz, A., y Ersus, S. (2021). Optimization of enzyme assisted extraction of protein from the sugar beet (*Beta vulgaris* L.) leaves for alternative plant protein concentrate production. *Food Chemistry*, 335, 1-27.
- Al-Askar, A. A., Bashir, S., Mohamed, A. E., Sharaf, O. A., Nabil, R., Su, Y., y Behiry, S. I. (2023). Antimicrobial Efficacy and HPLC Analysis of Polyphenolic Compounds in a Whole-Plant Extract of *Eryngium campestre*. *Separations*, 10(6), 1-16.
- Ali, J., Mazumder, J. A., Perwez, M., y Sardar, M. (2020). Antimicrobial effect of ZnO nanoparticles synthesized by different methods against food borne pathogens and phytopathogens. *Materials Today: Proceedings*, 36, 609-615.
- Ali, O., Ramsuhag, A., y Jayaraman, J. (2021). Biostimulant properties of seaweed extracts in plants: Implications towards sustainable crop production. *Plants*, 10(3), 1-27.
- Almeida, N. A., Freire, L., Carnielli-Queiroz, L., Bragotto, A. P., Silva, N. C., y Rocha, L. O. (2024). Essential oils: An eco-friendly alternative for controlling toxigenic fungi in cereal grains. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*, 23(1), 1-13.
- Anthony, K. K., George, D. S., Baldev Singh, H. K., Fung, S. M., Santhirasegaram, V., Razali, Z., y Somasundram, C. (2017). Reactive oxygen species activity and antioxidant properties of *Fusarium* infected bananas. *Journal of Phytopathology*, 165(4), 213-222.
- Apel, K., y Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373-399.

- Arafa, R. A., Kamel, S. M., Taher, D. I., Solberg, S. Ø., y Rakha, M. T. (2022). Leaf Extracts from Resistant Wild Tomato Can Be Used to Control Late Blight (*Phytophthora infestans*) in the Cultivated Tomato. *Plants*, 11(14), 1-18.
- Arvouet-Grand A, Vennat B, Pourrat A, Legret P. (1994). Standardization of propolis extract and identification of principal constituents. *Journal de Pharmacie de Belgique*, 49,462-468.
- Asada, K. (1999). The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons. *Annual review of plant biology*, 50(1), 601-639.
- Asami, D. K., Hong, Y. J., Barrett, D. M., y Mitchell, A. E. (2003). Comparison of the total phenolic and ascorbic acid content of freeze-dried and air-dried marionberry, strawberry, and corn grown using conventional, organic, and sustainable agricultural practices. *Journal of agricultural and food chemistry*, 51(5), 1237-1241.
- Ashraf, M. A., Iqbal, M., Rasheed, R., Hussain, I., Riaz, M., y Arif, M. S. (2018). Environmental stress and secondary metabolites in plants: an overview. *Plant metabolites and regulation under environmental stress*,1, 153-167.
- Avrova, A. O., Boevink, P. C., Young, V., Grenville-Briggs, L. J., Van West, P., Birch, P. R., y Whisson, S. C. (2008). A novel *Phytophthora infestans* haustorium-specific membrane protein is required for infection of potato. *Cellular microbiology*, 10(11), 2271-2284.
- Ayilara, M. S., Akinola, S. A., Adeleke, B. S., Gbadegesin, L. A., Adejumo, G. D., Glick, B. R., y Babalola, O. O. (2024). Biopesticides versus synthetic pesticides usage in Africa. *Microbiome-Based Decontamination of Environmental Pollutants*, 1, 417-450.
- Azaizeh, H., Ljubuncic, P., Portnaya, I., Said, O., Cogan, U., y Bomzon, A. (2005). Fertilization-Induced Changes in Growth Parameters and Antioxidant Activity of Medicinal Plants Used in Traditional Arab Medicine. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, 2(4), 549-556.
- Bahadir, M., Böger, P., Buchenauer, H., Eto, M., Khan, M. A., Pfister, G., y Sandmann, G. (2012). *Controlled release, biochemical effects of pesticides, inhibition of plant pathogenic fungi*. Springer Science y Business Media. 6, 1-293.

- Banani, H., Olivieri, L., Santoro, K., Garibaldi, A., Gullino, M. L., y Spadaro, D. (2018). Thyme and savory essential oil efficacy and induction of resistance against *Botrytis cinerea* through priming of defense responses in apple. *Foods*, 7(2), 11.
- Bhatta, S., Stevanovic Janezic, T., y Ratti, C. (2020). Freeze-drying of plant-based foods. *Foods*, 9(1), 87.
- Behiry, S. I., Soliman, S. A., Al-Mansori, A. N. A., Al-Askar, A. A., Arishi, A. A., Elsharkawy, M. M., y Heflish, A. A. (2022). *Chorisia speciosa* extract induces systemic resistance against tomato root rot disease caused by *Rhizoctonia solani*. *Agronomy*, 12(10), 1-19.
- Bihon, W., Ognakossan, K. E., Tignegre, J. B., Hanson, P., Ndiaye, K., y Srinivasan, R. (2022). Evaluation of Different Tomato (*Solanum lycopersicum* L.) Entries and Varieties for Performance and Adaptation in Mali, West Africa. *Horticulturae*, 8(7), 1-13.
- Bitwell, C., Indra, S. S., Luke, C., y Kakoma, M. K. (2023). A review of modern and conventional extraction techniques and their applications for extracting phytochemicals from plants. *Scientific African*, 19, 1-19.
- Blanco, J. M., Romero, M. C., y Díaz, R. M. J. (2008). Estimación de la diversidad genética en hongos fitopatógenos mediante herramientas moleculares. *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*, 1, 167-188.
- Borges, D. F., Lopes, E. A., Moraes, A. R. F., Soares, M. S., Visôto, L. E., Oliveira, C. R., y Valente, V. M. M. (2018). Formulation of botanicals for the control of plant-pathogens: A review. *Crop Protection*, 110, 135-140.
- Bouket, A. C., Narmani, A., Tavasolee, A., Elyasi, G., Abdi, A., Naeimi, S., y Belbahri, L. (2022). *In vitro* evaluation of wood vinegar (*Pyroligneous acid*) VOCs inhibitory effect against a fungus-like microorganism *Ovatisporangium (Phytophthium)* isolate recovered from tomato fields in Iran. *Agronomy*, 12(7), 1-13.
- Bowler, C., Montagu, M. V., y Inze, D. (1992). Superoxide dismutase and stress tolerance. *Annual review of plant biology*, 43(1), 83-116.
- Brahmachari G, Gorai D, Roy R. (2013). *Argemone mexicana*: chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23, 559-567.

- Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., y Berset, C. L. W. T. (1995). Use of a free radical method to evaluate antioxidant activity. *LWT-Food science and Technology*, 28(1), 25-30.
- Campobenedetto, C., Agliassa, C., Mannino, G., Vigliante, I., Contartese, V., Secchi, F., y Berteà, C. M. (2021). A biostimulant based on seaweed (*Ascophyllum nodosum* and *Laminaria digitata*) and yeast extracts mitigates water stress effects on tomato (*Solanum lycopersicum* L.). *Agriculture*, 11(6), 1-16.
- Caruso, G., De Pascale, S., Cozzolino, E., Cuciniello, A., Cenvinzo, V., Bonini, P., y Roupheal, Y. (2019). Yield and nutritional quality of Vesuvian Piennolo tomato PDO as affected by farming system and biostimulant application. *Agronomy*, 9(9), 1-14.
- Castagna, A., Dall'Asta, C., Chiavaro, E., Galaverna, G., y Ranieri, A. (2014). Effect of post-harvest UV-B irradiation on polyphenol profile and antioxidant activity in flesh and peel of tomato fruits. *Food and bioprocess technology*, 7(8), 2241-2250.
- Chandra, S., Chakraborty, N., Dasgupta, A., Sarkar, J., Panda, K., y Acharya, K. (2015). Chitosan nanoparticles: a positive modulator of innate immune responses in plants. *Scientific reports*, 5(1), 1-14.
- Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad Papaveraceae *Argemone mexicana* L. Chicalote. Available online: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/papaveraceae/argemone-mexicana/fichas/ficha.htm>. (Acceso 24 de abril del 2024).
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
- Cruz, A., Sánchez-Hernández, E., Teixeira, A., Martín-Ramos, P., Cunha, A., y Oliveira, R. (2024). Antifungal and Antioomycete Activities of a *Curcuma longa* L. Hydroethanolic Extract Rich in Bisabolene Sesquiterpenoids. *Horticulturae*, 10(2), 1-16.
- Cruz, A., Sánchez-Hernández, E., Teixeira, A., Oliveira, R., Cunha, A., y Martín-Ramos, P. (2024). Phytoconstituents and Ergosterol Biosynthesis-Targeting Antimicrobial

- Activity of Nutmeg (*Myristica fragans* Houtt.) against Phytopathogens. *Molecules*, 29(2), 1-16.
- De Rodríguez, D. J., García, R. R., Castillo, F. H., González, C. A., Galindo, A. S., Quintanilla, J. V., y Zuccolotto, L. M. (2011). *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*, 34(1), 960-966.
- Dehgahi, R., Subramaniam, S., Zakaria, L., Joniyas, A., Firouzbahi, F. B., Haghnama, K., y Razinataj, M. (2015). Review of research on fungal pathogen attack and plant defense mechanism against pathogen. *International Journal of Research in Agricultural Sciences*, 2(2), 197-208.
- Del Buono, D., Regni, L., y Proietti, P. (2023). Abiotic stresses, biostimulants and plant activity. *Agriculture*, 13(1), 1-5.
- Dhawan, D., y Gupta, J. (2017). Research article comparison of different solvents for phytochemical extraction potential from datura metel plant leaves. *International Journal of Biological and Chemical Sciences*, 11(1), 17-22.
- Dixon, R. A., y Paiva, N. L. (1995). Stress-induced phenylpropanoid metabolism. *The plant cell*, 7(7), 1085.
- Diwathe, M. C., Mazumdar, B., y Jayapal, A. (2024). Valorization of Vegetable Waste to Valuable Bioactive Compounds by Using Various Extraction Methods. In *From Waste to Wealth*. Singapore: Springer Nature Singapore. 1, 1139-1177.
- Dos Santos Gomes, A. C., da Silva, R. R., Moreira, S. I., Vicentini, S. N., y Ceresini, P. C. (2021). Biofungicides: An eco-friendly approach for plant disease management. *Encyclopedia of Mycology*, 1, 641-649.
- Egea, I., Estrada, Y., Flores, F. B., y Bolarín, M. C. (2022). Improving production and fruit quality of tomato under abiotic stress: Genes for the future of tomato breeding for a sustainable agriculture. *Environmental and Experimental Botany*, 204, 1-23.

- El-Nagar, A., Elzaawely, A. A., Taha, N. A., y Nehela, Y. (2020). The antifungal activity of gallic acid and its derivatives against *Alternaria solani*, the causal agent of tomato early blight. *Agronomy*, 10(9), 1-23.
- Ertani, A., Pizzeghello, D., Francioso, O., Sambo, P., Sanchez-Cortes, S., y Nardi, S. (2014). *Capsicum chinensis* L. growth and nutraceutical properties are enhanced by biostimulants in a long-term period: Chemical and metabolomic approaches. *Frontiers in plant science*, 5, 1-12.
- Espinosa-Antón, A. A., Hernández-Herrera, R. M., y González-González, M. (2020). Extractos bioactivos de algas marinas como bioestimulantes del crecimiento y la protección de las plantas. *Biotecnología Vegetal*, 20(4), 257-282.
- Espinosa-García, F. J., y Díaz-Pérez, R. (1996). El uso campesino de plantas arvenses como forraje en el valle de México. *Etnoecología*, 3, 1-13.
- Fernández, M. D. S., Hernández-Ochoa, F., Carmona-Hernández, O., Luna-Rodríguez, M., Barrientos-Salcedo, C., Asselin, H., y Lozada-García, J. A. (2021). Chitosan-induced production of secondary metabolites in plant extracts of *Piper auritum*, and the *in vitro* fungicidal activity against *Fusarium oxysporum* f. sp. *vanillae*. *Revista mexicana de fitopatología*, 39(1), 198-206.
- Fielding, B. C., Knowles, C. L., Vries, F. A., y Klaasen, J. A. (2015). Testing of eight medicinal plant extracts in combination with Kresoxim-Methyl for integrated control of *Botrytis cinerea* in apples. *Agriculture*, 5(3), 1-12.
- Fierascu, R. C., Fierascu, I., Baroi, A. M., y Ortan, A. (2021). Selected aspects related to medicinal and aromatic plants as alternative sources of bioactive compounds. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(4), 1-20.
- Filha, MX, Rodrigues, FA, Domiciano, GP, Oliveira, HV, Silveira, PR y Moreira, WR (2011). Resistencia del trigo a la ráfaga de la hoja mediada por silicio. *Patología vegetal de Australasia*, 40 (1), 28-38.
- Fiol, C., y Ungerfeld, R. (2012). Biostimulation in cattle: stimulation pathways and mechanisms of response. *Tropical and Subtropical Agroecosystems*, 15(1), 29-45.

- Flores, J. (2007). Requerimientos de riego para tomate de invernadero. *Revista terra latinoamericana*, 25(2), 127-134.
- Fontana, R., Macchi, G., Caproni, A., Sicurella, M., Buratto, M., Salvatori, F., y Marconi, P. (2022). Control of *Erwinia amylovora* growth by *Moringa oleifera* leaf extracts: *In vitro* and in planta effects. *Plants*, 11(7), 95, 1-19.
- Foyer, C. H., y Noctor, G. (2011). Ascorbate and glutathione: the heart of the redox hub. *Plant physiology*, 155(1), 2-18.
- Foyer, C. H., y Noctor, G. (2016). Stress-triggered redox signalling: What's in pROSPect?. *Plant, Cell y Environment*, 39(5), 951-964.
- Fraga, O. T., de Melo, B. P., Quadros, I. P. S., Reis, P. A. B., y Fontes, E. P. B. (2021). Senescence-associated glycine max (Gm) NAC genes: integration of natural and stress-induced leaf senescence. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(15), 8287.
- Fravel, D. R. (2005). Commercialization and implementation of biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol*, 43, 337-359.
- Fravel, D., Olivain, C., y Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New phytologist*, 157(3), 493-502.
- Freitas, T.P., Taver, I.B., Spricigo, P.C., Do Amaral, L.B., Purgatto, E., Jacomino, A.P. (2020). Volatile compounds and physicochemical quality of four jaboticabas (*Plinia* sp.). *Molecules*, 25, 1-17.
- Galeano Garcia, P., Neves dos Santos, F., Zanotta, S., Eberlin, M. N., y Carazzone, C. (2018). Metabolomics of *Solanum lycopersicum* infected with *Phytophthora infestans* leads to early detection of late blight in asymptomatic plants. *Molecules*, 23(12), 1-21.
- García-Ramírez, E., Contreras-Oliva, A., Salinas-Ruiz, J., Hernández-Ramírez, G., Spinoso-Castillo, J. L., y Colmenares Cuevas, S. I. (2023). Plant Extracts Control *In vitro* Growth of Disease-Causing Fungi in Chayote. *Plants*, 12(9), 1-10.
- Giordano, M., El-Nakhel, C., Carillo, P., Colla, G., Graziani, G., Di Mola, I., y Sabatino, L. (2022). Plant-derived biostimulants differentially modulate primary and secondary

- metabolites and improve the yield potential of red and green lettuce cultivars. *Agronomy*, 12(6), 1-17.
- Gill, S. S., y Tuteja, N. (2010). Reactive oxygen species and antioxidant machinery in abiotic stress tolerance in crop plants. *Plant Physiology and Biochemistry*, 48(12), 909-930.
- Giuliano, G. (2017). Provitamin A biofortification of crop plants: a gold rush with many miners. *Current opinion in biotechnology*, 44, 169-180.
- Godlewska, K., Biesiada, A., Michalak, I., y Pacyga, P. (2020). The effect of botanical extracts obtained through ultrasound-assisted extraction on white head cabbage (*Brassica oleracea* L. var. capitata L.) seedlings grown under controlled conditions. *Sustainability*, 12(5), 1-31.
- González, A., Castro, J., Vera, J., y Moenne, A. (2013). Seaweed oligosaccharides stimulate plant growth by enhancing carbon and nitrogen assimilation, basal metabolism, and cell division. *Journal of Plant Growth Regulation*, 32, 443-448.
- González, I., Yailén, A., y Peteira, B. (2012). Aspectos generales de la interacción *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici-tomate. *Revista de Protección Vegetal*, 27(1), 1-7.
- González-Morales S, Solís-Gaona S, Valdés-Caballero MV, Juárez-Maldonado A, Loredó-Treviño A, Benavides-Mendoza A. (2021). Transcriptomics of biostimulation of plants under abiotic stress. *Frontiers in Genetics*, 12,1-24.
- González-Moscoso, M., Martínez-Villegas, N. V., Cadenas-Pliego, G., Benavides-Mendoza, A., Rivera-Cruz, M. D. C., González-Morales, S., y Juárez-Maldonado, A. (2019). Impact of silicon nanoparticles on the antioxidant compounds of tomato fruits stressed by arsenic. *Foods*, 8(12), 1-18.
- Gopalsatheeskumar, K. (2018). Significant role of soxhlet extraction process in phytochemical research. *Mintage Journal of Pharmaceutical y Medical Sciences*, 7(1), 43-47.

- Gordo, D. A. M. (2018). Los compuestos fenólicos, un acercamiento a su biosíntesis, síntesis y actividad biológica. *Revista de investigación agraria y ambiental*, 9(1), 81-104.
- Gullino, M. L., Minuto, A., Gilardi, G., y Garibaldi, A. (2002). Efficacy of azoxystrobin and other strobilurins against *Fusarium* wilts of carnation, cyclamen and Paris daisy. *Crop Protection*, 21(1), 57-61.
- Guo, Z. J., Miyoshi, H., Komyoji, T., Haga, T., y Fujita, T. (1991). Uncoupling activity of a newly developed fungicide, fluazinam [3-chloro-N-(3-chloro-2, 6-dinitro-4-trifluoromethylphenyl)-5-trifluoromethyl-2-pyridinamine]. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics*, 1056(1), 89-92.
- Gupta, K., Bishop, J., Peck, A., Brown, J., Wilson, L., y Panda, D. (2004). Antimitotic antifungal compound benomyl inhibits brain microtubule polymerization and dynamics and cancer cell proliferation at mitosis, by binding to a novel site in tubulin. *Biochemistry*, 43(21), 6645-6655.
- Gwiazdowski, R., Kubiak, K., Juś, K., Marchwińska, K., y Gwiazdowska, D. (2023). The Biocontrol of Plant Pathogenic Fungi by Selected Lactic Acid Bacteria: From Laboratory to Field Study. *Agriculture*, 14(1), 1-19.
- Haas, B. J., Kamoun, S., Zody, M. C., Jiang, R. H., Handsaker, R. E., Cano, L. M., y Nusbaum, C. (2009). Genome sequence and analysis of the Irish potato famine pathogen *Phytophthora infestans*. *Nature*, 461(7262), 393-398.
- Hanaa, R. F., Abdou, Z. A., Salama, D. A., Ibrahim, M. A., y Srour, H. A. M. (2011). Effect of neem and willow aqueous extracts on *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. *Annals of Agricultural Sciences*, 56(1), 1-7.
- Hao, D., Yang, J., Long, W., Yi, J., VanderZaag, P., y Li, C. (2018). Multiple R genes and phenolic compounds synthesis involved in the durable resistance to *Phytophthora infestans* in potato cv. Cooperation 88. *Agri Gene*, 8, 28-36.
- Hardham, A. R. (2007). Cell biology of plant–oomycete interactions. *Cellular microbiology*, 9(1), 31-39.

- Heath, R.L., Packer L. 1968. Photoperoxidation in isolated chloroplasts: I. Kinetics and stoichiometry of fatty acid peroxidation. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 125, 189-198.
- Hernández- Soto I.; Prieto-Méndez J.; Aquino Torres E.; Madariaga Navarrete A.; Reyes Santamaría M. I.; Pacheco Trejo J. (2018). Evaluation of the effect of the methanolic extract of *Argemone ochroleuca* for environmentally friendly control of *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* and *Rhizoctonia solani*. *Cienc. e Tec. Vitiviníc*, 33, 1-8.
- Hernández-Ceja, A., Loeza-Lara, P. D., Espinosa-García, F. J., García-Rodríguez, Y. M., Medina-Medrano, J. R., Gutiérrez-Hernández, G. F., y Ceja-Torres, L. F. (2021). *In vitro* antifungal activity of plant extracts on pathogenic fungi of blueberry (*Vaccinium* sp.). *Plants*, 10(5), 1-12.
- Hernández-Fuentes, A. D., Montaña-Herrera, A., Pinedo-Espinoza, J. M., Pinedo-Guerrero, Z. H., y López-Palestina, C. U. (2023). Changes of the antioxidant system in pear (*Pyrus communis* L.) fruits by foliar application of copper, selenium, iron, and zinc nanoparticles. *Journal of Agriculture and Food Research*, 14, 1-6.
- Hernández-Hernández H, González-Morales S, Benavides-Mendoza A, Ortega-Ortiz H, Cadenas-Pliego G, Juárez-Maldonado A. (2018). Effects of chitosan–PVA and Cu nanoparticles on the growth and antioxidant capacity of tomato under saline stress. *Molecules*, 23,1-15.
- Hernández-Moreno, D., De La Casa-Resino, I., Lopez-Beceiro, A., Fidalgo, L. E., Soler, F., y Perez-Lopez, M. (2013). Secondary poisoning of non-target animals in an Ornithological Zoo in Galicia (NW Spain) with anticoagulant rodenticides: a case report. *Vet Med*, 58(10), 553-559.
- Hernandez-Tenorio, F., Miranda, A. M., Rodríguez, C. A., Giraldo-Estrada, C., y Sáez, A. A. (2022). Potential strategies in the biopesticide formulations: a bibliometric analysis. *Agronomy*, 12(11), 1-28.

- Hohl, H. R., y Suter, E. (1976). Host–parasite interfaces in a resistant and a susceptible cultivar of *Solanum tuberosum* inoculated with *Phytophthora infestans*: leaf tissue. *Canadian Journal of Botany*, 54(16), 1956-1970.
- Hornero-Méndez D, Mínguez-Mosquera MI. (2001). Rapid spectrophotometric determination of red and yellow isochromic carotenoid fractions in paprika and red pepper oleoresins. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 49,3584-3588.
- Hu, T., Ye, J., Tao, P., Li, H., Zhang, J., Zhang, Y., y Ye, Z. (2016). The tomato HD-Zip I transcription factor Sl HZ 24 modulates ascorbate accumulation through positive regulation of the d-mannose/l-galactose pathway. *The Plant Journal*, 85(1), 16-29.
- Islam, M. R., Mondal, C., Hossain, I., y Meah, M. B. (2013). Organic management: an alternative to control late blight of potato and tomato caused by *Phytophthora infestans*. *International Journal of Theoretical y Applied Sciences*, 5(2), 32-42.
- Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19, 603-608.
- Ivanov, A. A., Ukladov, E. O., y Golubeva, T. S. (2021). *Phytophthora infestans*: An overview of methods and attempts to combat late blight. *Journal of Fungi*, 7(12), 1071.
- Jasso de Rodríguez, D., García, R.R., Castillo, F.H., González, C.A., Galindo, A.S., Quintanilla, J.V., Zuccolotto, L.M. (2011). *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products*, 34, 960-966.
- Jones, J.D., Dangl, J.L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444,323-329.
- Juárez-García, R. A. (2023). Revisión: el género *Argemone* (papaveraceae) y los usos para el control de plagas en el sector agrícola. *Ciencia E Innovación Agroalimentaria De La Universidad De Guanajuato*, 1, 71-83.
- Julio, G., Ada, A., José, V., y Ruth, G. (2016). Adaptación de híbridos de tomate indeterminado [*Solanum lycopersicum* L.(Mill.)] bajo condiciones de invernadero Adaptation of indeterminate tomato hybrids [*Solanum lycopersicum* L.(Mill.)] under greenhouse conditions. *Journal of the Selva Andina Research Society*, 7(2), 47-65.

- Kawai, M., y Yamagishi, J. I. (2009). Mechanisms of action of acriflavine: electron microscopic study of cell wall changes induced in *Staphylococcus aureus* by acriflavine. *Microbiology and immunology*, 53(9), 481-486.
- Khan, F., Asif, M., Khan, A., Tariq, M., Ansari, T., Shariq, M., y Siddiqui, M. A. (2019). Evaluation of the nematicidal potential of some botanicals against root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* infected carrot: *In vitro* and greenhouse study. *Current Plant Biology*, 20, 100-115.
- Khoo, H. E., Prasad, K. N., Kong, K. W., Jiang, Y., y Ismail, A. (2011). Carotenoids and their isomers: color pigments in fruits and vegetables. *Molecules*, 16(2), 1710-1738.
- Klein, B.P., Perry, A.K. (1982). Ascorbic acid and vitamin A activity in selected vegetables from different geographical areas of the United States. *Journal of Food Science*, 47,941-945.
- Kocira, S., Szparaga, A., Krawczuk, A., Bartoš, P., Zaguła, G., Plawgo, M., Černý, P. (2021). Plant material as a novel tool in designing and formulating modern biostimulants—Analysis of botanical extract from *Linum usitatissimum* L. *Materials*, 14,1-17.
- Krishna, R., Ansari, W. A., Soumia, P. S., Yadav, A., Jaiswal, D. K., Kumar, S., y Verma, J. P. (2022). Biotechnological interventions in tomato (*Solanum lycopersicum*) for drought stress tolerance: achievements and future prospects. *BioTech*, 11(4), 1-22.
- Kukavica, B., y Jovanovic, S. V. (2004). Senescence-related changes in the antioxidant status of ginkgo and birch leaves during autumn yellowing. *Physiologia Plantarum*, 122(3), 321-327.
- Kumar, R., Kumar, S., Bulone, V., y Srivastava, V. (2022). Biochemical characterization and molecular insights into substrate recognition of pectin methylesterase from *Phytophthora infestans*. *Computational and Structural Biotechnology Journal*, 20, 6023-6032.

- Lefebvre, T., Destandau, E., y Lesellier, E. (2021). Selective extraction of bioactive compounds from plants using recent extraction techniques: A review. *Journal of Chromatography A*, 1635, 1-19.
- Li, Y., Henke, M., Zhang, D., Wang, C., y Wei, M. (2024). Optimized tomato production in Chinese solar greenhouses: The impact of an east–west orientation and wide row spacing. *Agronomy*, 14(2), 1-19.
- Lima, A. L. S., DaMatta, F. M., Pinheiro, H. A., Totola, M. R., y Loureiro, M. E. (2002). Photochemical responses and oxidative stress in two clones of *Coffea canephora* under water deficit conditions. *Environmental and experimental botany*, 47(3), 239-247.
- Lin, C. H., Yang, S. L., y Chung, K. R. (2009). The YAP1 homolog–mediated oxidative stress tolerance is crucial for pathogenicity of the necrotrophic fungus *Alternaria alternata* in citrus. *Molecular plant-microbe interactions*, 22(8), 942-952.
- López-Moya, F., Suarez-Fernández, M. y López-Llorca, L.V. (2019). Molecular mechanisms of chitosan interactions with fungi and plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 20,1-15.
- Magbanua, Z. V., De Moraes, C. M., Brooks, T. D., Williams, W. P., y Luthe, D. S. (2007). Is catalase activity one of the factors associated with maize resistance to *Aspergillus flavus*?. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 20(6), 697-706.
- Martínez-Las Heras, R., Heredia, A., Castelló, M. L., y Andres, A. (2014). Influence of drying method and extraction variables on the antioxidant properties of persimmon leaves. *Food Bioscience*, 6, 1-8.
- Marutescu, L., Popa, M., Saviuc, C., Lazar, V., y Chifiriuc, M. C. (2017). Botanical pesticides with virucidal, bactericidal, and fungicidal activity. *In New pesticides and soil sensor*, 1,311-335.
- Mathesius, U. (2018). Flavonoid functions in plants and their interactions with other organisms. *Plants*, 7,1-3.

- Mehdy, M. C., Sharma, Y. K., Sathasivan, K., y Bays, N. W. (1996). The role of activated oxygen species in plant disease resistance. *Physiologia Plantarum*, 98(2), 365-374.
- Mellidou, I., Koukounaras, A., Kostas, S., Patelou, E., y Kanellis, A. K. (2021). Regulation of vitamin C accumulation for improved tomato fruit quality and alleviation of abiotic stress. *Genes*, 12(5), 1-24.
- Michielse, C. B., y Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 10(3), 311-324.
- Mierziak, J., Kostyn, K., y Kulma, A. (2014). Flavonoids as important molecules of plant interactions with the environment. *Molecules*, 19(10), 16240-16265.
- Misra, H. P. (2014). Role of botanicals, bio pesticides and bio agents in integrated pest management. *Agriculture & Food: E-Newsletter*, 2, 51-54.
- Miyaji, T., Kuromori, T., Takeuchi, Y., Yamaji, N., Yokosho, K., Shimazawa, A., y Moriyama, Y. (2015). AtPHT4; 4 is a chloroplast-localized ascorbate transporter in *Arabidopsis*. *Nature communications*, 6(1), 1-11.
- Montaño-Herrera, A., Santiago-Saenz, Y. O., López-Palestina, C. U., Cadenas-Pliego, G., Pinedo-Guerrero, Z. H., Hernández-Fuentes, A. D., y Pinedo-Espinoza, J. M. (2022). Effects of Edaphic Fertilization and Foliar Application of Se and Zn Nanoparticles on Yield and Bioactive Compounds in *Malus domestica* L. *Horticulturae*, 8(6), 1-11.
- Munné-Bosch S. (2005). The role of  $\alpha$ -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 162, 743-748.
- Naboulsi, I., Ben Mrid, R., Ennoury, A., Zouaoui, Z., Nhiri, M., Ben Bakrim, W., y Aboulmouhajir, A. (2022). *Crataegus oxyacantha* extract as a biostimulant to enhance tolerance to salinity in tomato plants. *Plants*, 11(10), 1-13.
- Nadarajah, K. K. (2020). ROS homeostasis in abiotic stress tolerance in plants. *International Journal Of Molecular Sciences*, 21(15), 1-29.

- Nagata M, Yamashita I. (1992). Simple method for simultaneous determination of chlorophyll and carotenoids in tomato fruit. *Nippon Shokuhin Kogyo Gakkaishi*, 39,925-928.
- Noctor, G., Mhamdi, A., Chaouch, S., Han, Y. I., Neukermans, J., Marquez-Garcia, B., y Foyer, C. H. (2012). Glutathione in plants: an integrated overview. *Plant, cell y environment*, 35(2), 454-484.
- Nowicki, M., Foolad, M. R., Nowakowska, M., y Kozik, E. U. (2012). Potato and tomato late blight caused by *Phytophthora infestans*: an overview of pathology and resistance breeding. *Plant disease*, 96(1), 4-17.
- Nurzyńska-Wierdak, R. (2023). Phenolic Compounds from New Natural Sources—Plant Genotype and Ontogenetic Variation. *Molecules*, 28(4),1-22.
- Ochoa Fuentes, Y. M., Cerna Chávez, E., Landeros Flores, J., Hernández Camacho, S., y Delgado Ortiz, J. (2012). Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. *Phyton (Buenos Aires)*, 81(1), 69-73.
- Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.
- Omojate Godstime, C., Enwa Felix, O., Jewo Augustina, O., y Eze Christopher, O. (2014). Mechanisms of antimicrobial actions of phytochemicals against enteric pathogens—a review. *International Journal of Pharmaceutical and Chemical Sciences*, 2(2), 77-85.
- Opende Koul, O. K. (2011). Microbial biopesticides: opportunities and challenges. *Cabi Reviews*, 1, 1-26.
- Ordóñez, Y. F., Ruano, J., Avila, P., Berutti, L., Guerrero, P. C., y Ordóñez, P. E. (2023). *In vitro* Antimicrobial Activity of Plant Species against the Phytopathogens *Ralstonia solanacearum*, *Phytophthora infestans*, and *Neopestalotiopsis javaensis*. *Agriculture*, 13(10), 1-11.

- Ortiz, F., Rodríguez, D., Sanabria, M. E., y Pineda, J. (2016). Management of the late blight of celery (*Apium graveolens* L. var. Dulce) using plant extracts under controlled conditions. *Bioagro*, 28(2), 87-94.
- Osman, Y. M. M., Mohamed, M. H., y Farag, H. R. (2021). Influence of Garlic Foliar Treatment with some Plant Extracts on Purple Blotch Disease in Relation to Plant Growth, Yield and some Biochemical Responses. *Journal of Plant Production*, 12(6), 665-675.
- Paciolla, C., Fortunato, S., Dipierro, N., Paradiso, A., De Leonardis, S., Mastropasqua, L., y De Pinto, M. C. (2019). Vitamin C in plants: from functions to biofortification. *Antioxidants*, 8(11),1-26.
- Palmieri, D., Ianiri, G., Del Grosso, C., Barone, G., De Curtis, F., Castoria, R., y Lima, G. (2022). Advances and perspectives in the use of biocontrol agents against fungal plant diseases. *Horticulturae*, 8(7), 1-34.
- Pane, C., Manganiello, G., Vitti, A., Celano, R., Piccinelli, A. L., y De Falco, E. (2023). Phytochemical Extracts of *Dittrichia viscosa* (L.) Greuter from Agroecological Systems: Seed Antigerminative Properties and Effectiveness in Counteracting *Alternaria* Leaf Spot Disease on Baby-Leaf Spinach. *Biology*, 12(6), 1-17.
- Parađiković, N., Teklić, T., Zeljković, S., Lisjak, M., y Špoljarević, M. (2019). Biostimulants research in some horticultural plant species—A review. *Food and Energy Security*, 8(2), 1-17.
- Przybylska-Balcerek, A., Szablewski, T., Cegielska-Radziejewska, R., Góral, T., Kurasiak-Popowska, D., y Stuper-Szablewska, K. (2022). Assessment of Antimicrobial Properties of Phenolic Acid Extracts from Grain Infected with Fungi from the Genus *Fusarium*. *Molecules*, 27(5), 1-22.
- Quiterio-Gutiérrez, T., Ortega-Ortiz, H., Cadenas-Pliego, G., Hernández-Fuentes, A. D., Sandoval-Rangel, A., Benavides-Mendoza, A., y Juárez-Maldonado, A. (2019). The application of selenium and copper nanoparticles modifies the biochemical responses

- of tomato plants under stress by *Alternaria solani*. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8), 1-29.
- Radzuhn, B., y Lyr, H. (1984). On the mode of action of the fungicide etridiazole. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 22(1), 14-23.
- Rajeswari, N. R., RamaLakshmi, S., y Muthuchelian, K. (2011). GC-MS analysis of bioactive components from the ethanolic leaf extract of *Canthium dicoccum* (Gaertn.) Teijsm y Binn. *Journal of Chemical and Pharmaceutical Research*, 3, 792-798.
- Rathinasamy, K., y Panda, D. (2006). Suppression of microtubule dynamics by benomyl decreases tension across kinetochore pairs and induces apoptosis in cancer cells. *The FEBS journal*, 273(17), 4114-4128.
- Raupach, G. S., Liu, L., Murphy, J. F., Tuzun, S., y Kloepper, J. W. (2012). Induced systemic resistance in cucumber and tomato against cucumber mosaic cucumovirus using plant growth-promoting rhizobacteria (PGPR). *Annals of Agricultural Science*, 57, 91-97.
- Re, R., Pellegrini, N., Proteggente, A., Pannala, A., Yang, M., y Rice-Evans, C. (1999). Antioxidant activity applying an improved ABTS radical cation decolorization assay. *Free radical biology and medicine*, 26, 1231-1237.
- Ren, J., Tong, J., Li, P., Huang, X., Dong, P., y Ren, M. (2021). Chitosan is an effective inhibitor against potato dry rot caused by *Fusarium oxysporum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 113, 1-9.
- Rodríguez, D. J. D., Alonso-Cuevas, C. F., Rodríguez-García, R., Ramírez, H., Díaz-Jiménez, L., Villarreal-Quintanilla, J. A., y Juárez-Maldonado, A. (2020). Extractos de plantas del semidesierto en la inducción del crecimiento de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill). *Ecosistemas y recursos agropecuarios*, 7(1),1-10.
- Rodriguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R., y Aviles-Marin, M. (2015). Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var.

glabriusculum) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. *Revista Argentina de microbiología*, 47(1), 72-77.

Saffan, M. M., Koriem, M. A., El-Henawy, A., El-Mahdy, S., El-Ramady, H., Elbehiry, F., y Prokisch, J. (2022). Sustainable production of tomato plants (*Solanum lycopersicum* L.) under low-quality irrigation water as affected by bio-nanofertilizers of selenium and copper. *Sustainability*, 14(6), 1-17.

Salas-Gómez, A. L., Espinoza Ahumada, C. A., Castillo Godina, R. G., Ascacio-Valdés, J. A., Rodríguez-Herrera, R., Segura Martínez, M. T. D. J., y Osorio-Hernández, E. (2023). Antifungal *In vitro* Activity of Phoradendron sp. Extracts on Fungal Isolates from Tomato Crop. *Plants*, 12(3), 1-12.

Saravanakumar, K., Chelliah, R., Ramakrishnan, S. R., Kathiresan, K., Oh, D. H., y Wang, M. H. (2018). Antibacterial, and antioxidant potentials of non-cytotoxic extract of *Trichoderma atroviride*. *Microbial pathogenesis*, 115, 338-342.

Sariñana-Aldaco, O., Benavides-Mendoza, A., Robledo-Olivo, A., y González-Morales, S. (2022). The biostimulant effect of hydroalcoholic extracts of *Sargassum* spp. in tomato seedlings under salt stress. *Plants*, 11(22), 1-24.

Schiavon, M., Pizzeghello, D., Muscolo, A., Vaccaro, S., Francioso, O., y Nardi, S. (2010). High molecular size humic substances enhance phenylpropanoid metabolism in maize (*Zea mays* L.). *Journal of chemical ecology*, 36, 662-669.

Selvamuthukumar, M., y Shi, J. (2017). Recent advances in extraction of antioxidants from plant by-products processing industries. *Food Quality and Safety*, 1(1), 61-81.

Septiyanti, M., Mulyana, M.R., Putri, R., Meliana, Y. (2019). Evaluation of nanoemulsion concentrate botanical fungicide from neem, citronella and eugenol oil using palm oil based surfactant. *American Journal of Physics*, 14, 14-20.

Sergiev, I., Alexieva, V., y Karanov, E. (1997). Effect of spermine, atrazine and combination between them on some endogenous protective systems and stress markers in plants. *Compt Rend Acad Bulg Sci*, 51(3), 121-124.

- Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2024). Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Sitio web: <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/> (Acceso 25 de enero del 2024).
- Shah, Z. H., Rehman, H. M., Akhtar, T., Alsamadany, H., Hamooh, B. T., Mujtaba, T., y Chung, G. (2018). Humic substances: Determining potential molecular regulatory processes in plants. *Frontiers in plant science*, 9, 1-12.
- Simkin, A. J. (2021). Carotenoids and apocarotenoids in planta: Their role in plant development, contribution to the flavour and aroma of fruits and flowers, and their nutraceutical benefits. *Plants*, 10(11), 1-38.
- Simonetti, G., Brasili, E., y Pasqua, G. (2020). Antifungal activity of phenolic and polyphenolic compounds from different matrices of *Vitis vinifera* L. against human pathogens. *Molecules*, 25(16), 1-22.
- Singleton, V.L., Rossi, J.A. (1965). Colorimetry of total phenolics with phosphomolybdic-phosphotungstic acid reagents. *American Journal of Enology and Viticulture*, 16, 144-158.
- Şirin, S., y Aslım, B. (2019). Determination of antioxidant capacity, phenolic acid composition and antiproliferative effect associated with phenylalanine ammonia lyase (PAL) activity in some plants naturally growing under salt stress. *Medicinal Chemistry Research*, 28(3), 229-238.
- Skadhauge, B., Thomsen, K. K., y Von Wettstein, D. (1997). The role of the barley testa layer and its flavonoid content in resistance to *Fusarium infections*. *Hereditas*, 126(2), 147-160.
- Smith, J. A., Hammerschmidt, R., y Fulbright, D. W. (1991). Rapid induction of systemic resistance in cucumber by *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 38(3), 223-235.
- Sobhy, S., Al-Askar, A. A., Bakhiet, E. K., Elsharkawy, M. M., Arishi, A. A., Behiry, S. I., y Abdelkhalek, A. (2023). Phytochemical Characterization and Antifungal Efficacy of

- Camphor (*Cinnamomum camphora* L.) Extract against Phytopathogenic Fungi. *Separations*, 10(3), 1-15.
- Steiner, A. A. (1961). A universal method for preparing nutrient solutions of a certain desired composition. *Plant and soil*, 15, 134-154.
- Strange, R.N., Scott, P.R., (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Annual Review of Phytopathology*. 43, 83-116.
- Sulaiman, M., Jannat, K., Nissapatorn, V., Rahmatullah, M., Paul, A. K., de Lourdes Pereira, M., y Wiart, C. (2022). Antibacterial and antifungal alkaloids from Asian angiosperms: Distribution, mechanisms of action, structure-activity, and clinical potentials. *Antibiotics*, 11(9), 1-38.
- Taha, R. S., Alharby, H. F., Bamagoos, A. A., Medani, R. A., y Rady, M. M. (2020). Elevating tolerance of drought stress in *Ocimum basilicum* using pollen grains extract; a natural biostimulant by regulation of plant performance and antioxidant defense system. *South African Journal of Botany*, 128, 42-53.
- Tanaka, Y., Sasaki, N., y Ohmiya, A. (2008). Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids. *The Plant Journal*, 54(4), 733-749.
- Teixeira, A., Sánchez-Hernández, E., Noversa, J., Cunha, A., Cortez, I., Marques, G., y Oliveira, R. (2023). Antifungal activity of plant waste extracts against phytopathogenic fungi: *Allium sativum* peels extract as a promising product targeting the fungal plasma membrane and cell wall. *Horticulturae*, 9(2), 1-16.
- Thanseem, I., Joseph, A., y Thulaseedharan, A. (2005). Induction and differential expression of  $\beta$ -1, 3-glucanase mRNAs in tolerant and susceptible Hevea clones in response to infection by *Phytophthora meadii*. *Tree physiology*, 25(11), 1361-1368.
- Tighe Neira, R., Montalba Navarro, R., Leonelli Cantergiani, G., y Contreras Novoa, A. (2014). Efecto de dos extractos botánicos en el desarrollo y contenido de polifenoles de ají (*Capsicum annuum* L.). *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas*, 5(1), 115-127.

- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., y Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418, 671-677.
- Toffolatti, S. L., Davillerd, Y., D'Isita, I., Facchinelli, C., Germinara, G. S., Ippolito, A., y Romanazzi, G. (2023). Are Basic Substances a Key to Sustainable Pest and Disease Management in Agriculture? An Open Field Perspective. *Plants*, 12(17), 1-23.
- Tripathi, Y. N., Divyanshu, K., Kumar, S., Jaiswal, L. K., Khan, A., Birla, H., y Upadhyay, R. S. (2020). Biopesticides: Current Status and Future Prospects in India. *In Bioeconomy for Sustainable Development*, Springer, Singapore, 1, 79-109.
- Tucuch-Pérez, M. A., Bojórquez-Vega, J. J., Arredondo-Valdes, R., Hernández-Castillo, F. D., y Anguiano-Cabello, J. C. (2021). Actividad biológica de extractos vegetales del semidesierto mexicano para manejo de *Fusarium oxysporum* de tomate. *Ecosistemas y Recursos Agropecuarios*, 8(2), 1-8.
- Turóczi, B., Bakonyi, J., Szabó, K. A., Bálint, J., Máthé, I., Lányi, S., y Balog, A. (2020). *In vitro* and *in vivo* effect of poplar bud extracts on *Phytophthora infestans*: A new effective biological method in potato late blight control. *Plants*, 9(2), 1-11.
- Twajj, B. M., y Hasan, M. N. (2022). Bioactive secondary metabolites from plant sources: types, synthesis, and their therapeutic uses. *International Journal of Plant Biology*, 13(1), 1-11.
- Ullah, R., Bakht, J., Shafi, M., y Shah, M. R. (2018). GC-MS profile of bioactive compounds from medicinally important *Periploca hydaspidis*. *Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, 31(5), 1967-1973.
- Vargas-Hernandez, M., Macias-Bobadilla, I., Guevara-Gonzalez, R. G., Romero-Gomez, S. D. J., Rico-Garcia, E., Ocampo-Velazquez, R. V., y Torres-Pacheco, I. (2017). Plant hormones management with biostimulants of biotic origin in agriculture. *Frontiers in plant science*, 8, 1-11.
- Vásquez Covarrubias, D. A., Belmont, R. M., Pérez, A. J., y Flores Moctezuma, H. E. (2013). Essential Oils and Aqueous Extracts for the *in vitro* Management of *Fusarium*

*oxysporum* f. sp. *lycopersici* and *F. solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31(2),1-10.

Veerasamy, M., He, Y., y Huang, B. (2007). Leaf senescence and protein metabolism in creeping bentgrass exposed to heat stress and treated with cytokinins. *Journal of the American Society for Horticultural Science*, 132(4), 467-472.

Verma, H., Kumar, D., Kumar, V., Kumari, M., Singh, S. K., Sharma, V. K., y Kumar, A. (2021). The potential application of endophytes in management of stress from drought and salinity in crop plants. *Microorganisms*, 9(8), 1-19.

Vierling, E., y Kimpel, J. A. (1992). Plant responses to environmental stress. *Current Opinion in Biotechnology*, 3(2), 164-170.

Wang, A.G., Luo, G.H. (1990). The quantitative relationship between superoxide radical reaction and hydroxylamine in plants. *Plant Physiology Communications*. 26,55-57.

Whisson, S. C., Boevink, P. C., Moleleki, L., Avrova, A. O., Morales, J. G., Gilroy, E. M., y Birch, P. R. (2007). A translocation signal for delivery of oomycete effector proteins into host plant cells. *Nature*, 450, 115-118

Xoca-Orozco, L. A., Zamora-Gasga, V., Espinosa-Alonso, G., Velázquez-Estrada, R. M., López-García, U., Sáyago-Ayerdi, S., y Chacón-López, A. (2018). Actividad antioxidante y antifúngica *in vitro* de extractos de carambola (*Averrhoa carambola* L.). *Biotecnia*, 20(2), 104-109.

Youssef, K. M., y Mokhtar, S. M. (2014). Effect of drying methods on the antioxidant capacity, color and phytochemicals of *Portulaca oleracea* L. leaves. *Journal of Nutrition y Food Sciences*, 4(6),1-6.

Youssef, S. A., Tartoura, K. A., y Greash, A. G. (2018). *Serratia proteamaculans* mediated alteration of tomato defense system and growth parameters in response to early blight pathogen *Alternaria solani* infection. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 103, 16-22.

- Zaker, M. (2016). Natural plant products as eco-friendly fungicides for plant diseases control-A review. *The Agriculturists*, 14(1), 134-14.
- Zandonadi, D. B., Santos, M. P., Caixeta, L. S., Marinho, E. B., Peres, L. E. P., y Façanha, A. R. (2016). Plant proton pumps as markers of biostimulant action. *Scientia Agricola*, 73, 24-28.
- Zárate-Martínez, W., González-Morales, S., Ramírez-Godina, F., Robledo-Olivo, A., y Juárez-Maldonado, A. (2018). Efecto de los ácidos fenólicos en plantas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) inoculadas con *Clavibacter michiganensis*. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 9, 4367-4379.
- Zhang, H. F., Islam, T., y Liu, W. D. (2022). Integrated pest management programme for cereal blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Journal of Integrative Agriculture*, 21(12), 3420-3433.
- Zheng, X., Giuliano, G., y Al-Babili, S. (2020). Carotenoid biofortification in crop plants: citius, altius, fortius. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 11, 1-17.
- Zhu, J. K. (2002). Salt and drought stress signal transduction in plants. *Annual review of plant biology*, 53(1), 247-273.
- Zscheile, F.P., Comar, C.L., Mackinney, G. (1942). Interlaboratory comparison of absorption spectra by the photoelectric spectrophotometric method—determinations on chlorophyll and weigert's solutions. *Plant Physiology*, 17, 666-670.
- Zuluaga, A.P., Vega-Arreguín, J.C., Fei, Z., Ponnala, L., Lee, S.J., Matas, A.J., Rose, J.K. (2016). Transcriptional dynamics of *Phytophthora infestans* during sequential stages of hemibiotrophic infection of tomato. *Molecular Plant Pathology*, 17, 29-41.

## 12. ANEXOS

### 12.1 Artículos publicados



# Impact of *Argemone mexicana* L. on tomato plants infected with *Phytophthora infestans*

Iridiam Hernández-Soto<sup>1</sup>, Yolanda González-García<sup>2</sup>, Antonio Juárez-Maldonado<sup>3</sup> and Alma Delia Hernández-Fuentes<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Instituto de Ciencias Agropecuarias, Tulancingo de Bravo, Hidalgo, Mexico

<sup>2</sup> Centro de Investigación Regional Noreste, Campo Experimental Todos Santos, Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias, Emiliano Zapata, La Paz, B.C.S, Mexico

<sup>3</sup> Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Departamento de Botánica, Saltillo, Coahuila, Mexico

## ABSTRACT

**Background.** Fungal diseases can cause significant losses in the tomato crop. *Phytophthora infestans* causes the late blight disease, which considerably affects tomato production worldwide. Weed-based plant extracts are a promising ecological alternative for disease control.

**Methods.** In this study, we analyzed the plant extract of *Argemone mexicana* L. using chromatography-mass spectrometry analysis (GC-MS). We evaluated its impact on the severity of *P. infestans*, as well as its effect on the components of the antioxidant defense system in tomato plants.

**Results.** The extract from *A. mexicana* contains twelve compounds most have antifungal and biostimulant properties. The findings of the study indicate that applying the *A. mexicana* extract can reduce the severity of *P. infestans*, increase tomato fruit yield, enhance the levels of photosynthetic pigments, ascorbic acid, phenols, and flavonoids, as well as decrease the biosynthesis of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, malondialdehyde (MDA), and superoxide anion in the leaves of plants infected with this pathogen. These results suggest that using the extract from *A. mexicana* could be a viable solution to control the disease caused by *P. infestans* in tomato crop.

Submitted 29 June 2023  
Accepted 21 November 2023  
Published 3 January 2024

Corresponding author  
Alma Delia Hernández-Fuentes,  
almah@uaeh.edu.mx

Academic editor  
Tika Adhikari

**Subjects** Agricultural Science, Mycology, Plant Science

**Keywords** Antioxidants, Biofungicide, Biostimulant, Defense compounds, Biotic stress

## INTRODUCTION



Review

# Biofungicides Based on Plant Extracts: On the Road to Organic Farming

Antonio de Jesús Cenobio-Galindo<sup>1</sup>, Alma Delia Hernández-Fuentes<sup>1</sup>, Uriel González-Lemus<sup>1</sup>, Ana Karen Zaldívar-Ortega<sup>1</sup>, Lucio González-Montiel<sup>2</sup> , Alfredo Madariaga-Navarrete<sup>1</sup> and Iridiam Hernández-Soto<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad Km 1 Rancho Universitario, Tulancingo 43600, Hidalgo, Mexico; antonio\_cenobio@uaeh.edu.mx (A.d.J.C.-G.); almah@uaeh.edu.mx (A.D.H.-F.); uriel\_gonzalez@uaeh.edu.mx (U.G.-L.); ana\_saldivar@uaeh.edu.mx (A.K.Z.-O.); alfredo\_madariaga@uaeh.edu.mx (A.M.-N.)

<sup>2</sup> Instituto de Tecnología de los Alimentos, Universidad de la Cañada, Teotitlán de Flores Magón 68540, Oaxaca, Mexico; luciogonzalez@unca.edu.mx

\* Correspondence: iridiam\_hernandez@uaeh.edu.mx

**Abstract:** Phytopathogenic fungi are responsible for diseases in commercially important crops and cause major supply problems in the global food chain. Plants were able to protect themselves from disease before humans played an active role in protecting plants. They are known to synthesize a variety of secondary metabolites (SMs), such as terpenes, alkaloids, and phenolic compounds, which can be extracted using conventional and unconventional techniques to formulate biofungicides; plant extracts have antifungal activity and various mechanisms of action against these organisms. In addition, they are considered non-phytotoxic and potentially effective in disease control. They are a sustainable and economically viable alternative for use in agriculture, which is why biofungicides are increasingly recognized as an attractive option to solve the problems caused by synthetic fungicides. Currently, organic farming continues to grow, highlighting the importance of developing environmentally friendly alternatives for crop production. This review provides a compilation of the literature on biosynthesis, mechanisms of action of secondary metabolites against phytopathogens, extraction techniques and formulation of biofungicides, biological activity of plant extracts on phytopathogenic fungi, regulation, advantages, disadvantages and an overview of the current use of biofungicides in agriculture.

**Keywords:** phytopathogenic fungi; secondary metabolites; agricultural sustainability; agroecology; phytosanitary products



Citation: Cenobio-Galindo, A.d.J.; Hernández-Fuentes, A.D.; González-Lemus, U.; Zaldívar-Ortega, A.K.; González-Montiel, L.; Madariaga-Navarrete, A.; Hernández-Soto, I. Biofungicides Based on Plant Extracts: On the Road to Organic Farming. *Int. J. Mol. Sci.* **2024**, *25*, 6879. <https://doi.org/10.3390/ijms25136879>



## El chicalote: una ayuda amigable para el tomate enfermo

Iridiam Hernández-Soto<sup>1</sup>  
Juan Ocampo-López<sup>2</sup>  
Celeste Ricardo-Bravo<sup>2</sup>  
José Manuel Pinedo-Espinoza<sup>3</sup>  
Alma Delia Hernández-Fuentes<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup> Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, Av. Universidad Km. 1, Rancho Universitario, Tulancingo 43600, Hidalgo, México.

<sup>2</sup> Laboratorio de Histología e Histopatología, Área Académica de Medicina Veterinaria y Zootecnia. Instituto de Ciencias Agropecuarias, Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

<sup>3</sup> Universidad Autónoma de Zacatecas, Unidad Académica de Agronomía. Zacatecas, Zacatecas, México.

\*Autor para correspondencia: [almah@uaeh.edu.mx](mailto:almah@uaeh.edu.mx)



El tomate enfrenta la amenaza del tizón tardío causado por el hongo *Phytophthora infestans*. Actualmente, se busca una alternativa amigable al uso intensivo de fungicidas químicos, y se ha investigado el uso de la planta maleza *Argemone mexicana*, con el nombre común de chicalote. El extracto de chicalote aplicado directamente a las hojas (foliarmente) en plantas de tomate tiene efectos positivos, promoviendo un mayor crecimiento y reduciendo el daño causado por el tizón tardío.

### Introducción

## 12.2 Congresos



XI Congreso  
Internacional  
XXV Congreso  
Nacional

  
**Ciencias  
Agronómicas**  
del 03 al 06 de octubre de 2023

LA  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA  
**CHAPINGO**



Otorga la presente

# CONSTANCIA

a: **IRIDIAM HERNÁNDEZ SOTO**

Por su participación como

**PONENTE**

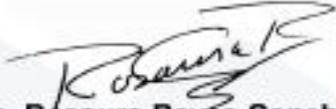
en la modalidad **Oral** del trabajo titulado

Extracto de Argemone mexicana L.: Control del tizón tardío y estímulo al crecimiento en tomate

cuyos autores son:

Iridiam Hernández-Soto; Matilde Reyes-Fuentes; Rafael G. Campos-Montiel; Alma Delia Hernández-Fuentes

Chapingo, Estado de México, del 03 al 06 de octubre de 2023.

  
**Dra. Rosaura Reyes Canchola**  
Presidenta

## 12.3 Estancia



### Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro Departamento de Botánica

Calzada Antonio Narro No. 1923, Colonia Buenavista  
Saltillo, Coahuila, México. C.P. 25315  
Tel. (844) 4-11-02-52 y 4-11-02-53 Ext. 2252 y 2253  
e-mail: botanica@uaaan.edu.mx Página Web: www.uaaan.edu.mx



Saltillo, Coahuila a 6 de marzo de 2023

**DRA. ALMA DELIA HERNÁNDEZ FUENTES**  
**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO (UAEH)**

Estimada Dra. Hernández, a través del presente notifico a usted que la estancia de investigación de la MC. Iridiam Hernández Soto realizada en nuestra institución ha sido concluida satisfactoriamente. La estancia de investigación fue realizada en el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Departamento de Botánica durante el periodo comprendido del 6 de diciembre de 2022 al 6 de marzo de 2023 bajo la asesoría de su servidor. El trabajo realizado dentro del laboratorio consistió en la evaluación de compuestos antioxidantes enzimáticos y no enzimáticos, y el procesamiento de datos y escritura de informe. Los resultados obtenidos forman parte de su proyecto de tesis doctoral titulado “Actividad antifúngica *in vitro* e *in situ* del extracto de *Argemone mexicana* L. contra fitopatógenos en el cultivo de tomate”, que actualmente desarrolla en el Doctorado en Ciencias Agropecuarias de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo.

Sin otro particular le envío un cordial saludo.

ATENTAMENTE

ALMA TERRA MATER

**Dr. Antonio Juárez Maldonado**

**Profesor Investigador del Departamento de Botánica**

CCP. MC. Iridiam Hernández Soto.-Estudiante de estancia  
Archivo

---

*“Por una Universidad de 100..... Rumbo al Centenario”*