



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto De Ciencias Agropecuarias

Maestría en Ciencia de los Alimentos

“Evaluación de la actividad antifúngica
de los extractos de *Argemone mexicana* L.”

TESIS

Que para obtener el grado de
Maestra en Ciencia de los Alimentos

Presenta:

Iridiam Hernández Soto

Director: Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Co-directora: Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

Asesores: Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dr. Alfredo Madariaga Navarrete



Tulancingo, Hidalgo, agosto del 2020



COORDINACION DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAP

Actas de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: **“Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de Argemone mexicana L.”**, que desarrolla la estudiante Iridiam Hernández Soto

Asistentes:

- Dr. Rubén Jiménez Alvarado**
- Dra. Alma Delia Hernández Fuentes**
- Dr. Rafael Germán Campos Montiel**
- Dr. Alfredo Madariaga Navarrete**

A. Revisión de Trabajo de Tesis

Observaciones:

El comité revisó con antelación el trabajo de tesis en extenso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, Iridiam Hernández Soto, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. La estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

B. Acuerdos

En esta fecha, se comunica atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que la estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

“AMOR, ORDEN Y PROGRESO”

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 10 de julio de 2020

Dr. Rubén Jiménez Alvarado

Dra. Alma Delia Hernández Fuentes

Dr. Rafael Germán Campos Montiel

Dr. Alfredo Madariaga Navarrete





Agradecimientos

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología:

Por la beca otorgada para el desarrollo del proyecto "**Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de *Argemone mexicana* L.**" Número de beca: 929027, **Destinatario: Iridiam Hernández Soto.**

A mis formadores:

Personas de gran sabiduría quienes se han esforzado por ayudarme a llegar al punto en el que me encuentro. Sencillo no ha sido el proceso, pero gracias a las ganas de transmitirme sus conocimientos y dedicación que los ha regido, he logrado importantes objetivos como culminar el desarrollo de mi tesis con éxito.

A mis padres:

Quienes me han heredado el tesoro más valioso que puede dársele a un hijo sin escatimar esfuerzo alguno han sacrificado por mi gran parte de su vida, me han formado y educado para convertido en una mujer de provecho. Nunca podré pagarles todos sus sacrificios ni con las riquezas más grandes del mundo.

A mi compañero de vida:

Tu ayuda y tu cariño ha sido fundamental, has estado conmigo incluso en los momentos mas difíciles. Este posgrado no fue nada sencillo, pero estuviste motivándome y ayudándome hasta donde tus alcances lo permitían.

Que dios te bendiga y guarde siempre.

A dios:

Por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi posgrado, por ser mi fortaleza en los momentos de debilidad y por brindarme salud hasta este momento.

Dedicatoria:

Esta tesis esta dedicada con mucho amor a mis padres, hermano y esposo que son el motor de mi vida.

A mi abuelo Mauro quien no está conmigo físicamente pero siempre esta en mi mente y mi corazón.

ÍNDICE GENERAL

Resumen.....	1
Abstract.....	2
1. Introducción	3
2. Antecedentes	4
3. Marco teórico	7
3.1 Enfermedades en plantas.....	7
3.2 Hongos fitopatógenos	8
3.2.1 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	8
3.2.2 <i>Monilinia fructicola</i>	10
3.2.3 <i>Fusarium oxysporum</i>	11
3.2.4 <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	13
3.3 Extractos vegetales en el control de enfermedades en plantas	15
3.4 Metabolitos secundarios	17
3.5 <i>Argemone mexicana</i> L.....	20
3.5.1 Usos etnobotánicos	20
3.6 Obtención de extractos de plantas	21
3.7 Análisis de efectividad biológica: Uso de Probit	23
3.8 Identificación de compuestos mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas	24
4. Justificación	25
5. Hipótesis	26
6. Objetivos	26
6.1 Objetivo general.....	26
6.2 Objetivos específicos.....	26
7. Material y Métodos	27
7.1 Material vegetal.....	27
7.2 Extracción de compuestos fitoquímicos.	27
7.3 Aislamiento de hongos	28
7.4 Evaluación <i>in vitro</i> de extractos contra hongos fitopatógenos	28
7.5 Análisis de la composición química de los extractos de <i>A. mexicana</i> por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS)	29
7.6 Análisis estadístico	30
8. Resultados y discusiones	31
8.1 Evaluación <i>in vitro</i> de extractos contra hongos fitopatógenos	31
8.1.2 Efecto de <i>A. mexicana</i> sobre <i>M. fructicola</i>	31

8.1.3 Efecto de <i>A. mexicana</i> sobre <i>C. gloeosporioides</i>	35
8.1.4 Efecto de <i>A. mexicana</i> sobre <i>F. oxysporum</i>	38
8.1.5 Efecto de <i>A. mexicana</i> sobre <i>S. sclerotiorum</i>	42
8.2 Composición química de los extractos	47
8.2.1 Extracto hexánico de <i>A. mexicana</i> L.	47
8.2.2 Extracto de acetato de etilo de <i>A. mexicana</i> L.	49
8.2.3 Extracto metanolico de <i>A. mexicana</i> L.	51
9. Conclusiones	57
10. Referencias.....	58

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Extractos vegetales para el control de hongos fitopatógenos	5
Tabla 2. Antecedentes de <i>Argemone mexicana</i> L.....	6
Tabla 3. Números aproximados de metabolitos secundarios conocidos de plantas superiores....	19
Tabla 4. Compuestos bioactivos extraídos por diferentes solventes	22
Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas (MR)	31
Tabla 6. Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>M. fructicola</i> con diferentes extractos de <i>A. mexicana</i> L. a varias concentraciones	33
Tabla 7. CL ₅₀ de extractos de <i>A. mexicana</i> L. para inhibir el crecimiento micelial de <i>M. fructicola</i> durante 168 h de incubación.	34
Tabla 8. Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>C. gloeosporioides</i> con diferentes extractos de <i>A. mexicana</i> L. a varias concentraciones	36
Tabla 9. CL ₅₀ de extractos de <i>A. mexicana</i> L. para inhibir el crecimiento micelial de <i>M. fructicola</i> durante 168 h de incubación.	37
Tabla 10. Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>F. oxysporum</i> con diferentes extractos de <i>A. mexicana</i> L. a varias concentraciones	40
Tabla 11. CL ₅₀ de extractos de <i>A. mexicana</i> L. para inhibir el crecimiento micelial de <i>F. oxysporum</i> durante 168 h de incubación.	41
Tabla 12. Porcentajes de inhibición del crecimiento de <i>S. sclerotiorum</i> con diferentes extractos de <i>A. mexicana</i> L. a varias concentraciones	44
Tabla 13. CL ₅₀ de extractos de <i>A. mexicana</i> L. para inhibir el crecimiento micelial de <i>S. sclerotiorum</i> durante 168 h de incubación.	45
Tabla 14. Compuestos químicos identificados en los extractos de hexano de <i>A. mexicana</i> L.....	48
Tabla 15. Compuestos químicos identificados en los extractos de acetato de etilo de <i>A. mexicana</i> L.	50
Tabla 16. Compuestos químicos identificados en los extractos de metanol de <i>A. mexicana</i> L.....	52
Tabla 17. Compuestos químicos identificados en los extractos acuosos de <i>A. mexicana</i> L.	54

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Funciones básicas de una planta y la interferencia sobre ellas que ocasionan algunos tipos de enfermedades.....	7
Figura 2. Síntomas de antracnosis causados por <i>Colletotrichum</i> spp.....	9
Figura 3. Síntomas de <i>Monilinia Fructicola</i>	11
Figura 4. Síntomas de <i>Fusarium</i> en orquídeas.....	13
Figura 5. Estructuras típicas y síntomas causados por <i>Sclerotinia Sclerotiorum</i>	15
Figura 6. Biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas	18
Figura 7. <i>Argemone mexicana</i> L.	21
Figura 8. Actividad antifúngica de <i>A. mexicana</i> L. sobre <i>M. fructicola</i>	34
Figura 9. Actividad antifúngica de <i>A. mexicana</i> L. sobre <i>C. gloeosporioides</i>	37
Figura 10. Actividad antifúngica de <i>A. mexicana</i> L. sobre <i>F. oxysporum</i>	41
Figura 11. Actividad antifúngica de <i>A. mexicana</i> L. sobre <i>S. sclerotiorum</i>	45
Figura 12. Crecimiento de los hongos fitopatógenos con el tratamiento de acetato de etilo a 8000 ppm a lo largo de 168 horas.....	46
Figura 13. Nivel de porcentaje de área de compuestos de <i>A. Mexicana</i> identificados a partir de espectros GC-MS de cuatro solventes diferentes	56

Resumen

Las enfermedades en plantas ocasionadas por hongos, limitan la producción de cultivos a nivel mundial, hasta ahora el principal método para controlar los fitopatógenos han sido los fungicidas sintéticos. Sin embargo, el uso descontrolado de estos, ha ocasionado daños crónicos para la salud y el medio ambiente, es por eso que surge la necesidad de buscar alternativas ecológicas. El uso de plantas consideradas malezas como *Argemone mexicana* L. que además presenta compuestos bioactivos con potencial para mantener la inocuidad agrícola representa una alternativa ecológica viable. En el presente estudio se obtuvieron diferentes extractos provenientes de las hojas de la planta (hexano, acetato de etilo, metanol y agua), se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos en diferentes concentraciones (500, 1000, 2000, 4000 y 8000 ppm) contra *Monilinia fructicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*, se hizo un análisis Probit para determinar la concentración letal media (CL₅₀) de los extractos y se realizó un perfil químico usando cromatografía de gases acoplado a masas. Los extractos de acetato de etilo y metanol mostraron el mayor porcentaje de inhibición contra *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* (100% de inhibición contra ambos), *M. fructicola* (97.44% y 95.11%) y *S. sclerotiorum* (98.01% y 98.64%) respectivamente. En el análisis Probit la CL₅₀ más baja se presentó para el extracto de acetato de etilo con un intervalo entre 350.46 y 576.57 ppm y para el extracto metanolico entre 100.28 y 287.48 ppm. En el perfil químico se identificaron 14 compuestos en el extracto hexánico, 15 en el extracto de acetato de etilo, 21 en el extracto metanolico y 15 en el acuoso, entre ellos compuestos con actividad antifúngica como: Fitol; 2- ácido propenoico, 2-metil-, 1,2-etanodiil éster; 1,1,3,3-tetrametil-1,3-disilafenalano; Ciclohexasiloxano, dodecametil-. Estos resultados sugieren el posible uso antifúngico de *A. mexicana* L. como una alternativa ecológica para el control de fitopatógenos.

Abstract

Plant diseases caused by fungi limit crop production worldwide, until now the main method to control plant pathogens has been synthetic fungicides. However, the uncontrolled use of these has caused chronic damage to health and the environment, which is why the need to search for ecological alternatives arises. The use of plants considered weeds such as *Argemone mexicana* L. which also has bioactive compounds with the potential to maintain agricultural safety represents a viable ecological alternative. In the present study, different extracts were obtained from the leaves of the plant (hexane, ethyl acetate, methanol and water), the *in vitro* antifungal activity of the extracts was evaluated at different concentrations (500, 1000, 2000, 4000 and 8000 ppm) against *Monilinia fructicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* and *Sclerotinia sclerotiorum*, Probit analysis was performed to determine the mean lethal concentration (LC₅₀) of the extracts and a chemical profile was performed using mass coupled gas chromatography. The ethyl acetate and methanol extracts showed the highest percentage of inhibition against *C. gloeosporioides*, *F. oxysporum* (100% inhibition against both), *M. fructicola* (97.44% and 95.11%) and *S. sclerotiorum* (98.01% and 98.64 %) respectively. In the Probit analysis, the lowest LC₅₀ was presented for the ethyl acetate extract with a range between 350.46 and 576.57 ppm and for the methanol extract between 100.28 and 287.48 ppm. In the chemical profile, 14 compounds were identified in the hexane extract, 15 in the ethyl acetate extract, 21 in the methanol extract and 15 in the aqueous extract, among them compounds with antifungal activity such as: Fitol; 2-Propenoic acid, 2-methyl-, 1,2-ethanediyl ester; 1,1,3,3-Tetramethyl-1,3-disilaphenalane; Cyclohexasiloxane, dodecamethyl-. These results suggest the possible antifungal use of *A. mexicana* L. as an ecological alternative for the control of phytopathogens.

1. Introducción

Las enfermedades de las plantas causadas por hongos fitopatógenos son responsables de las principales pérdidas económicas debido a la reducción en el rendimiento del cultivo, derivado de la disminución en la calidad y seguridad del producto (Pergomet et al.,2018). Entre los principales hongos fitopatógenos se encuentran *Monilinia fructicola*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*; *M. fructicola* es un hongo ascomiceto que causa podredumbre parda en muchas frutas de hueso (Pei et al.,2019); Los principales daños se producen en postcosecha durante el almacenamiento, el envío y la comercialización, lo que induce pérdidas de hasta un 80% (Usall et al.,2015).

C. gloeosporioides (Penz.), es responsable de la enfermedad conocida como antracnosis, la cual es una enfermedad común en cultivos básicos en la etapa pre y postcosecha. La infección por *C. gloeosporioides* causa manchas de tizón, oscuras e irregulares en las hojas y frutos maduros (Mota et al.,2019). *Fusarium oxysporum*, es un patógeno de suelo con un amplio rango de hospederos que causa marchitamiento vascular o pudrición de la raíz a 150 especies de plantas, incluidos muchos cultivos hortícolas (Sun et al.,2019). *Sclerotinia sclerotiorum* es un patógeno necrotrófico homotálico, que causa enfermedades comúnmente conocidas como: podredumbre algodonosa, podredumbre blanda acuosa, pudrición del tallo, gota, pudrición de la corona, tizón en flor y, quizás el más común, moho blanco. El hongo infecta a más de 400 especies de plantas en todo el mundo, incluidos cultivos importantes como lechuga, zanahoria, tomate y afecta principalmente a liliáceas como ajo y cebolla (Bolton et al.,2006).

La protección de los cultivos contra estos fitopatógenos sigue siendo una preocupación en el sector agrícola. Con el tiempo, se han manejado algunas enfermedades devastadoras desde el comienzo de su aparición mediante el uso de fungicidas sintéticos (Hernández et al.,2013), pero el uso inapropiado de pesticidas en la agricultura ha impactado negativamente el medio ambiente, la salud humana y el desarrollo de hongos resistentes (Ascensión et al.,2015). Para

evitar el uso de fungicidas químicos, se han buscado nuevas alternativas que sean amigables con el medio ambiente. El uso de extractos de plantas silvestres representa una gran oportunidad para obtener nuevos fungicidas naturales debido, entre otras razones, a que contienen metabolitos secundarios que poseen propiedades fitoprotectoras (Hernández-Soto et al.,2018). *Argemone mexicana* L. conocida comúnmente como chicalote, es una especie endémica de México, ampliamente distribuida en todos los continentes (Conabio,2019), se le considera como maleza, y estudios han mostrado su contenido de alcaloides, terpenoides, flavonoides, compuestos fenólicos, compuestos alifáticos, de cadena larga y pocos compuestos aromáticos a los cuales se les atribuyen diferentes actividades biológicas incluida la actividad antimicrobiana, antiinflamatoria, antioxidante, larvívica y nematocida, entre otras (Brahmachari et al.,2013).

Por lo anterior, se considera relevante evaluar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de *Argemone mexicana* L., utilizando como solventes de extracción: hexano, acetato de etilo, metanol y agua contra hongos que causan enfermedades y pérdidas económicas significativas en cultivos de suelo y frutos, generando conocimiento de sus compuestos bioactivos que podrían ser la base para la producción de biofungicidas.

2. Antecedentes

Los extractos vegetales son una alternativa ecológica en el área agrícola, para prevenir y controlar enfermedades ocasionadas por hongos fitopatógenos (Tabla 1). Actualmente se buscan compuestos químicos de fuentes naturales, principalmente de plantas malezas, las cuales compiten con los cultivos por el espacio, los nutrientes y la luz solar, resultando una fuente económica interesante para la obtención de extractos vegetales con actividad biológica. Esta alternativa contribuye además a la explotación y disminución de estas especies que, de lo contrario, deben ser eliminadas de los campos sin ningún provecho para la economía (Rodríguez,2000).

Argemone mexicana L. es una maleza que exhibe diversas actividades biológicas con extractos crudos o compuestos aislados, dichas actividades se muestran en la tabla 2. A pesar de que existe una amplia búsqueda de compuestos químicos presentes en extractos vegetales con una actividad biológica en particular, no existen reportes de la utilización de los extractos de *Argemone mexicana* L. con *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Monilinia fructicola* y *Sclerotinia sclerotiorum*, por tanto, representa un primer reporte de esta interacción biológica en estos hongos fitopatógenos, dando una posible nueva alternativa para el control de enfermedades en plantas.

Tabla 1. Extractos vegetales para el control de hongos fitopatógenos

Hongo fitopatógeno	Enfermedad	Extracto vegetal	Efectos obtenidos	Referencia
<i>Botrytis cinérea</i>	Moho gris	Hojas de <i>Pithecellobium dulce</i>	Inhibición del crecimiento micelial (50-78 %)	Bautista et al., 2003
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> <i>Alternaria alternata</i> <i>Penicillium digitatum</i>	Antracnosis Pudrición de ciruelas Putrefacción verde en cítricos	Hojas de <i>Flourensia cernua</i>	Efecto fungistático	Guerrero-Rodríguez et al., 2017
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis	Hojas de ajo (<i>Allium sativum</i>) y canela (<i>Cinnamomum zeylanicum</i>)	100 % de inhibición	Valenzuela et al., 2013
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Antracnosis	Hojas de <i>Phytolacca tetramera</i>	Efecto fungistático	Hernández et al., 2013
<i>Aspergillus niger</i> <i>Mucor pusillus</i> <i>Fusarium oxysporum</i>	Moho negro Moho Marchitez vascular	Aceites esenciales de salvia, romero, anís, quinua	Efecto fungistático	Ferbes et al., 2017
<i>Fusarium oxysporum</i>	Marchitez vascular	<i>Acacia farnesiana</i>	Inhibición del 98 %	Rodríguez Pedroso et al., 2012
<i>Rhizoctonia solani</i>	Pudrición de la raíz	Eucalipto, romero e Higuera	Inhibición del 91%	Carnero et al., 2013
<i>Monilinia fructicola</i>	Pudrición parda postcosecha en frutos de hueso	Canola y mostaza	Efecto fungistático	Pazolini et al., 2016
<i>Alternaria solani</i> <i>Monilinia fructicola</i>	Tizón temprano Pudrición parda	Nogal pecanero	Inhibición del 95 y 85% respectivamente	Moreno Ramírez, 2013
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> <i>Sclerotinia cepivorum</i>	Pudrición algodonosa	Hojas de limón y Clavo	Inhibición del 10%	Martínez Mendoza et al., 2015

Tabla 2. Antecedentes de *Argemone mexicana* L.

Actividad biológica	Parte de la planta	Efecto obtenido	Referencia
Antibacterial: <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> , <i>Listeria monocytogenes</i> , <i>Clostridium botulinum</i> , <i>Clostridium perfringens</i> , <i>Escherichia coli</i> , <i>Pseudomonas aeruginosa</i> y <i>Salmonella typhimurium</i>	Tallo	Zonas de inhibición en el rango de 10.1 a 21.4 mm	Rahman et al.,2009
Antibacterial: <i>Escherichia coli</i> , <i>Klebsiella pneumoniae</i> , <i>Bacillus cereus</i> y <i>Staphylococcus aureus</i>	Hojas, tallos y raíces	Actividad bacteriostática	Alagesaboopathi y Kalaiselvi,2012
Farmacológica: Antiinflamatorio y actividad analgésica	Hojas	Dosis de 200 mg / kg en ratones	Sharma et al.,2010
Farmacología: Antialérgica y antiestrés	Tallos	Antiestrés y antialérgica a una dosis de 50 mg en modelo <i>in vivo</i>	Bhalke y Gosavi,2009
Nematicida: <i>Meloidogyne incognita</i>	Semilla	Actividad nematicida contra las larvas a partir de los 17 minutos	Das y Sukul,1988
Actividad fungicida: <i>Alternaria alternata</i> , <i>Halodes de Dreschlera</i> y <i>Helminthosporium speciferum</i>	Hojas	Actividad fungitóxica	Srivastava y Srivastava,1998
Actividad larvicida: <i>Aedes aegypti</i>	Semillas	Actividad larvicida a concentraciones de 25 a 200 ppm	Sakthivadivel y Thilagavathy,2003
Actividad anticancerígena	Partes aéreas	Actividad inhibitoria contra células cancerosas humanas líneas como HeLa-B75 (48%), HL-60 (20.15%) y PN-15 (58.11%)	Gacche et al.,2011

3. Marco teórico

3.1 Enfermedades en plantas

Las plantas se mantienen sanas cuando llevan a cabo sus funciones fisiológicas, y presentarán enfermedad cuando una o varias de sus funciones sean alteradas por los organismos patógenos o por determinadas condiciones del medio (Figura 1) Todas las plantas son atacadas por algún tipo de hongo, y cada uno de los hongos ataca a uno o más tipos de plantas (Agrios,2005). Las infecciones fúngicas son la principal causa de pérdidas económicas significativas en cultivos de interés comercial (Gatto et al.,2011).

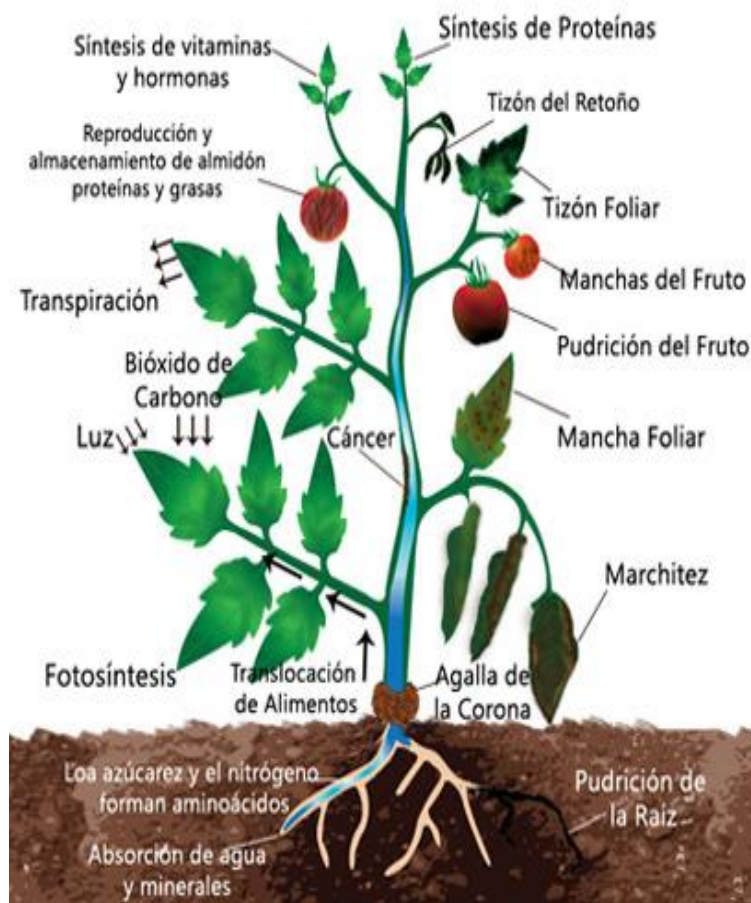


Figura 1. Funciones básicas de una planta y la interferencia sobre ellas que ocasionan algunos tipos de enfermedades (Fuente: Agrios;2005).

3.2 Hongos fitopatógenos

3.2.1 *Colletotrichum gloeosporioides*

- **Hongo superior**
- **Subdivisión 4:** DEUTEROMYCOTINA: Hongos imperfectos (hongos asexuales). Carecen de estructuras o reproducción sexual y hasta el momento no se ha visto que las presenten.
- **CLASE 1:** COELOMYCETES. — Los conidios se forman en picnidios o acérvulos.
- **Orden:** Melanconiales. — Las esporas asexuales se forman en un acérvulo.
- **Género:** *Colletotrichum*

Colletotrichum gloeosporioides es el agente causal de la antracnosis (Figura 2), enfermedad postcosecha de muchas frutas subtropicales como mango, papaya, plátano y aguacate. La pérdida potencial de producto debido a este patógeno es significativa. Por ejemplo, se informó que esta enfermedad puede causar pérdidas postcosecha de fruta de aguacate hasta 80% (Bill et al.,2014; Kuru, Adugna y Berecha,2016). La infección inicial usualmente ocurre en la etapa de precosecha cuando las esporas de hongos o micelios infectan las frutas jóvenes a través de las heridas de pedicelo y cáscara. Normalmente, la infección antes de la cosecha permanece latente u oculta hasta que la fruta experimenta maduración (Dinh et al.,2003).

La penetración y colonización de tejidos del hospedador por *Colletotrichum*, generalmente comienza con la germinación de los conidios y la formación de estructuras especializadas en infecciones, apresorios, que facilitan la entrada a las paredes celulares través de la cutícula huésped y epidérmica con la ayuda de clavijas de penetración estrechas (Wharton y Schilder,2008). Las estrategias posteriores a la infección son hemibiotrofia intracelular o necrotrofia subcuticular intramural. En la hemibiotrofia intracelular, la etapa temprana de la infección, la clavija de penetración invade las células epidérmicas y las hifas primarias lo que produce vesículas de infección agrandadas dentro de las células epidérmicas y mesofílicas. En esta etapa, las células huésped permanecen vivas y las plantas no muestran síntomas (De Silva et al.,2017).

Esto es seguido por la fase necrótica en la que las hifas secundarias delgadas crecen intracelular e intercelularmente mientras secretan enzimas degradantes de la pared celular que matan las células huésped. En la infección necrotrófica subcuticular intramural, el hongo crece debajo de la cutícula dentro de las paredes de las células epidérmicas sin penetrar en los protoplastos (O'Connell et al.,2012). La estructura de la superficie de la planta huésped (cutícula y grosor de la epidermis, pelos foliares, estomas y tricomas) es también es importante en el proceso de infección inicial y puede actuar como una barrera contra la infección por hongos (Calo et al.,2006; Serrano et al.,2014) (Tabla 1).



Figura 2. Síntomas de antracnosis causados por *Colletotrichum* spp (Fuente: De Silva et al.,2017).

3.2.2 *Monilinia fruticola*

- **Hongos superiores**
- **Subdivisión 3:** ASCOMYCOTINA (ascomicetos, hongos de saco). — Producen grupos de ocho esporas
- **CLASE 4:** DISCOMYCETES (hongos de copa). — Las aseas se forman en la superficie de apotecios carnosos en forma de copa o de plato.
- **Orden:** Helotiales. — Los apotecios no se forman en un estroma, sino a veces se forman a partir de un estroma o un esclerocio. Las aseas liberan sus esporas a través de una perforación apical y circular.
- **Género:** *Monilinia*

La podredumbre parda, causada por *Monilinia fruticola*, es una de las enfermedades más importantes de la fruta de hueso en las regiones frutícolas del mundo (Byrde y Willetts, 2013). Las pérdidas en el campo de melocotones, ciruelas, cerezas dulces y agrias, pueden ser extensas si las condiciones son favorables para el desarrollo de la enfermedad durante el período de floración, después de la caída de la cáscara o durante los períodos de precosecha y cosecha (Robson, 1988).

El patógeno infecta partes aéreas de las plantas hospedadoras con una variedad de síntomas, que incluyen tizón de las flores, canchales en tejidos leñosos y podredumbre de las frutas. El tizón de la flor es el primer síntoma en la primavera; aparece en las flores y se desarrolla cuando las esporas o conidios caen y penetran en los tallos florales de las plantas susceptibles (Van Leeuwen y Van Kesteren, 1998). El patógeno pasa el invierno como micelio en la fruta momificada en el árbol y en los canchales de la ramita o como pseudosclerotia en las momias en el suelo. Los nuevos conidios son producidos por el micelio en el fruto momificado en el árbol y en los canchales de la ramita, mientras que los pseudosclerotios en el fruto momificado enterrado en el suelo producen apotecios, que forman ascosporas (Hong y Michailide, 1999).

El tejido infectado se vuelve de color marrón oscuro y el micelio produce numerosos mechones conidiales en lo podrido. Algunas flores infectadas caen al suelo, pero otras pueden permanecer unidas al árbol durante largos períodos y, durante el clima húmedo, el patógeno dentro de las flores marchitas producen

esporas sobre los tejidos infectados (Martini y Mari,2014).Las infecciones de fruta verde no son frecuentes; la podredumbre se desarrolla primero en frutas agrupadas, en puntos de contacto de frutas y frutas dañadas por insectos o vientos, ya que las frutas agrupadas son más favorables para el desarrollo de enfermedades, por ejemplo, las superficies de contacto de fruta a fruta tienen microfisuras, cutículas más delgadas y condiciones microambientales que predisponen a infecciones de la fruta (Barkai-Golan,2001). Las heridas continúan desarrollándose durante varios años y el daño extenso de incluso la muerte del árbol puede ser causada, pero esto es a menudo el resultado de la invasión por organismos secundarios (Emery et al.,2000) (Tabla 1).

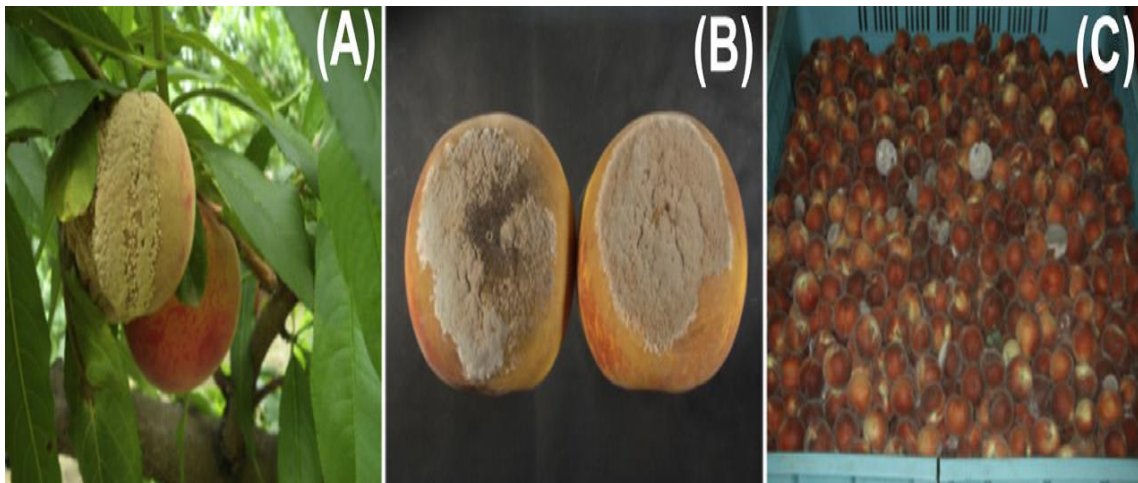


Figura 3. (A) *Monilia* en durazno en el campo, (B) duraznos con podredumbre (C) pudrición en duraznos después de la vida útil (Fuente: Martini y Mari,2014).

3.2.3 *Fusarium oxysporum*

- **Hongos superiores**
- **Subdivisión 4: DEUTEROMYCOTINA**— Hongos imperfectos (hongos asexuales). — Carecen de estructuras o reproducción sexual y hasta el momento no se ha visto que las presenten.
- **CLASE 2: HYPHOMYCETES**
- **Orden:** Hyphales (Moniliales). — Las esporas asexuales se forman sobre las hifas (o en su interior) y se encuentran expuestas libremente a la atmósfera.
- **Género:** *Fusarium*

La especie *Fusarium oxysporum* está bien representada entre las comunidades de hongos transmitidos por el suelo, en todo tipo de suelo en todo el mundo (Fravel et al.,2003), es una especie compleja debido a su capacidad de adaptarse a los cambios ambientales y formar nuevas cepas patógenas en un período corto (Smith-White et al.,2001). *Fusarium oxysporum* infecta a través de las raíces, causando podredumbre de las raíces, marchitamiento y, a veces, progresando hacia la pudrición del tallo (Leong et al.,2009). Una vez que el patógeno penetra en el sistema vascular, la capacidad de la planta para absorber nutrientes se ve gravemente comprometida y la planta finalmente muere (Ichikawa et al.,2004).

Los síntomas iniciales de marchitez vascular incluyen el aclaramiento de las venas y la epinastía de las hojas, seguidos de retraso en el crecimiento, amarillamiento de las hojas inferiores, marchitamiento progresivo, defoliación y, finalmente, muerte de la planta. En la colonización por hongos, el tejido vascular se vuelve marrón, lo que es claramente visible en las secciones transversales del tallo. Algunas formas especiales no son principalmente patógenos vasculares, pero causan podredumbre del pie y la raíz o pudrición del bulbo (Michielse y Rep,2009).

Aunque se ha encontrado que *F. oxysporum* causa enfermedades en una gran cantidad de especies de plantas, el estudio de la base molecular de la patogenicidad de *F. oxysporum* necesariamente ha involucrado principalmente tomate, melón, frijol, plátano, algodón, garbanzos (Blanco et al.,2008), en plantas ornamentales como: aster, begonia, clavel, crisantemo, gladiolo, lirio, narciso y orquídeas (Figura 4.) puede causar daño en cualquier etapa de producción (Gullino et al.,2002). Una vez que el hongo se introduce en un jardín, vivero, invernadero o campo, puede sobrevivir durante varios años en una variedad de tipos de suelo, independientemente de cualquier planta huésped (Srivastava et al.,2018) (Tabla 1).

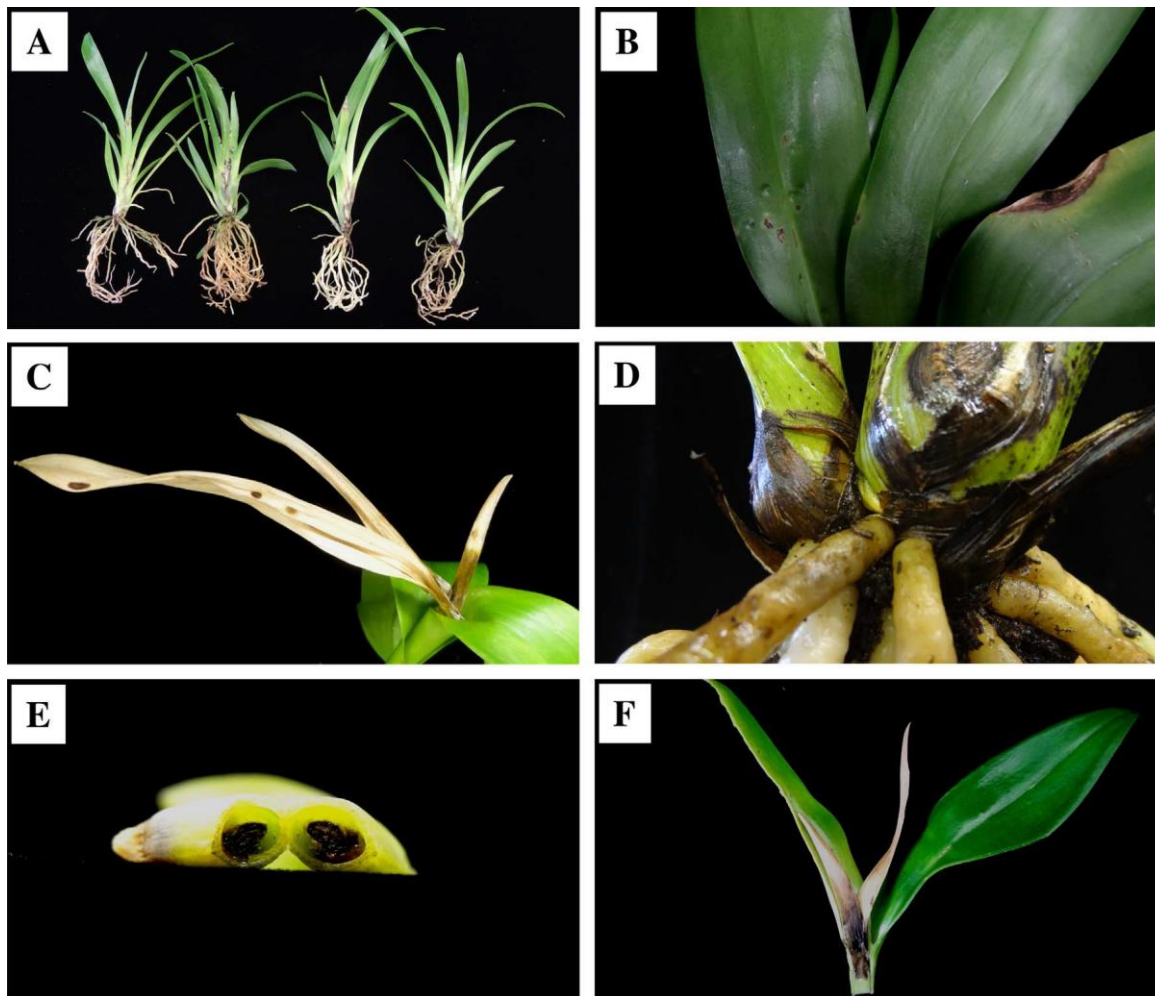


Figura 4. Síntomas de *Fusarium* en orquídeas: A) Plántulas que muestran manchas foliares, tizón foliar, podredumbre y podredumbre de la raíz B) Brote joven que muestra marchitamiento de las hojas más jóvenes. C) Manchas foliares y tizón foliar. D) Manchas en las hojas y podredumbre severa. E) Corte transversal de un tallo de hoja joven que muestra infección. F) Corte longitudinal de hojas jóvenes podridas (Fuente: Srivastava et al.,2018).

3.2.4 *Sclerotinia sclerotiorum*

- **Hongos superiores**
- **Subdivisión 3: ASCOMYCOTINA** (ascomicetos, hongos de saco). — Producen grupos de ocho esporas
- **CLASE 4: DISCOMYCETES** (hongos de copa). — Las asexas se forman en la superficie de apotecios carnosos en forma de copa o de plato.

- **Orden:** Helotiales. — Los apotecios no se forman en un estroma, sino a veces se forman a partir de un estroma o un esclerocio. Las aseas liberan sus esporas a través de una perforación apical y circular.
- **Género:** *Sclerotinia*

Sclerotinia sclerotiorum es uno de los patógenos de plantas más devastadores causa enfermedades comúnmente conocidas como: podredumbre algodonosa, podredumbre blanda acuosa, pudrición del tallo, gota, pudrición de la corona, tizón en flor y, quizás el más común, moho blanco (Boland y Hall,1994). *Sclerotinia* se encuentran ampliamente distribuido por todo el mundo y afecta a las plantas en cualquiera de las etapas de su desarrollo, incluyendo plántulas, plantas maduras y órganos cosechados durante su transporte y almacenamiento (Purdy,1979).

No hay síntomas únicos que pertenezcan a todas las plantas infectadas por este hongo. Las hojas generalmente tienen lesiones empapadas de agua que se expanden rápidamente y bajan del pecíolo hacia el tallo. Los tallos de algunas plantas infectadas desarrollarán primero lesiones oscuras, mientras que la indicación inicial en otros huéspedes es la aparición de lesiones de tallo empapadas de agua. Las lesiones generalmente se convierten en tejidos necróticos que posteriormente desarrollan parches de micelio blanco esponjoso, que son el signo más obvio de plantas infectadas con *S. sclerotiorum*. Al principio del desarrollo de la lesión, las plantas pueden no verse afectadas por la enfermedad. Sin embargo, a medida que el hongo progresa hacia los tallos principales, generalmente se produce marchitez. A medida que las lesiones envejecen, los tejidos infectados aparecen blanqueados y a menudo se trituran, dejando solo tejidos vasculares. Puede no haber evidencia de micelio externo. Los esclerocios generalmente se forman dentro del tejido infectado, a menudo en la médula del tallo, pero pueden formarse en la superficie de los tejidos durante condiciones de alta humedad. Los esclerocios se formarán comúnmente en la floración y en las porciones productoras de semillas de la planta y, por lo tanto, a menudo se encuentran en muestras de cosecha (Bolton et al.,2006) (Tabla 1).



Figura 5. Estructuras típicas y síntomas causados por *Sclerotinia Sclerotiorum* (Fuente: Bolton et al.,2006)

3.3 Extractos vegetales en el control de enfermedades en plantas

Las plantas han sido capaces de protegerse de las plagas y enfermedades por sí mismas antes de que el hombre jugara un rol activo en protegerlas. Se conoce que sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios relacionados con los

mecanismos de defensa (Hernández-Lauzardo et al.,2007). El metabolismo secundario de las plantas es responsable de la síntesis de numerosas sustancias bioactivas, que proporcionan protección contra insectos y patógenos y limitan el crecimiento de otras especies de plantas. Los extractos de plantas contienen una multitud de sustancias bioactivas, que incluyen alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinolatos, lípidos, fenólicos, terpenos, poliacetilenos y polienenos. Los científicos han explorado la diversidad de estas moléculas y su uso en el manejo integrado de plagas y patógenos (Isman,2000).

Sus mecanismos de acción son variables; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles en microorganismos se atribuye a inhibición enzimática por oxidación de compuestos. El modo de acción de los terpenos y aceites esenciales no ha sido dilucidado por completo, pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos. De los alcaloides se ha postulado que se intercalan con el DNA, y de las lectinas y polipéptidos se conoce que pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la inhibición competitiva por adhesión de proteínas microbianas a los polisacáridos receptores del hospedero (Zaker,2016).

Se ha demostrado que los extractos de planta, ejercen actividad biológica contra patógenos fúngicos de plantas *in vitro* y *in vivo* y pueden ser utilizado como productos bio-fungicidas. (Romanazzi et al.,2012). En general, se supone que estos productos son más aceptables y menos peligrosos para los ecosistemas y podrían utilizarse como remedios alternativos para el tratamiento de enfermedades de las plantas (Chuang et al.,2007). Los productos vegetales naturales tienen un modo de acción específico, por lo tanto, son selectivos para un microorganismo en particular, en su mayoría no tóxicos para microorganismos antagónicos. Así mismo, dichos productos, muestran una persistencia limitada en campo y tienen una vida útil más corta y sin amenazas residuales (Zaker,2016). Los productos vegetales más comúnmente utilizados para el manejo de las enfermedades de las plantas son aceites esenciales y extractos. Los extractos de plantas, se obtienen

de productos de plantas secas por filtración y evaporación usando varios solventes (Wang et al.,2004). Los principales compuestos que han sido investigado hasta la fecha incluyen fenoles, flavonoides, quinonas, terpenenos, taninos, alcaloides, lectinas, polipéptidos, saponinas y esteroides (Halama y Van Haluwin,2004). Estos productos pueden tener la actividad fungicida, es decir, que tienen la capacidad de suspender el crecimiento y el desarrollo de los hongos, o la germinación de sus esporas; o fungistática que no matan necesariamente a los hongos, pero sí los paralizan y los detienen (Scheuerell y Mahaffee,2002).

3.4 Metabolitos secundarios

Las plantas vasculares contienen una enorme variedad de compuestos químicos, distintos de los intermedios y productos del metabolismo primario, que varían según la familia, estos se denominan metabolitos secundarios, y contribuyen en gran medida a los olores, sabores y colores específicos de las plantas (Bennett y Wallsgrove,1994). No todos los metabolitos secundarios se encuentran en todos los grupos de plantas. Se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, estando a menudo su producción restringida a un determinado género de plantas, a una familia, o incluso a algunas especies (Jiménez et al.,2003).

Los metabolitos secundarios funcionan prominentemente para proteger las plantas contra depredadores y microbios (Schäfer y Wink,2009). Existen tres tipos principales de metabolitos secundarios de acuerdo a su biosíntesis: Fenólicos, terpenos y compuestos que contienen nitrógeno/azufre (Figura 6). Los terpenos tienen isoterpenoides 5-C como su unidad básica que son toxinas y disuade a los herbívoros. La vía del ácido shikimico proporciona los productos que forman fenólicos que imparten capacidad defensiva a las plantas. Los compuestos que contienen nitrógeno y azufre se sintetizan principalmente a partir de aminoácidos (Städler et al.,1992).

La formación de metabolitos secundarios es el resultado de millones de años de interacción de la planta con los patógenos y se considera que se sabe que más de 100,000 metabolitos están involucrados en el sistema de defensa de la planta (tabla 3), por lo que la situación aún no está clara (Wink,2008).

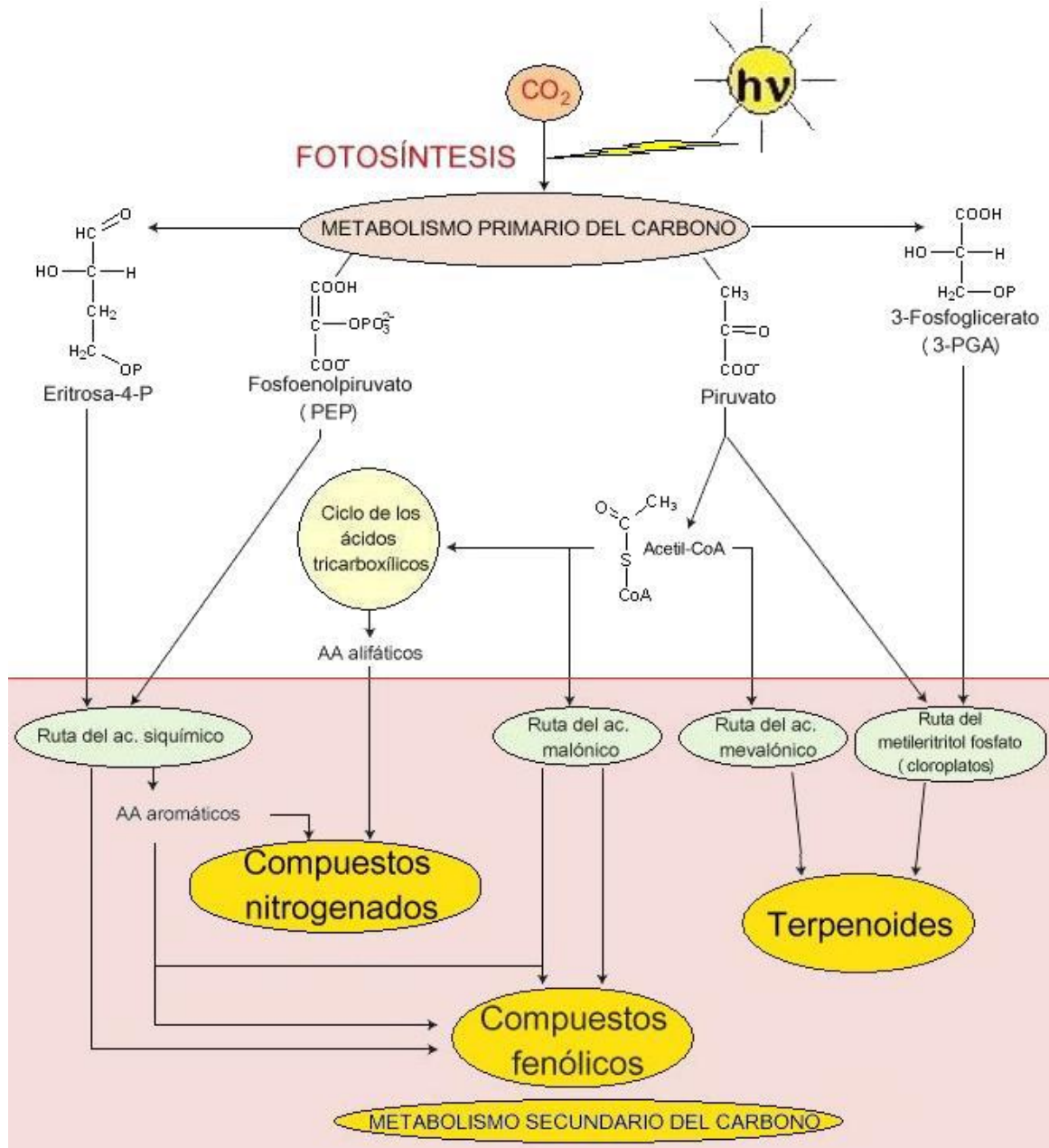


Figura 6. Biosíntesis de metabolitos secundarios en plantas (Fuente: Ávalos García A. y Pérez-Urria Carril,2009).

Tabla 3. Números aproximados de metabolitos secundarios conocidos de plantas superiores

Tipo de metabolito secundario	Números estimados *
Metabolitos secundarios que contienen nitrógeno	
Alcaloides	21,000
Aminoácidos no proteicos	700
Aminas	100
Glucósidos cianogénicos	60
Glucosinolatos	100
Alquilamidas	150
Lectinas, péptidos, polipéptidos	2,000
Metabolitos secundarios sin nitrógeno	
Monoterpenos (C10)**	2,500
Sesquiterpenos (C15) **	5,000
Diterpenos (C20) **	2,500
Triterpenos, esteroides, saponinas (C30, C27) **	5,000
Tetraterpenos (C40) **	500
Flavonoides, taninos	5,000
Fenilpropanoides, lignina, cumarinas, lignanos	2,000
Poliacetilenos, ácidos grasos, ceras	1,500
Policétidos	750
Carbohidratos, ácidos simples	400

* Número aproximado de estructuras conocidas; ** el número total de todos los terpenoides supera los 22,000 en la actualidad. Fuente: (Wink,2008).

3.5 *Argemone mexicana* L.

En México existen diversidad de plantas arvenses y dentro de ellas se encuentra *Argemone mexicana* L. (Espinosa García,1996). Es una hierba anual con un líquido amarillo brillante en el tallo y pedúnculo. Presenta hojas de color verde azulado con líneas azul-brillante, el borde dentado, terminando cada diente en una espina. Las flores son amarillentas, los frutos son capsulares, oblongos ampliamente elípticos de 24 a 45 mm de largos por 12 a 20 mm de ancho, por la parte superior se abren y al madurar, se escapan las semillas, las cuales son muy pequeñas, negruzcas y rugosas (Figura 6). Originaria de México, presente en climas semicálido, semiseco y templado desde el nivel del mar hasta los 2750 msnm. Crece en terrenos de cultivo abandonados, en zonas agrícolas o a orillas de caminos. Esta planta se caracteriza por la presencia de alcaloides isoquinolínicos detectados en todos sus órganos. La protopina y la berberina se encuentran en mayor cantidad en las ramas, y la sanguinarina en la raíz y en las semillas. Alcaloides menores incluyen la cheilantiofolina, cheileritrina, coptisima, críptopina, esculerina y estilopina. En las flores, flavonoides 3-metoxi-quercetín, isoramnetín y el mono y diglucósido. En la semilla, el argemexitín, eriodictiol y luteolín; un aceite fijo en el que se encuentran los ácidos grasos argemónico y mexicánico, y mexicanol (UNAM,2009). Dichos compuestos presentan diversas actividades biológicas (Tabla 2).

3.5.1 Usos etnobotánicos

El chicalote es una planta recomendada para curar problemas de los ojos, como dolor, escozor, manchas e inflamación; aunque principalmente se usa en las cataratas, aplicando directamente el látex fresco o fomentos del cocimiento de la corteza por 5 o 6 días. Para aliviar la sordera, se muelen las bolitas (frutos), se colocan en un trapo o algodón, y se ponen en la oreja. En Michoacán se usa para la tsandukus, en purépecha se llama así a la enfermedad de los ojos, se manifiesta por una excesiva secreción (lagañas), originada por un cambio brusco de temperatura. También se reporta útil en el tratamiento de la bilis, dolor de muelas,

cólicos de los niños (cólico del recién nacido), expulsión de placenta, flujo, heridas y llagas, dolor de riñón, diabetes, alferecía, infecciones en la piel, granos, manchas, salpullido, inflamación, paludismo, convulsiones, espasmos, infecciones y hemorragias, como purgante y cicatrizante (UNAM,2009).



Figura 7. *Argemone mexicana* L. (Fuente: UNAM,2009)

3.6 Obtención de extractos de plantas

Las plantas representan una fuente valiosa de compuestos químicos que se usan tradicionalmente como fuente principal de componentes o ideas en el desarrollo de nuevos productos (Bubalo et al.,2018). Los compuestos en las plantas son producidos como metabolitos secundarios, generado a través de diversas vías biológicas y juegan un papel importante en la protección de las plantas de bióticos o estrés abiótico (Dixon,2001). Considerando las grandes variaciones entre los compuestos químicos y una gran cantidad de especies de plantas, es necesario construir un enfoque estándar e integrado para extraer dichos compuestos, La

mayoría de estas técnicas se basan en el poder de extracción de diferentes solventes en uso y la aplicación de calor y / o mezcla (Smith,2003).

La maceración se convirtió en una forma popular y económica de obtener compuestos químicos, generalmente consta de varios pasos. En primer lugar, la molienda de materiales vegetales en partículas pequeñas se usa para aumentar el área de superficie para una mezcla adecuada con solvente. En segundo lugar, en el proceso de maceración, se agrega un solvente apropiado en un recipiente cerrado. En tercer lugar, el líquido se filtra para recuperar una gran cantidad de soluciones ocluidas (Azmir et al.,2013).

La eficiencia de extracción de cualquier método convencional depende principalmente de la elección de los solventes. La polaridad del compuesto objetivo es el factor más importante para la elección del disolvente. La afinidad molecular entre el solvente y el soluto, la transferencia de masa, la seguridad ambiental, la toxicidad humana y la viabilidad financiera también deben considerarse en la selección del solvente para la extracción de compuestos bioactivos. Algunos ejemplos de compuestos bioactivos extraídos usando diferentes solventes se dan en la tabla 4 (Cowan,1999) donde se presentan los diversos metabolitos, así como el solvente con el que se extraen los mismos, algunos compuestos se pueden obtener con distintos solventes.

Tabla 4. Compuestos bioactivos extraídos por diferentes solventes

Agua	Etanol	Metanol	Cloroformo	Cloruro de metileno	Éter	Acetona
Antocianinas	Taninos	Antocianinas	Terpenoides	Terpenoides	Alcaloides	Flavonoides
Taninos	Polifenoles	Terpenoides	Flavonoides		Terpenoides	
Saponinas	Flavonoides	Saponinas				
Terpenoides	Terpenoides	Taninos				
	Alcaloides	Flavonoides				
		Polifenoles				

3.7 Análisis de efectividad biológica: Uso de Probit

El análisis Probit se ha utilizado ampliamente durante muchos años para analizar datos de bioensayos. El término bioensayo, en su sentido más amplio, debe entenderse que significa la medición de la potencia de cualquier estímulo, físico, químico o biológico a un determinado organismo o población (Finney,1952). La toxicidad de los fungicidas o de cualquier tóxico a un organismo, se expresa usualmente en términos de DL_{50} (dosis letal media); este valor representa la cantidad de tóxico por unidad de peso que mata 50% de los animales empleados en la prueba. La DL_{50} comúnmente se expresa en mg/Kg y ocasionalmente en mg por animal (Ortuño Torres,2012).

En los casos en que no se sabe la cantidad de tóxico que entra en contacto con el organismo, pero si se sabe cuál es la cantidad de tóxico que rodea a este, se usa el término CL_{50} (concentración letal media), concentración del compuesto tóxico que provoca la muerte del 50% de los animales expuestos, en un periodo específico (generalmente 24 h). Los datos obtenidos de un bioensayo no pueden ser analizados con la estadística tradicional que se usa en los ensayos de campo, sino que debe utilizar lo que se llama estadística cuantil, la cual se caracteriza por la respuesta a un estímulo de n unidades experimentales, donde r unidades responden y $n-r$ no lo hacen. Para expresar la susceptibilidad de cualquier población u organismo a cualquier tóxico, se grafica la probabilidad de que las unidades Probit del porcentaje de mortalidad, contra una escala logarítmica de la dosis (Lagunes-Tejeda y Vázquez -Navarro,1994).

Para el análisis de la línea dosis-Probit, es necesario que exista una distribución normal de la respuesta tóxica. El análisis Probit, es un tipo particular de regresión lineal que tiene como objetivo conocer la relación que existe entre una variable independiente (la concentración de un tóxico) y una variable dependiente (la respuesta=mortalidad) para una especie y una exposición determinada. Para ello la respuesta acumulada de los organismos (mortalidad acumulada) se transforma a unidades Probit (eje Y) y la concentración del tóxico se transforma

logarítmicamente (eje X). El resultado es una recta en la cual podemos interpolar el 50% ó 95% de la respuesta y conocer que concentración de tóxico causa esa respuesta (CL₅₀ ó CL₉₅) (Huamán-Campos,2015).

3.8 Identificación de compuestos mediante cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masas

Históricamente, la medición e identificación de los metabolitos se logró mediante ensayos espectrofotométricos, capaces de detectar metabolitos individuales o mediante simple separación cromatográfica de mezclas de baja complejidad. Sin embargo, durante la última década, se han establecido varios métodos que ofrecen alta precisión y sensibilidad para el análisis de mezclas altamente complejas de compuestos. Estos métodos incluyen cromatografía de gases-espectrometría de masas (GC-MS) (Lisec et al.,2006).

GC-MS facilita la identificación y cuantificación robusta de unos pocos cientos de metabolitos en un solo extracto vegetal, lo que resulta en una cobertura bastante completa de las vías centrales del metabolismo primario (Roessner et al.,2001). Las principales ventajas de esta tecnología son que se ha utilizado durante mucho tiempo para la elaboración de perfiles de metabolitos y, por lo tanto, existen protocolos estables para la configuración y el mantenimiento de la máquina, y la evaluación e interpretación del cromatograma (Fiehn et al.,2000). Aunque ningún sistema analítico único puede cubrir todo el metaboloma, la GC-MS tiene una cobertura relativamente amplia de clases de compuestos, incluidos los orgánicos y aminoácidos, azúcares, alcoholes de azúcar, intermedios fosforilados y compuestos lipofílicos (Halket y Zaikin,2003).

Un instrumento de GC-MS generalmente está equipado con una fuente de iones de ionización electrónica (EI) y, por lo tanto, proporciona información sobre el tiempo de retención y el espectro de masas para cada compuesto. La identificación de los compuestos generalmente se logra haciendo coincidir un espectro de masas con los espectros de masas registrados en una biblioteca de referencia (Stein y

Scott,1994). Los índices de retención (es decir, tiempos de retención normalizados) también se pueden incorporar en la identificación para reducir la tasa de identificaciones falsas (Koo et al.,2016).

4. Justificación

En la actualidad el desarrollo científico y tecnológico contribuye de manera importante para alimentar la población de rápido crecimiento en el mundo, una proporción significativa de los cultivos alimenticios todavía se pierde por plagas y enfermedades. Las enfermedades de las plantas son una grave amenaza para la seguridad alimentaria mundial, ocasionando pérdidas del 10-16% de la cosecha total de cultivos anualmente (Strange y Scott,2005; Oerke,2006). Las enfermedades de los cultivos deben controlarse adecuadamente para mantener un nivel de rendimiento aceptable. Debido a su acción rápida y efectiva, los fungicidas han sido ampliamente utilizados por los agricultores para controlar las enfermedades fúngicas de las plantas. Sin embargo, las estrategias de manejo basadas en fungicidas no siempre han conducido a resultados favorables en el control de patógenos ya que estas acciones han desarrollado resistencia en los fitopatógenos (De Rodríguez et al.,2011). Además de las notorias consecuencias para la salud, el mal uso de pesticidas químicos causa varios problemas ambientales tales como la contaminación de las aguas superficiales y subterráneas, impactos perjudiciales en la microbiota del suelo, así como la salud general de los ecosistemas terrestres y acuáticos (Tilman et al.,2002).

Los pesticidas botánicos son extractos o compuestos vegetales utilizados para prevenir, destruir o controlar diferentes tipos de plagas y enfermedades. Las ventajas de los biofungicidas son que son menos tóxicos, propensos a la rápida biodegradación, están más dirigidos a una plaga específica, exhiben un modo de acción específico y se manejan en lugar de erradicar, manteniendo así el equilibrio ecológico de esta forma podrían representar una alternativa prometedora para el desarrollo de nuevos agentes de control biológico, tanto eficientes como que

cumplen los requisitos de seguridad para la seguridad alimentaria y la salud humana (Marutescu et al.,2017). Por lo que se considera relevante evaluar e identificar a través de este estudio, metabolitos secundarios que estén presentes en extractos vegetales derivados de *Argemone mexicana L.* finalmente proponer compuestos como una alternativa para la elaboración de un biofunguicida que no solo contrarreste los daños producidos por enfermedades fúngicas, sino también los daños y problemática ocasionados por el uso descontrolado de los plaguicidas.

5. Hipótesis

Los extractos de la planta *Argemone mexicana L.* (chicalote) presentan actividad antifúngica en *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Monilinia fructicola* y *Sclerotinia sclerotiorum*.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Probar la actividad antifúngica de los extractos de *Argemone mexicana L.* y determinar los compuestos químicos presentes en los extractos.

6.2 Objetivos específicos

- 1.- Obtener extractos de la planta chicalote con solventes de diferente polaridad
- 2.- Evaluar la actividad antifúngica de los diferentes extractos de la planta en distintas concentraciones
- 3.- Establecer la concentración letal media (CL₅₀) de los extractos de chicalote
- 4.- Determinar los compuestos presentes en chicalote
- 5.- Relacionar los compuestos presentes con la actividad antifúngica

7. Material y Métodos

7.1 Material vegetal

Las plantas se recolectaron aleatoriamente en enero del 2019 (periodo seco) en la región de Cuauhtepac de Hinojosa, Hidalgo, México, la cual se ubica a 20° 09'00 "N, 98'00" O, a una altitud entre 2200 y 2900 msnm. Su clima es Templado frío, con un suelo tipo semidesértico rico en materia orgánica y nutrientes, así como vegetación abundante en recursos naturales (no se requerían permisos específicos para los estudios de campo descritos o para la recolección de material vegetal). La identificación de especies se realizó en el laboratorio de botánica del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Un espécimen muestra que representa el material vegetal se depositó en el herbario del Instituto de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, y se le asignó el código de identificación 06. La planta se secó a la sombra a temperatura ambiente durante 15 días, se trituró y se homogenizó en un molino de cuchillas (GM 200 De Grindomix, Glen Mills Inc, Clifton, Nueva Jersey, EE.UU.).

7.2 Extracción de compuestos fitoquímicos.

Los extractos de las plantas se obtuvieron por maceración con: hexano, acetato de etilo, metanol y agua para poder obtener un perfil químico más completo, a pesar de que la literatura indica que los compuestos con actividad biológica de chicalote son de naturaleza polar. Cada solvente (750 mL) se mezcló con 50 g de muestra de planta. La maceración se mantuvo durante 15 días, para después filtrar los extractos dos veces a través de papel de filtro Whatman no. 1. Los solventes en los extractos se eliminaron al vacío, utilizando un evaporador rotativo (BUCHI modelo R-215, Equipar, Diclab TM, México) alrededor de 6 horas por extracto y considerando la temperatura de ebullición y presión de cada solvente, como lo indica el equipo. Los extractos se almacenaron en un desecador a 26 ° C y 0% de humedad relativa (HR) hasta su uso en los bioensayos.

7.3 Aislamiento de hongos

F. oxysporum fue aislado de un fruto de jitomate (*Solanum lycopersicum*) colectado en Culiacán, Sinaloa, México que mostró síntomas característicos de la enfermedad: marchitamiento progresivo, defoliación y la muerte subsecuente de la planta (Ávila et al.,2019). *C. gloeosporioides* fue aislado de una muestra de pitahaya (*Hylocereus undatus*) proveniente del Municipio de Cuautla, Morelos, México. Los tallos presentaban acérvulos abundantes en la superficie. *S. sclerotiorum* fue aislado de una muestra de ajo (*Allium sativum*) proveniente de Irapuato, Guanajuato, México. Los bulbos presentaban podredumbre blanda recubierta de un micelio blanco algodonoso. *M. fructicola* fue aislado de un fruto de durazno (*Prunus pérsica*) proveniente de Texcoco, Estado de México, México. La muestra presentaba podredumbre firme de color marrón en todo el fruto. El aislamiento se realizó haciendo pequeños cortes en el área avanzada de la enfermedad presente en la muestra. Las porciones de los hongos obtenidos fueron desinfectadas en una solución de hipoclorito al 3% (v / v) durante 3 min, posteriormente fueron enjuagados tres veces con agua esterilizada, secado en papel estéril y colocado en placas de Petri de 9 cm de diámetro con medio de agar papa-dextrosa (PDA) (De Rodríguez et al.,2017). Los cultivos fúngicos se incubaron a 28 ± 2 ° C. Las preparaciones microscópicas se realizaron con azul de lactofenol, y los hongos se identificaron por las características morfológicas con la ayuda de un microscopio (Olympus CX31, Olympus, Richmond Hill, Ontario, CA) (Hernández-Lauzardo et al.,2016).

7.4 Evaluación *in vitro* de extractos contra hongos fitopatógenos

El efecto antifúngico de los extractos de hojas de *Argemone mexicana* L. sobre el crecimiento de hongos se realizó utilizando el método de dilución de agar con algunas modificaciones (Vásquez Covarrubias et al.,2013). Los extractos se incorporaron al medio de cultivo (PDA) después del proceso de esterilización del medio en una autoclave vertical (Evar, EV-30, EQUIMLAB, México) durante 15 minutos a 121 ° C y hasta que el medio alcanzó una temperatura inferior a 50 ° C. Las concentraciones de extractos utilizados fueron: 500, 1000, 2000, 4000 y 8000

ppm. Para llevar a cabo el método de dilución de agar, cada uno de los extractos se resuspendió con el solvente respectivo (2 mL) y se añadió Tween 20 al 0.1% (v / v) para facilitar la homogeneización de los extractos en el medio. Se incluyeron tres controles: control uno (solo PDA), control dos (PDA + solvente) y control tres (PDA + Tween 20). La mezcla se vertió en placas de Petri hasta la 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 con 7 días de resiembra. Todas las concentraciones se llevaron a cabo por triplicado. Las placas de Petri se incubaron a 28 ± 2 ° C. La eficacia de los tratamientos se evaluó midiendo la inhibición del crecimiento micelial (en mm). El diámetro del crecimiento micelial (mm) se midió tomando lecturas utilizando un Vernier digital (CALDI-6MP, Truper, México TM). Las mediciones se tomaron cada 24 h durante 168 h. El porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio se determinó utilizando el control como referencia, y se calculó según lo reportado por (Hernández-Soto et al.,2018):

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

$$\% CI = 100 - \% growth \quad (2)$$

Dónde: φh representa el diámetro (mm) del crecimiento de hongos, φb es el diámetro del crecimiento del control negativo de microorganismos en cada evaluación y % CI es el porcentaje de inhibición del crecimiento.

7.5 Análisis de la composición química de los extractos de *A. mexicana* por cromatografía de gases – espectrometría de masas (GC-MS)

El análisis se llevó a cabo en el Centro Regional de Biotecnología del Instituto Tecnológico y de Estudios Superiores de Monterrey Campus Querétaro, empleando el equipo Agilent Technologies 7890A GC system conectado a un 5975 C MSD en modo de exploración Split less. La separación de los metabolitos de los extractos se realizó utilizando una columna DB17HT (30 m x 0.25 mm 1D x 0.15

μ) y un sistema de ionización con energía de 70 eV. Se usó helio como gas portador, con un flujo constante a 3 mL / min y se usó un volumen de inyección de 1 μ L, la temperatura de inyección fue de 270 ° C. El programa de calentamiento del horno fue isotérmico, durante 1 minuto a 60 ° C, seguido de un calentamiento de 30 ° C/min hasta 80 ° C/min posteriormente 10 ° C/min hasta 110 ° C/min y finalmente 6 ° C/min hasta 270 ° C sostenido por 40 min. Para la interpretación de los espectros de masas de los compuestos se realizó utilizando la biblioteca NIST (Instituto Nacional de Estándares y Tecnología), considerando un factor de coincidencia mayor de 700 y una probabilidad igual o superior al 50% para reportar resultados confiables (Raja Rajeswari et al.,201). Las soluciones se prepararon tomando 1 g de cada extracto y haciéndolo soluble en 20 mL de sus respectivos solventes. Las soluciones se filtraron a través de papel de filtro Whatman no. 1 para eliminar cualquier partícula sólida. Las soluciones utilizadas fueron limpias y transparentes. Todos los productos químicos utilizados fueron de grado analítico altamente puro (Ullah et al.,2018).

7.6 Análisis estadístico

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con arreglo factorial. Para cada hongo, se evaluaron 20 tratamientos (cuatro solventes x cinco concentraciones). Tres réplicas para cada tratamiento. Los ensayos se repitieron tres veces a lo largo del tiempo. Los valores informados son el promedio de las mediciones. Se utilizó un análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas (MR) para determinar la interacción entre los factores y su efecto a través del tiempo, así como una prueba de comparación de medias de Tukey ($p < 0.05$) con el software del sistema SAS-PC (versión 9.1.3) para Windows. El análisis Probit se realizó para calcular la CL_{50} de los extractos y se realizó con el programa SAS (versión 9.1).

8. Resultados y discusiones

8.1 Evaluación *in vitro* de extractos contra hongos fitopatógenos

En el análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas (MR), los valores del p-Valor permitieron determinar la existencia de las tendencias de cambio a través del tiempo de la variable estudiada. Se encontró que a un nivel de significancia ($p < 0.05$; Tabla 5) existe una tendencia de cambio lineal para los factores estudiados, así como interacción del extracto con las concentraciones a través de las 168 horas. Los controles con solvente y surfactante (Tween 20) presentaron un porcentaje de inhibición entre 1 y 3%, incluso en algunos casos no mostraron inhibición en el crecimiento de hongos, por esta razón se sumaron los porcentajes de ambos tratamientos y posteriormente se restaron a partir de los valores de las diferentes concentraciones (Tabla 6-13).

Tabla 5. Análisis de varianza (ANOVA) con medidas repetidas (MR)

Factores	F	(p-Valor <0.05)
Horas	11013988.147	.000
Horas* extracto	1625717.742	.000
Horas* ppm	540735.448	.000
Horas * extracto * ppm	69708.777	.000

Valor $p < 0.05$: para cualquier fuente de variación indica que hay una tendencia a cambiar con el tiempo.

8.1.2 Efecto de *A. mexicana* sobre *M. fructicola*

Los resultados mostraron que *A. mexicana* L presenta actividad antifúngica significativa en *M. fructicola* (Tabla 6). La mayor actividad biológica en el extracto de hexano se produjo a 4000 y 8000 ppm. A estas concentraciones, el extracto de hexano inhibió más del 75% del crecimiento radial en las primeras 24 horas. La inhibición permaneció por encima del 70% a lo largo del tiempo con estas

concentraciones. En otra investigación (Di Liberto et al.,2019), informaron que los extractos de hexano y acetato de etilo de la planta medicinal argentina *Solidago chilensis* resulto ser eficiente para el control de *M. fructicola* con un efecto fungistático entre 62.5 y 250 ppm; y un efecto fungicida entre 500 y 1000 ppm. La reducción en el crecimiento del micelio de *M. fructicola* con el extracto hexánico podría ser atribuida a terpenos y flavonoides identificados en esta investigación como: Hidrazina, (1-metiletil) -; 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol; 7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona; Fenol, 2,2'-metilenbis [6- (1,1-dimetiletil) -4-etil-. Se especula que el mecanismo de acción de los terpenos implica la interrupción de la membrana y también la destrucción de las mitocondrias fúngicas (Walker y White.,2011).

Los extractos de acetato de etilo (Figura 8.) y metanol presentaron una inhibición por encima del 90% del crecimiento a partir de 2000 ppm en las primeras 24 horas. En cambio, el extracto acuoso mostro una baja inhibición del crecimiento en *M. fructicola* (Figura 8.), incluso a 8000 ppm la inhibición fue de 46.25 ± 0.03 %. Además, en otro experimento (Boiteux et al.,2018) se estudió la efectividad del extracto acuoso de *Larrea divaricata* contra *M. fructicola* demostrando que a una concentración de 750 ppm se inhibió el 67% del crecimiento micelial. Las diferencias encontradas con el estudio mencionado anteriormente, podrían atribuirse a la diferencia en las especies utilizadas, así como a la variación de la región de muestreo, la edad de la planta, el estado de crecimiento, la variación estacional y las condiciones ambientales en las que proliferaron las plantas (Silva et al.,2012). Los resultados del análisis Probit de los extractos (Tabla 7) reflejaron la actividad fungicida en los valores obtenidos a concentraciones letales para inhibir el 50% de los patógenos (CL_{50}) al final de la prueba (168 h). La CL_{50} del extracto de acetato de etilo fue de 350.46 ppm en un intervalo de 293.20 ppm a 409.83 ppm. Mientras tanto, la CL_{50} para el extracto de metanol fue 261.15 ppm. Por lo tanto, estos extractos representan una alternativa viable en el control ecológico de *M. fructicola*.

Tabla 6. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *M. fructicola* con diferentes extractos de *A. mexicana* L. a varias concentraciones

Extracto	ppm	% de Inhibición							
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	
<i>Monilia fructicola</i>	500	24.19±0.03 ^h	22.23±0.60 ^{gh}	21.08±0.35 ⁱ	15.52±0.10 ^l	15.39±0.86 ^k	14.45±0.03 ^m	12.14±0.62 ^l	
	1000	34.44±0.01 ^g	24.98±0.05 ^g	24.78±0.02 ^k	22.63±0.10 ^k	22.51±0.15 ^l	16.87±0.06 ^l	14.66±0.02 ^l	
	Hexano	2000	37.67±0.03 ^g	25.78±0.01 ^g	25.70±0.04 ^k	23.20±0.01 ^k	23.08±0.11 ^l	21.99±0.51 ^k	21.85±0.65 ^j
	4000	75.44±0.03 ^{cd}	75.27±0.03 ^{de}	73.40±0.01 ^d	70.93±0.03 ^d	70.44±0.03 ^e	70.21±0.02 ^{cd}	70.17±0.04 ^c	
	8000	81.72±0.02 ^c	76.60±0.24 ^b	75.99±0.04 ^{cd}	74.20±0.01 ^c	71.28±0.01 ^c	71.25±0.04 ^c	70.44±0.03 ^c	
	500	73.08±0.01 ⁱ	58.83±0.03 ^{gh}	54.58±0.01 ^j	48.10±0.04 ^l	39.22±0.01 ^h	37.90±0.03 ^l	33.21±0.01 ^k	
	1000	74.57±0.01 ^d	62.83±0.53 ^c	55.13±0.02 ^f	54.00±0.01 ^g	52.33±0.03 ^f	50.23±0.05 ^g	39.86±0.01 ⁱ	
	Acetato de etilo	2000	91.49±0.01 ^b	70.02±0.00 ^c	64.06±0.02 ^{ef}	59.48±0.02 ^f	54.36±0.05 ^f	51.24±0.05 ^g	46.64±0.01 ⁱ
	4000	94.22±0.01 ^a	78.64±0.01 ^{ab}	77.20±0.01 ^b	76.27±0.04 ^b	71.65±0.02 ^b	71.51±0.04 ^b	70.11±0.04 ^b	
	8000	97.44±0.01 ^a	83.26±0.00 ^a	82.40±0.01 ^a	77.25±0.01 ^a	73.48±0.04 ^a	72.22±0.04 ^a	70.58±0.29 ^a	
500	73.19±0.02 ^{cd}	54.15±0.01 ^f	48.18±0.02 ^l	45.11±0.02 ^l	38.30±0.03 ^g	37.55±0.08 ^h	32.36±0.03 ^h		
1000	73.39±0.01 ^{cd}	60.11±0.02 ^e	54.91±0.57 ^h	54.75±0.04 ^h	52.91±0.05 ^f	50.38±0.04 ^f	39.10±0.12 ^g		
Metanol	2000	91.10±0.02 ^b	65.18±0.01 ^d	64.16±0.03 ^g	59.45±0.02 ^g	55.02±0.09 ^e	50.48±0.04 ^f	45.28±0.12 ^f	
4000	94.13±0.01 ^{ab}	70.62±0.04 ^c	69.55±0.01 ^e	65.45±0.03 ^e	60.75±0.47 ^d	55.51±0.01 ^e	51.28±0.05 ^e		
8000	95.11±0.00 ^{ab}	81.73±0.03 ^b	77.24±0.00 ^c	73.99±0.01 ^c	70.22±0.07 ^c	64.43±0.02 ^d	57.35±0.00 ^d		
500	21.05±0.02 ^f	20.85±0.03 ^h	17.89±0.12 ^o	9.84±0.04 ^p	9.70±0.04 ^o	8.21±0.01 ^q	4.88±0.10 ^o		
1000	21.31±0.05 ^f	20.94±0.12 ^h	18.30±0.06 ^o	13.46±0.01 ^o	12.66±0.03 ⁿ	12.38±0.04 ^p	6.95±0.35 ⁿ		
Agua	2000	25.60±0.01 ^f	21.57±0.02 ^h	21.31±0.02 ⁿ	20.76±0.33 ⁿ	18.16±0.03 ^l	16.44±0.04 ^o	7.53±0.35 ⁿ	
4000	37.67±0.01 ^e	27.08±0.01 ^g	26.59±0.04 ^m	25.13±0.01 ⁿ	18.58±0.01 ^l	17.64±0.02 ⁿ	10.05±0.35 ^m		
8000	46.25±0.03 ^e	29.34±0.03 ^g	28.45±0.26 ^m	26.62±0.07 ^m	18.77±0.02 ^l	18.57±0.10 ⁿ	16.26±0.23 ^h		

Los resultados se presentan con una desviación estándar de tres repeticiones. Los valores con la misma letra dentro de cada columna son estáticamente iguales (Tukey $p < 0.05$).

Tabla 7. CL₅₀ de extractos de *A. mexicana* L. para inhibir el crecimiento micelial de *M. fructicola* durante 168 h de incubación.

Hongo fitopatógeno	Extracto	95% Límites Fiduciales			
		CL ₅₀ (ppm)	Inferior	Superior	X ²
<i>Monilinia fructicola</i>	Hexánico	1421	1316	1526	898.69
	Acetato de etilo	350.46	293.20	409.83	340.09
	Metanólico	261.15	211.10	314.37	298.32
	Acuoso	44622	28071	78689	135.47

X²: chi-cuadrado, significativo a nivel p <0.05.

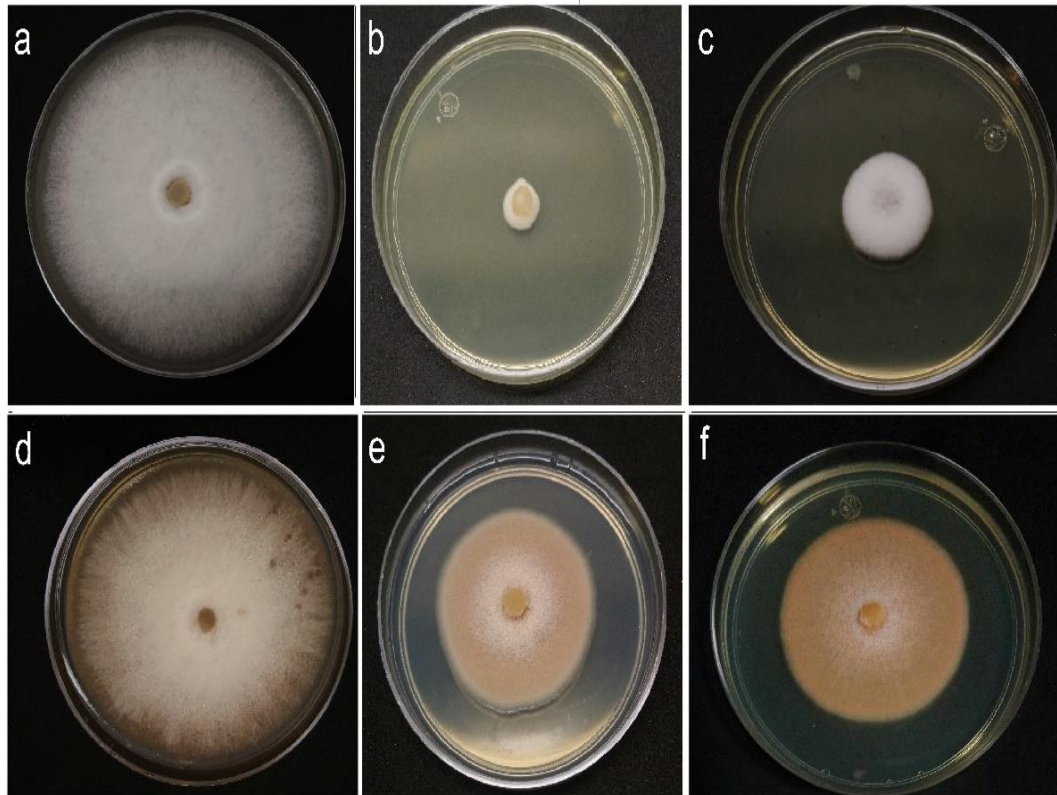


Figura 8. Actividad antifúngica de *A. mexicana* L. extracto de acetato de etilo y extracto acuoso sobre *M. fructicola*. (a) Control de acetato de etilo uno, (b) tratamiento de acetato de etilo 8000 ppm, (c) tratamiento de acetato de etilo 4000 ppm, (d) control de extracto acuoso, (e) tratamiento extracto acuoso 8000 ppm, y (f) extracto acuoso 4000 ppm tratamiento, después de 168 horas.

8.1.3 Efecto de *A. mexicana* sobre *C. gloeosporioides*

Los resultados mostraron que el efecto de la actividad antifúngica de *A. mexicana* L. fue altamente significativa en *C. gloeosporioides* (Tabla 8). El extracto de hexano con los tratamientos de 4000 y 8000 ppm inhibió más del 50% del crecimiento de *C. gloeosporioides*. En una investigación similar (De Rodríguez et al.,2011) emplearon extracto hexánico de *Lippia graveolens* contra *C. gloeosporioides* y reportan una actividad fungicida a partir de 2000 ppm. (Feng et al.,2019) evaluaron camptotecina y sus derivados provenientes de una planta medicinal china *Camptotheca acuminata* donde reportan un control de eficacia superior al 50 % en *C. gloeosporioides*, resultados similares a o reportado en esta investigación.

Los extractos de acetato de etilo (Figura 9) y metanol mostraron una actividad fungicida desde el tratamiento de 500 ppm. En otra investigación (Hernández-Soto et al.,2018) usaron extracto metanólico de una planta de la misma familia *A. ochroleuca* contra *C. gloeosporioides* e informaron que una concentración de 5000 ppm el crecimiento fue inhibido en un 77%, actividad biológica menor a lo reportado en esta investigación. Se ha demostrado que los solventes polares y de polaridad intermedia como el acetato de etilo y el metanol extraen compuestos fenólicos como flavonoides, taninos, saponinas, esteroides insaturados y/o triterpenos (Mesa-Vanegas et al.,2015). Que son parte del sistema de protección de plantas contra todo tipo de plagas y enfermedades (Patzke y Schieber.,2018).

El extracto acuoso mostró una actividad fungistática con todos los tratamientos (Figura 9). Dicha actividad se atribuye a compuestos identificados en este extracto como: Ciclohexasiloxano, dodecametil- y Ciclooctasiloxano, hexadecametil-. Otros investigadores (Bautista-Baños et al.,2003) evaluaron extractos acuosos de hojas de chirimoya y semillas de papaya contra este hongo, los extractos no presentaron actividad antifúngica, quizás los compuestos que atribuyen la actividad antifúngica a los extractos, no se extraen con este solvente. Los resultados del análisis Probit para *C. gloeosporioides* (Tabla 9), se muestran solo para el extracto hexánico y acuoso debido a que con en el extracto de acetato de etilo y metanol no hubo

crecimiento que reportar, posiblemente la CL₅₀ está por debajo del tratamiento de 500 ppm. La CL₅₀ del extracto hexánico fue de 590.02 ppm en un intervalo de 441.25 a 757.13 ppm. El extracto acuoso requiere de una CL₅₀ más alta, por lo que no sería una alternativa para el control de *C. gloeosporioides*.

Tabla 8. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *C. gloeosporioides* con diferentes extractos de *A. mexicana* L. a varias concentraciones

Extracto	ppm	% de Inhibición						
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Hexano	500	51.70±0.01 ^f	46.54±0.01 ^f	44.22±0.01 ^f	42.19±0.01 ^f	40.27±0.01 ^f	37.32±0.03 ^f	34.84±0.04 ^f
	1000	57.70±0.02 ^e	52.21±0.02 ^e	49.53±0.03 ^e	46.88±0.02 ^e	44.52±0.06 ^e	38.32±0.03 ^e	36.25±0.01 ^e
	2000	64.75±0.00 ^d	62.06±0.05 ^d	56.99±0.00 ^d	53.74±0.02 ^d	48.60±0.03 ^d	43.56±0.03 ^d	41.86±0.02 ^d
	4000	75.72±0.03 ^c	71.40±0.01 ^c	68.94±0.01 ^c	58.64±0.02 ^c	55.06±0.01 ^c	50.62±0.01 ^c	46.54±0.03 ^c
	8000	80.42±0.00 ^b	75.33±0.02 ^b	70.80±0.02 ^b	67.05±0.03 ^b	61.05±0.00 ^b	55.60±0.01 ^b	50.84±0.02 ^b
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Acetato de etilo	500	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
	1000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
	2000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
	4000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
	8000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Metanol	500	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
	1000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
	2000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
	4000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
	8000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
Agua	500	29.56±0.04 ^k	11.27±0.03 ^k	11.15±0.00 ^j	9.24±0.01 ^k	6.77±0.02 ^k	3.90±0.01 ^k	3.75±0.01 ^k
	1000	31.54±0.02 ^j	22.60±0.01 ^j	11.35±0.00 ^j	10.16±0.01 ^j	7.38±0.01 ^j	4.77±0.01 ^j	4.19±0.01 ^j
	2000	38.57±0.02 ⁱ	31.20±0.01 ⁱ	31.15±0.01 ⁱ	24.24±0.01 ⁱ	23.82±0.01 ⁱ	19.67±0.01 ⁱ	16.64±0.01 ⁱ
	4000	42.31±0.00 ^h	33.00±0.01 ^h	32.32±0.03 ^h	31.97±0.03 ^h	29.63±0.01 ^h	24.07±0.01 ^h	20.67±0.01 ^h
	8000	45.16±0.02 ^g	35.87±0.03 ^g	35.16±0.02 ^g	33.43±0.01 ^g	31.13±0.01 ^g	29.34±0.01 ^g	25.48±0.02 ^g

Los resultados se presentan con una desviación estándar de tres repeticiones. Los valores con la misma letra dentro de cada columna son estáticamente iguales (Tukey p <0.05).

Tabla 9. CL₅₀ de extractos de *A. mexicana* L. para inhibir el crecimiento micelial de *M. fructicola* durante 168 h de incubación.

Hongo fitopatógeno	Extracto	95% Limites Fiduciales			X ²
		CL ₅₀ (ppm)	Inferior	Superior	
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Hexano	590.02	441.25	757.13	186.83
	Acuoso	13622	10676	17642	216.05

X²: chi-cuadrado, significativo a nivel p <0.05.

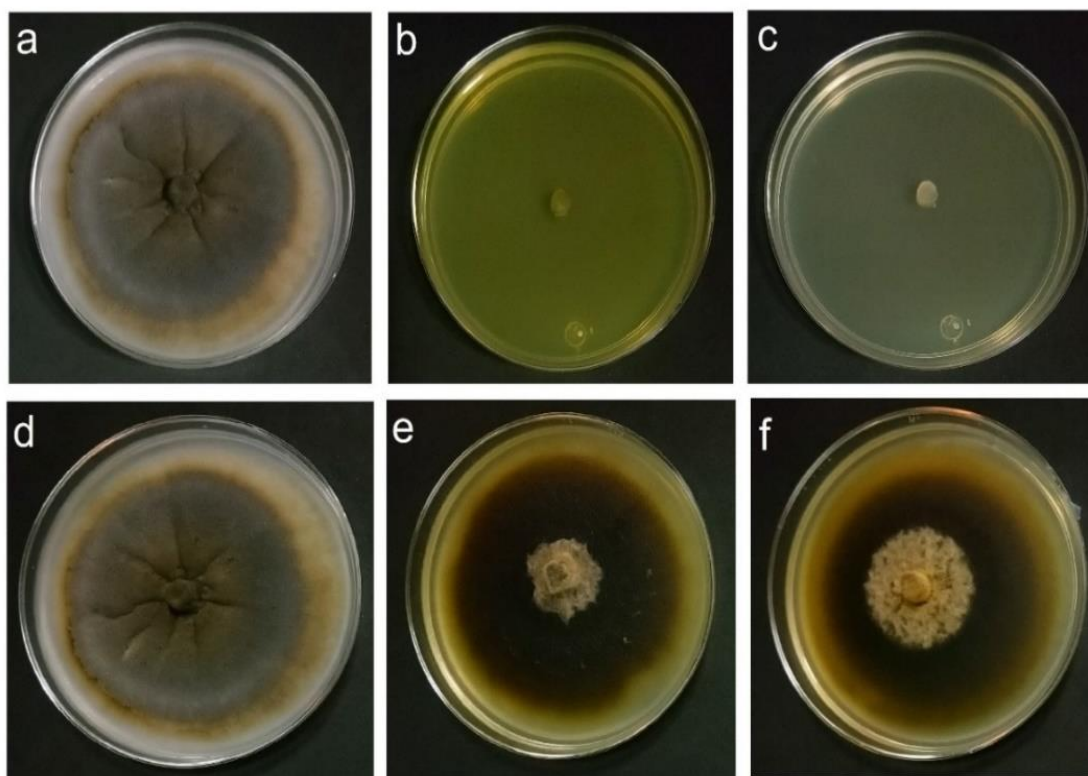


Figura 9. Actividad antifúngica de *A. mexicana* L. extracto de acetato de etilo y extracto acuoso sobre *C. gloeosporioides*. (a) Control de acetato de etilo uno, (b) tratamiento de acetato de etilo 8000 ppm, (c) tratamiento de acetato de etilo 4000 ppm, (d) control de extracto acuoso, (e) tratamiento extracto acuoso 8000 ppm, y (f) extracto acuoso 4000 ppm tratamiento, después de 168 horas.

8.1.4 Efecto de *A. mexicana* sobre *F. oxysporum*

Los resultados mostraron que el efecto de la actividad antifúngica de *A. mexicana* L. fue significativa en *F. oxysporum* (Tabla 10). El extracto de acetato de etilo presento una actividad fungicida con todos los tratamientos a lo largo del tiempo, 100% de inhibición en el crecimiento (Figura 10). Comportamiento semejante al extracto metanólico a 8000 ppm, en este mismo extracto con los tratamientos de 1000, 2000 y 4000 ppm se inhibió por encima del 80% dentro de las primeras 24 horas. La actividad fungicida del extracto de acetato de etilo podría ser atribuida a compuestos identificados en esta investigación como: Ácido hexadecanoico, éster metílico; ácido 9,12,15-octadecatrienoico, éster metílico, (Z, Z, Z) -; Ácido 2-propenoico, éster 2-metil, 1,2-etanodílico; succinato de dl- α -tocoferol; 3,6-dimetil-4H-furo [3,2-c] piran-4-ona.

Los mecanismos de acción de los compuestos identificados en el extracto de acetato de etilo no se conocen; sin embargo, se conoce el mecanismo de los compuestos fenólicos contra los patógenos, estos presentan tres sitios de acción: pared celular, membrana celular y mitocondrias (Lagrouh et al.,2017). La pared celular fúngica está conformada por esteroides, los cuales son responsables de mantener la función y la integridad celular (Rodriguez et al.,1985). Una vez que se daña la continuidad de la pared celular, la morfología ya no se puede mantener, y las células se vuelven osmóticamente frágiles. Una lesión muy pequeña en la pared celular puede causar inflamación en el área de la lesión, ruptura de la membrana celular e inhibición del crecimiento (Wu et al.,2008). La membrana plasmática desempeña un papel vital en el mantenimiento de un entorno homeostático, el intercambio de materiales y la transferencia de energía e información en la célula para mantener las células sanas y vivas (McBride et al.,2006). Una lesión de la membrana plasmática conlleva a la pérdida de iones, reducción del potencial de membrana, y al colapso de la bomba de protones (Wu et al.,2009).

Dentro de las funciones principales de las mitocondrias se incluye: la producción de energía, la homeostasis del pH, la redox, la amortiguación de calcio, la

regulación del nivel de segundos mensajeros, la producción y transmisión de una potencial transmembrana y la regulación de la apoptosis (Zorov et al.,1977). Las mitocondrias mantienen un potencial de membrana mitocondrial a través de su membrana interna en células sanas debido a un gradiente electroquímico mantenido a través de la cadena de transporte de electrones (Simbula et al.,1997). Los inhibidores del transporte de electrones mitocondriales reducen el potencial de membrana mitocondrial a través de inhibidores de la función de bombeo de protones de la cadena respiratoria, lo que conduce a la reducción de la producción de ATP y la muerte celular (Tian et al.,2012).

Los extractos de hexano y agua perdieron considerablemente la actividad biológica después de las 72 horas (Figura 10). En otro estudio (Kordali et al.,2009) emplearon extracto hexánico de las flores de *Achillea gypsicola* y de *Achillea biebersteinii* a lo largo de 6 días para probar su actividad contra *F. oxysporum* y reportan una inhibición en el crecimiento menor al 30% a lo largo del tiempo. Los resultados del análisis Probit para *F. oxysporum* (Tabla 11), reflejaron una CL₅₀ del extracto hexánico a 4530 ppm en un intervalo entre 3146 ppm y 6248 ppm, en otra investigación (Saha et al.,2013) reportan una CL₅₀ del extracto hexánico de las hojas de *Tagetes minuta* en un intervalo entre 642 y 4915 ppm resultados semejantes a lo reportado en esta investigación. Para el extracto metanólico la CL₅₀ se obtendría a 287.48 ppm con un intervalo entre 190.05 y 393.11 ppm al presentar las concentraciones más bajas resulta ser una alternativa ecológica para el control de *F. oxysporum*. En el extracto acuoso la CL₅₀ sería de 31317 ppm, no se muestran resultados para acetato de etilo debido a que *F. oxysporum* no presentó crecimiento en este extracto.

Tabla 10. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *F. oxysporum* con diferentes extractos de *A. mexicana* L. a varias concentraciones

Extracto	ppm	% Inhibición						
		24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
Hexano	500	31.25±0.02 ^k	28.18±0.01 ^m	24.25±0.02 ^m	22.03±0.43 ^l	15.35±0.03 ^m	10.16±0.08 ⁿ	6.13±0.07 ^l
	1000	45.95±0.07 ^j	37.04±0.03 ^l	32.10±0.11 ^l	25.93±0.12 ^k	19.47±0.01 ^l	16.49±0.03 ^m	12.73±0.01 ^k
	2000	51.49±0.01 ⁱ	45.96±0.03 ^k	39.49±0.06 ^k	31.30±0.03 ^j	22.32±0.03 ^k	18.82±0.28 ^l	16.47±0.09 ^j
	4000	61.75±0.06 ^h	52.30±0.02 ^j	45.31±0.07 ^j	33.46±0.03 ^{ij}	31.33±0.02 ^j	25.09±0.03 ^k	18.79±0.16 ⁱ
	8000	68.57±0.06 ^g	56.74±0.01 ⁱ	49.56±0.14 ⁱ	37.51±0.04 ^h	36.69±0.04 ⁱ	30.20±0.05 ^j	21.08±0.08 ^g
	500	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
1000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	
Acetato de etilo	2000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
	4000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
	8000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
Metanol	500	75.74±0.02 ^{cd}	66.09±0.00 ^g	65.90±0.00 ^h	49.76±0.01 ^g	41.36±0.05 ^f	39.92±0.01 ^e	25.87±0.01 ^e
	1000	80.80±0.02 ^c	78.80±0.02 ^d	70.78±0.00 ^g	59.05±0.12 ^f	47.01±0.02 ^d	46.94±0.02 ^d	37.80±0.03 ^d
	2000	88.99±0.06 ^b	82.64±0.01 ^c	75.92±0.00 ^d	69.33±0.01 ^c	62.35±0.01 ^c	57.45±0.01 ^c	44.76±0.01 ^c
	4000	94.35±0.01 ^{ab}	88.56±0.06 ^b	83.83±0.00 ^b	77.11±0.06 ^b	70.84±0.01 ^b	65.08±0.02 ^b	57.21±0.27 ^b
	8000	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a	100.00±0.00 ^a
	500	28.25±0.01 ^f	22.18±0.17 ^h	19.09±0.12 ^g	15.56±0.03 ^{ef}	12.36±0.01 ^h	8.95±0.02 ⁱ	6.36±0.25 ^j
1000	34.63±0.01 ^e	28.01±0.01 ^g	22.94±0.02 ^f	18.02±0.10 ^{ef}	14.06±0.04 ^h	11.01±0.00 ^h	8.89±0.25 ⁱ	
Agua	2000	39.06±0.04 ^e	33.65±0.01 ^f	27.49±0.07 ^e	21.05±0.50 ^{de}	18.54±0.35 ^g	15.48±0.00 ^g	10.78±0.03 ^h
	4000	44.88±0.02 ^{de}	36.47±0.01 ^f	31.26±0.01 ^d	27.11±0.02 ^d	20.34±0.09 ^g	22.01±0.01 ^f	12.89±0.01 ^g
	8000	54.57±0.01 ^{cd}	43.14±0.01 ^e	37.86±0.01 ^c	35.81±0.01 ^c	30.73±0.03 ^e	22.44±0.07 ^f	17.16±0.02 ^f

Los resultados se presentan con una desviación estándar de tres repeticiones. Los valores con la misma letra dentro de cada columna son estáticamente iguales (Tukey p <0.05).

Tabla 11. CL₅₀ de extractos de *A. mexicana* L. para inhibir el crecimiento micelial de *F. oxysporum* durante 168 h de incubación.

Hongo fitopatógeno	Extracto	95% Limites Fiduciales			X ²
		CL ₅₀ (ppm)	Inferior	Superior	
<i>Fusarium oxysporum</i>	Hexano	4530	3146	6248	153.71
	Metanol	287.48	190.05	393.11	78.03
	Acuoso	31317	21656	47844	165.58

X²: chi-cuadrado, significativo a nivel p <0.05

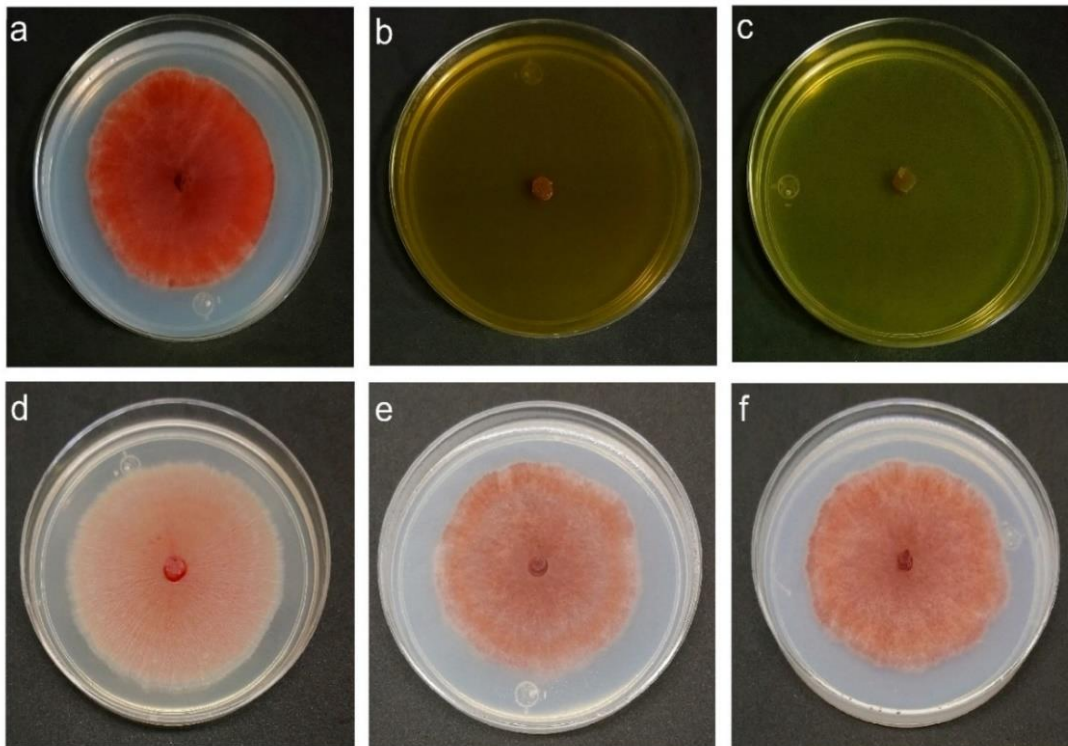


Figura 10. Actividad antifúngica de *A. mexicana* L. extracto de acetato de etilo y extracto acuoso sobre *F. oxysporum*. (a) Control de acetato de etilo uno, (b) tratamiento de acetato de etilo 8000 ppm, (c) tratamiento de acetato de etilo 4000 ppm, (d) control de extracto acuoso, (e) tratamiento extracto acuoso 8000 ppm, y (f) extracto acuoso 4000 ppm tratamiento, después de 168 horas.

8.1.5 Efecto de *A. mexicana* sobre *S. sclerotiorum*

Los resultados mostraron que el efecto de la actividad antifúngica de *A. mexicana* L. fue significativa en este hongo (Tabla 12). El extracto de acetato de etilo inhibió por encima del 95% del crecimiento en *S. sclerotiorum* con los tratamientos de 4000 y 8000 ppm a las 24 horas, a lo largo del tiempo se inhibió alrededor del 85%, el extracto metanólico resultó ser más efectivo para el control de este hongo (Figura 11), dicha actividad se atribuye a compuestos identificados en esta investigación como: 2-Propanamine, N-methyl-N-nitroso-; 1,1,3,3-Tetramethyl-1,3-disilaphenalanine. Otros investigadores (Moslem y El-Kholie.,2009) emplearon extracto metanólico de las hojas de *Azadirachta indica* A. juss a una concentración del 40% contra *S. sclerotiorum* a lo largo de 14 días y se reporta un 67.1 % de inhibición en el crecimiento micelial. (Pansera et al.,2013) emplearon extractos hidroetanólicos y etanólicos de *Salvia officinalis* a una concentración del 5%, para ambos casos se obtuvo por porcentaje de inhibición superior al 90% a lo largo de 14 días.

Las plantas sintetizan diversidad de metabolitos secundarios que funcionan prominentemente para proteger las plantas. La formación de metabolitos secundarios es el resultado de 77 millones de años de interacción de la planta con patógenos y se sabe que 78 000 metabolitos están involucrados en el sistema de defensa de la planta, por lo que la situación aún no es clara (Zaynab et al.,2018). cientos de compuestos vegetales poseen un papel defensivo ecológico y químico, que abrió una nueva área de investigación conocida como bioquímica ecológica (Tollrian y Harvell.,1999). Dentro de los principales tipos de metabolitos secundarios se encuentran los compuestos que contienen nitrógeno y azufre, estos se sintetizan principalmente a partir de aminoácidos (Städler et al.,2012). Que de acuerdo a su afinidad con la polaridad estarían presentes en el extracto metanólico (Turkmen et al., 2006). El mecanismo de acción de los compuestos nitrogenados hacia los microorganismos es complejo y aún no se ha explicado completamente (Bagiu et al.,2012). En general, se reconoce que pueden actuar como desacopladores, lo que interfiere con la translocación de protones sobre una

vesícula de membrana y posteriormente interrumpe la fosforilación de ADP (metabolismo de energía primaria) (Liu et al.,2009). También inhiben la síntesis de ADN, ARN, proteínas y polisacáridos (Khlif et al.,2010).

El extracto hexánico fue eficiente en las primeras 48 horas con los tratamientos de 4000 y 8000 ppm, En otra investigación (Matny et al.,2014) probaron el extracto hexánico de las resinas de *Boswellia* a una concentración del 5 % y reportan una inhibición en el crecimiento del 89% en *S. sclerotiorum*. El extracto acuoso presenta una actividad fungistática a lo largo del tiempo (Figura 11), En otra investigación (Lizcano-González et al.,2007) se evaluó el efecto antifúngico del extracto acuoso de tomillo (*thymus vulgaris*) en este mismo patógeno, donde reporta que a una concentración de 500 ppm se inhibió el 53% del crecimiento y fue disminuyendo hasta llegar al 15%. Lo que coincide con lo reportado en este experimento. Los resultados del análisis Probit para *S. sclerotiorum* (Tabla 13), reflejaron una CL₅₀ del extracto hexánico a 1002 ppm en un intervalo entre 884.85 ppm y 1122 ppm, para el extracto de acetato de etilo la CL₅₀ se obtendría a 576.57 ppm con un intervalo entre 492.05 y 662.25 ppm, en el extracto metanolico la CL₅₀ se obtendría a 100.28 ppm, siendo este extracto la mejor alternativa para inhibir el crecimiento de *S. sclerotiorum*.

Tabla 12. Porcentajes de inhibición del crecimiento de *S. sclerotiorum* con diferentes extractos de *A. mexicana* L. a varias concentraciones

	Extracto	ppm	% de Inhibición						
			24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Hexano	500	48.68±0.01 ⁱ	43.31±0.01 ^j	32.64±0.23 ^j	23.30±0.05 ^h	20.75±0.05 ^o	16.65±0.33 ^q	14.88±0.17 ^m
		1000	53.72±0.01 ^{gh}	48.52±0.02 ^{hi}	37.51±0.03 ⁱ	27.87±0.04 ^g	24.17±0.01 ⁿ	20.20±0.03 ^p	18.04±0.02 ^l
		2000	61.16±0.02 ^f	56.49±0.17 ^g	46.46±0.02 ^g	36.13±0.03 ^f	30.02±0.03 ⁱ	26.05±0.05 ⁿ	20.35±0.05 ^k
		4000	87.60±0.00 ^{bc}	72.53±0.02 ^{de}	68.89±0.20 ^c	64.15±0.10 ^c	59.33±0.14 ^g	52.90±0.06 ^h	43.28±0.44 ^h
		8000	94.46±0.01 ^a	87.57±0.04 ^b	85.25±0.04 ^b	81.23±0.08 ^b	78.04±0.20 ^d	73.58±0.21 ^c	63.65±0.36 ^d
	Acetato de etilo	500	58.90±0.04 ^e	51.29±0.03 ^g	37.70±0.05 ^h	29.31±0.06 ^e	21.84±0.32 ^h	13.55±0.02 ^j	6.28±0.20 ^j
		1000	78.22±0.01 ^{de}	65.61±0.22 ^f	55.84±0.04 ^e	53.67±0.03 ^d	49.11±0.11 ^f	40.36±0.00 ^g	33.06±0.23 ^g
		2000	87.12±0.01 ^b	72.92±0.03 ^{cd}	64.88±0.03 ^c	61.00±0.03 ^c	57.39±0.01 ^e	45.29±0.06 ^f	43.30±0.02 ^f
		4000	97.16±0.00 ^a	95.51±0.01 ^a	93.38±0.00 ^a	91.40±0.02 ^a	87.48±0.08 ^c	86.51±0.02 ^b	85.70±0.57 ^{ab}
		8000	98.01±0.02 ^a	96.68±0.01 ^a	95.79±0.02 ^a	91.17±0.09 ^a	87.79±0.01 ^c	86.63±0.06 ^b	86.56±0.03 ^a
	Metanol	500	76.80±0.04 ^f	71.81±0.03 ^{ef}	67.77±0.05 ^f	62.78±0.10 ^d	58.60±0.04 ^g	54.54±0.14 ^e	50.79±0.27 ^f
		1000	81.98±0.02 ^{cd}	78.57±0.01 ^c	73.66±0.05 ^d	68.19±0.00 ^c	65.30±0.04 ^e	58.27±0.06 ^d	55.23±0.13 ^e
		2000	97.54±0.00 ^a	95.96±0.03 ^a	95.89±0.02 ^a	91.97±0.02 ^a	91.19±0.04 ^b	89.18±0.02 ^b	82.72±0.02 ^c
		4000	97.73±0.01 ^a	97.05±0.01 ^a	96.88±0.02 ^a	93.22±0.03 ^a	92.59±0.04 ^{ab}	89.86±0.02 ^a	86.33±0.27 ^b
		8000	98.64±0.00 ^a	97.31±0.00 ^a	97.12±0.03 ^a	94.37±0.03 ^a	92.86±0.00 ^a	90.36±0.04 ^a	86.91±0.18 ^{ab}
Agua	500	26.37±0.16 ^k	21.78±0.02 ^k	17.58±0.06 ^o	15.33±0.04 ^l	12.73±0.03 ^m	7.31±0.16 ^o	6.93±0.04 ⁿ	
	1000	34.26±0.05 ^j	31.17±0.16 ^j	23.39±0.06 ⁿ	20.33±0.05 ^k	17.52±0.02 ^l	14.87±0.25 ^m	11.78±0.03 ^m	
	2000	36.05±0.06 ⁱ	34.18±0.02 ^{ij}	28.66±0.02 ^m	23.59±0.24 ^j	20.32±0.06 ^k	18.29±0.03 ^l	14.66±0.11 ^l	
	4000	46.91±0.01 ^{hi}	40.04±0.03 ^h	33.24±0.36 ^l	27.27±0.31 ⁱ	23.07±0.03 ^j	20.50±0.16 ^k	17.14±0.03 ^k	
	8000	52.56±0.02 ^g	46.18±0.28 ^g	39.95±0.24 ^k	33.59±0.19 ^h	28.11±0.10 ^j	23.30±0.07 ^l	19.96±0.21 ⁱ	

Los resultados se presentan con una desviación estándar de tres repeticiones. Los valores con la misma letra dentro de cada columna son estáticamente iguales (Tukey $p < 0.05$).

Tabla 13. CL₅₀ de extractos de *A. mexicana* L. para inhibir el crecimiento micelial de *S. sclerotiorum* durante 168 h de incubación.

Hongo fitopatógeno	Extracto	95% Limites Fiduciales			X ²
		CL ₅₀ (ppm)	Inferior	Superior	
<i>Sclerotinia sclerotiorum</i>	Hexánico	1002	884.85	1122	485.55
	Acetato de etilo	576.57	492.05	662.25	293.75
	Metanólico	100.28	42.20	159.75	20.22
	Acuoso	10676	7208	15600	135.35

X²: chi-cuadrado, significativo a nivel p <0.05

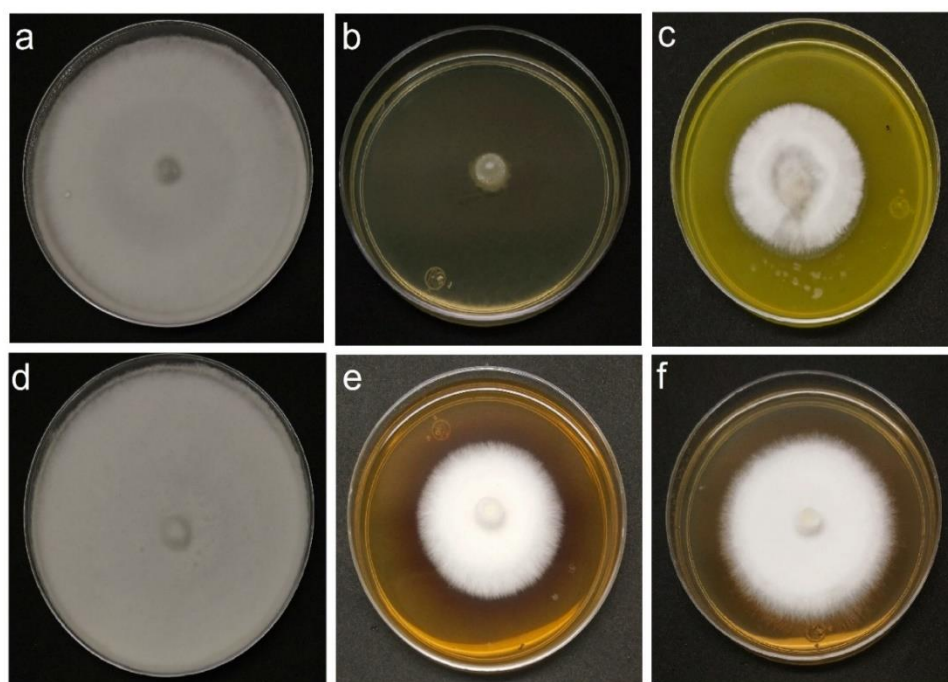


Figura 11. Actividad antifúngica de *A. mexicana* L. extracto de acetato de etilo y extracto acuoso sobre *S. sclerotiorum*. (a) Control de acetato de etilo uno, (b) tratamiento de acetato de etilo 8000 ppm, (c) tratamiento de acetato de etilo 4000 ppm, (d) control de extracto acuoso, (e) tratamiento extracto acuoso 8000 ppm, y (f) extracto acuoso 4000 ppm tratamiento, después de 168 horas.

De acuerdo a los resultados obtenidos en los ensayos microbiológicos, el extracto de acetato de etilo a una concentración de 8000 ppm resulto ser más efectivo para inhibir el crecimiento en las cuatro cepas evaluadas en este estudio a lo largo de 168 horas (Figura 12).

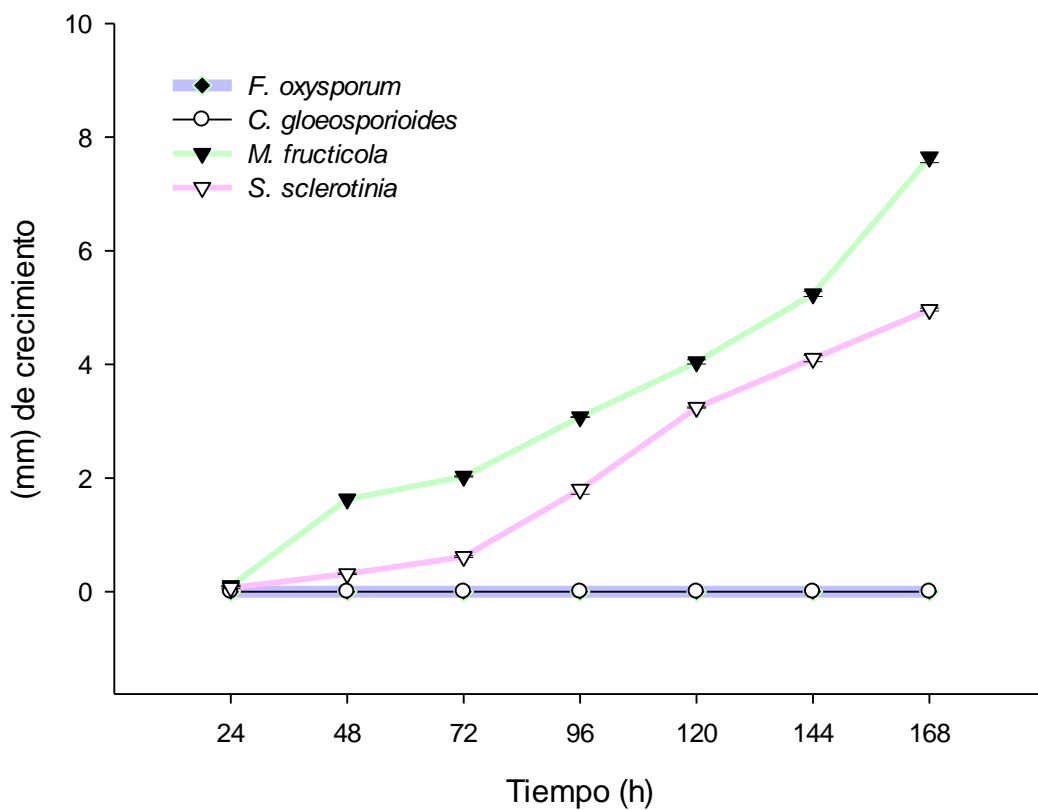


Figura 12. Crecimiento de los hongos fitopatógenos con el tratamiento de acetato de etilo a 8000 ppm a lo largo de 168 horas



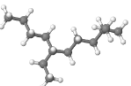
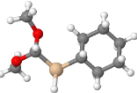
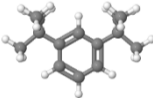
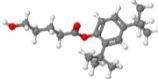
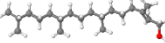
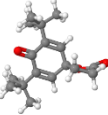
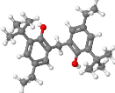
8.2 Composición química de los extractos

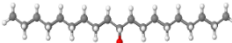
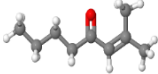

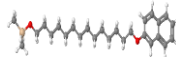
Los resultados de la composición química en GC-MS de los extractos de *Argemone mexicana* L. se presentan en las Tablas 14–17. La información presentada es: el tiempo de retención (TR), nombre del compuesto, fórmula molecular, peso molecular (MW), probabilidad de que sea el compuesto, cuanto más cercano sea el valor a 1000 representa mayor certeza de que sea el compuesto, #NIST es decir, el número que ocupa el compuesto dentro de la biblioteca, #ID (la huella digital de cada compuesto), concentración (% de área) que ocupa dentro de la muestra y estructura química.

8.2.1 Extracto hexánico de *A. mexicana* L.

Los resultados del análisis GC-MS del extracto hexánico de las hojas de *A. mexicana* se muestran en la tabla 14. Los compuestos identificados en este extracto fueron 14; Metilamina una amina alifática primaria, Hidrazina, (1-metiletil) - compuesto con actividad insecticida (Addor et al.,1989), Decano, 6-etil-2-metil- un ácido orgánico con usos industriales como solventes para lacas, pinturas, tintas, ácido aromatizante (Shettima et al.,2013), Silano, ciclohexildimetoximetil- que se usa como un componente importante de sustancias poliméricas para el llenado de las caries dentales (Sibanda et al.,2017), Ácidos pentanoicos, 5-hidroxi-, 2,4-di-t-butilfenil ésteres un ácido carboxílico con propiedades saborizantes, estimulante inmunológico, reduce el estrés, antidepresivo, hipocolesterolémico (Omorieg et al.,2018), fitol que es un isómero de 3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol un importante terpeno insaturado de cadena ramificada con actividad antimicrobiana, se sugiere que la inactivación de proteínas y enzimas es uno de los mecanismos importantes para la inactivación de microbios bacterianos (Ogunlesi et al.,2009;Ghaneian et al.,2015), 7,9-di-terc-butyl-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona un flavonoide con actividad antiviral contra el virus del herpes simple tipo-1 (Anantha et al.,2017), Fenol, 2,2'-metilenbis [6- (1,1-dimetiletil) -4-etil- un terpeno con propiedades antimicrobianas y antisépticas resultantes en una acción germicida activa (Celis et al.,2011), 10-Nonadecanol alcohol parafínico de cadena larga (Damjanović et al.,2006).

Tabla 14. Compuestos químicos identificados en los extractos de hexano de *A. mexicana* L.

R	Nombre del compuesto	Formula molecular	MW	P	#NIST	#ID	Área (%)	Estructura química
4.32	Metilamina	CH ₅ N	31	84.5	228024	845	8.96	
4.40	Hidrazina, (1-metiletil) -	C ₃ H ₁₀ N ₂	74	73.1	39818	6424	0.88	
4.71	Decano, 6-etil-2-metil-	C ₁₃ H ₂₈	184	50.0	60672	21906	7.11	
4.98	Silano, ciclohexildimetoximetil-	C ₉ H ₂₀ O ₂ Si	188	92.5	162899	66354	0.92	
6.18	Benzene, 1,3-bis(1,1-dimethylethyl)-	C ₁₄ H ₂₂	190	79.5	109671	22505	1.08	
11.20	Ácidos pentanoicos, 5-hidroxi-, 2,4-di-t-butilfenil ésteres	C ₁₉ H ₃₀ O ₃	306	50.0	164493	140841	8.55	
14.17	3,7,11,15-tetrametil-2-hexadecen-1-ol	C ₂₀ H ₄₀ O	296	50.9	114703	43206	4.67	
19.11	7,9-di-terc-butil-1-oxaspiro (4,5) deca-6,9-dieno-2,8-diona	C ₁₇ H ₂₄ O ₃	276	95.5	279726	24148	1.09	
27.94	Fenol, 2,2'-metilenbis [6- (1,1-dimetiletil) -4-etil-	C ₂₅ H ₃₆ O ₂	368	95.4	158883	23694	3.47	




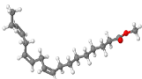
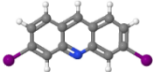
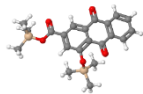
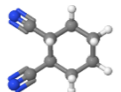
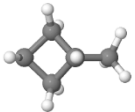
29.48	10-nonadecanol	C ₁₉ H ₄₀ O	284	50.6	113685	44659	7.22	
33.00	2-Octen-4-one, 2-methyl-	C ₉ H ₁₆ O	140	50.6	46585	44533	6.22	
33.34	2-Benzyl-8-methyl-1H-piperidino[4,3-b]indole	C ₁₉ H ₂₀ N ₂	276	60.8	327198	116827	16.40	
33.45	Isoxazolo [4,3-a] fenazina, 1-fenil-	C ₁₉ H ₁₁ N ₃ O	297	57.1	14192	177233	29.97	
39.91	Silano, dimetil (2-naftoxi) tetradeciloxi-	C ₂₆ H ₄₂ O ₂ Si	414	73.6	347220	188841	3.47	

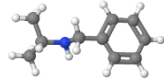
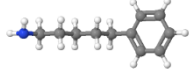
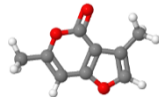
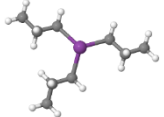
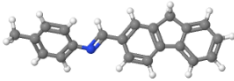
T R: Tiempo de retención; MW: Peso molecular; P: Probabilidad; Estructura química (Fuente: JSME Molecular Editor).

8.2.2 Extracto de acetato de etilo de *A. mexicana* L.

Los compuestos identificados en el extracto de acetato de etilo fueron 15 (Tabla 15): Ácido hexadecanoico, éster metílico que funciona como un semioquímico para una variedad de insectos (Wang et al.,2009), ácido n-hexadecanoico un ácido graso saturado de cadena larga con una cadena principal de 16 carbonos que se encuentra en las grasas y ceras, Ácido 9,12,15-octadecatrienoico, éster metílico, (Z, Z, Z)- presenta actividad biológica contra el parásito del género *Plasmodium* que transmite la malaria (Melariri et al.,2012), Ácido 2-propenoico, 2-metil-, 1,2-etanodiil éster con actividad antifúngica en hongos fitopatógenos como *Rhizoctonia solani*, *Sclerotium rolfsii* y *Fusarium oxysporum* (Septiyanti et al.,2019), succinato de dl- α -tocoferol un tocoferol natural y uno de los antioxidantes más potentes, 3,6-dimetil-4H-furo [3,2-c] piran-4-ona con actividad insecticida (Li et al.,2017).

Tabla 15. Compuestos químicos identificados en los extractos de acetato de etilo de *A. mexicana* L.

T R	Nombre del compuesto	Formula molecular	MW	P	#NIST	#ID	Área (%)	Estructura química
6.22	2-propin-1-ol, acetato	C ₅ H ₆ O ₂	98	82.7	983	1607	9.28	
16.71	Ácido hexadecanoico, éster metílico	C ₁₇ H ₃₄ O ₂	270	77	333716	38248	1.24	
17.76	ácido n-hexadecanoico	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	256	76.5	36484	2558	7.14	
20.30	Ácido 9,12,15-octadecatrienoico, éster metílico, (Z, Z, Z)-	C ₁₉ H ₃₂ O ₂	292	54.1	27738	9669	5.59	
33.31	Ácido 2-propenoico, 2-metil-, 1,2-etanodiol éster	C ₁₀ H ₁₄ O ₄	198	66.4	229630	30248	19.47	
35.87	3,6-diiodo acridina	C ₁₃ H ₇ I ₂ N	431	68.3	193281	189313	2.82	
35.89	succinato de dl-α-tocoferol	C ₃₃ H ₅₄ O ₅	530	50.0	116862	189272	10.48	
37.00	Ácido 4-hidroxi-antraquinona-2-carboxílico, di-TMS	C ₂₁ H ₂₄ O ₅ Si ₂	412	56.8	103013	188137	2.40	
40.68	trans-1,2-ciclohexanodicarbonitrilo	C ₈ H ₁₀ N ₂	134	88.8	74112	28667	1.58	
41.93	Ciclobutano, metil-	C ₅ H ₁₀	70	57.9	251	1336	2.07	

43.57	Bencenemethanamine, N- (1-metiletil) -	C ₁₀ H ₁₅ N	149	55.3	70909	11696	2.63	
43.65	Bencenopentanamina	C ₁₁ H ₁₇ N	163	70.3	29494	1138	18.47	
43.79	3,6-dimetil-4H-furo [3,2-c] piran-4-ona	C ₉ H ₈ O ₃	164	50.5	104087	122183	12.05	
43.91	Bismuthine, tripropyl-	C ₉ H ₂₁ Bi	338	81.9	15625	165927	2.56	
44.01	N- (9H-Fluoren-2-ilmetilen) -p-toluidina	C ₂₁ H ₁₇ N	283	54.2	261258	174340	2.23	

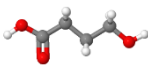


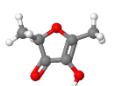
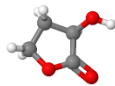
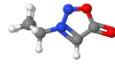

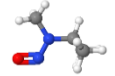

T R: Tiempo de retención; MW: Peso molecular; P: Probabilidad; Estructura química (Fuente: JSME Molecular Editor).

8.2.3 Extracto metanolico de *A. mexicana* L.

Los resultados del análisis GC-MS del extracto metanolico de las hojas de *A. mexicana* se muestran en la tabla 16. Ácido butanoico, 4-hidroxi- un depresor del sistema nervioso central, Butirolactona también conocido como gamma-butirolactona se usa como agente farmacológico, 2,5-dimetil-4-hidroxi-3 (2H) -furanona un miembro de la clase de furanos tiene un papel como agente aromatizante, una fragancia y un metabolito vegetal, 4H-piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil- un compuesto con potencial antioxidante (Yu et al.,2013), 2-propanamina, N-metil-N-nitroso- con actividad antibacterial contra *E. coli* (Naga et al.,2015), Benzofurano, 2,3-dihidro- también conocido como coumaran ejerce una acción como producto farmacológico (Terao & Maki.,1989), 1- (3,6,6-Trimetil-1,6,7,7a-tetrahidrociclopenta [c] piran-1-il) etanona un compuesto con actividad antioxidante y antihistamínica (Yadav et al.,2016), 1,1,3,3-tetrametil-1,3-

disilafenalano con actividades antimicrobianas, antitumorales, antisépticas, conservantes e insecticidas y antioxidantes (Zekeya et al.,2014), 2,4,6-Tris (1,1-dimetiletil) -4-metilciclohexa-2,5-dien-1-ona un compuesto orgánico del grupo de las cetonas (Granados-Chinchilla et al.,2016), Megastigmatrienona también conocida como “tabanona” compuesto clave en el sabor del tabaco (Slaghenaufi et al.,2016).

Tabla 16. Compuestos químicos identificados en los extractos de metanol de *A. mexicana* L.

T R	Nombre del compuesto	Formula molecular	MW	P	#NIST	#ID	Área (%)	Estructura química
4.31	Ácido butanoico, 4-hidroxi-	C ₄ H ₈ O ₃	104	55.8	248930	4636	3.51	
4.32	Butirolactona	C ₄ H ₆ O ₂	86	52.9	114691	4095	3.29	
5.13	Phthalan	C ₈ H ₈ O	120	56.5	108152	11421	2.05	
5.20	2,5-dimetil-4-hidroxi-3 (2H) -furanona	C ₆ H ₈ O ₃	128	75.3	233718	7427	5.88	
5.38	2-hidroxi-gamma-butirolactona	C ₄ H ₆ O ₃	102	67.4	237287	22501	20.72	
5.73	Sydnone, 3- (1-metiletil) -	C ₅ H ₈ N ₂ O ₂	128	87.3	2764	10885	0.59	
6.39	4H-piran-4-ona, 2,3-dihidro-3,5-dihidroxi-6-metil-	C ₆ H ₈ O ₄	144	96.5	108691	1857	11.68	
7.39	2-propanamina, N-metil-N-nitroso-	C ₄ H ₁₀ N ₂ O	102	55.9	1224	13307	1.45	
8.25	Benzofurano, 2,3-dihidro-	C ₈ H ₈ O	120	58.9	229752	82196	0.79	

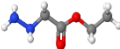


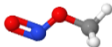
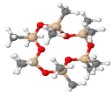
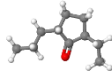
8.69	1,2,4,5-tetroxano, 3,3,6,6-tetrametil-	C ₆ H ₁₂ O ₄	148	52.3	4543	5169	1.53	
9.06	1- (3,6,6-Trimetil-1,6,7,7a-tetrahidrociclopenta [c] piran-1-il) etanona	C ₁₃ H ₁₈ O ₂	206	68.3	194972	140436	0.49	
9.22	1,1,3,3-tetrametil-1,3-disilafenalano	C ₁₅ H ₂₀ Si ₂	256	82.7	78486	162539	1.10	
11.00	2,4,6-Tris (1,1-dimetiletil) -4-metilciclohexa-2,5-dien-1-ona	C ₁₉ H ₃₂ O	276	63.7	215415	148199	0.44	
11.09	4- (2,6,6-trimetilciclohexa-1,3-dienil) but-3-en-2-ona	C ₁₃ H ₁₈ O	190	66.4	210217	11935	3.15	
13.09	Megastigmatrienona	C ₁₃ H ₁₈ O	190	73.4	109824	139838	2.41	
18.23	Yoduro de acetilo	C ₂ H ₃ IO	170	58.2	230508	89653	1.80	
32.51	N-metil-2-isopropoxicarbonilazetidina	C ₈ H ₁₅ NO ₂	157	59.1	283337	32088	1.22	
33.82	1,2,4-triazol-4-amina, N- (2-tienilmetil) -	C ₇ H ₈ N ₄ S	180	52.5	273961	60354	1.54	
41.17	Ferroceno, 1,1 " - [oxibis (metileno)] bis-	C ₂₂ H ₂₂ Fe ₂ O	414	67.5	115805	188807	3.30	
41.79	Fluoruro de metanosulfonilo, trifluoro-	CF ₄ OS	136	69.5	3445	30821	4.78	
44.01	dl-metionina, N - [(4-metilfenil) sulfonilo] -	C ₁₂ H ₁₇ NO ₄ S ₂	303	60.5	189266	108761	28.28	

T R: Tiempo de retención; MW: Peso molecular; P: Probabilidad; Estructura química (Fuente: JSME Molecular Editor).

8.2.4 Extracto acuoso de *A. mexicana* L.

Los resultados del análisis GC-MS del extracto acuoso de las hojas de *A. mexicana* se muestran en la tabla 17. Hidroxiurea se usa en el tratamiento del cáncer y para estimular la producción de hemoglobina fetal en la enfermedad de células falciformes. Ciclohexasiloxano, dodecametil- compuesto con actividad antifúngica y antibacteriana e igualmente presente en *Argemone ochroleuca* planta del mismo género (Moustafa et al.,2013), 2-Etil-5-propilciclopentanona igualmente presente en la cascara de arroz con posibles usos para la producción de precursores de combustibles y productos químicos valiosos (Mohammed et al.,2017). Ciclooctasiloxano, hexadecametil- un alcaloide con actividad antimicrobiana (Jasim et al.,2015), 1,2-Etanodiol es un glicol y un etanodiol tiene un papel como metabolito, toxina y disolvente, Metanosfonato de diisopropilo un fosfonato orgánico.

Tabla 17. Compuestos químicos identificados en los extractos acuosos de *A. mexicana* L.

T R	Nombre del compuesto	Formula molecular	MW	P	#NIST	#ID	Área (%)	Estructura química
4.14	Ácido acético, hidrazino, etil éster	C ₄ H ₁₀ N ₂ O ₂	118	73.3	59536	15190	11.76	
4.15	Hidroxiurea	CH ₄ N ₂ O ₂	76	94.2	247947	1481	10.90	
4.19	Etino, fluoro	C ₂ HF	44	78.7	298804	13761	52.63	
4.26	Nitrito de metilo	CH ₃ NO ₂	61	53.3	170	321	3.09	
5.09	Ciclohexasiloxano, dodecametil-	C ₁₂ H ₃₆ O ₆ Si ₆	444	80	52166	8932	3.12	
6.00	2-etil-5-propilciclopentanona	C ₁₀ H ₁₈ O	154	71.2	145592	75839	4.41	

9.50	Ciclooctasiloxano, hexadecametil-	$C_{16}H_{48}O_8Si_8$	592	93.5	144324	8938	0.34	
9.94	Fenantreno, 3,6-dimetoxi-9,10-dimetil-	$C_{18}H_{18}O_2$	266	61.1	12896	170132	2.35	
10.14	1,2-etanodiol	$C_2H_6O_2$	62	62	229046	563	0.21	
35.03	Ácido acético, hidrazida	$C_2H_6N_2O$	74	67.3	231101	1463	2.11	
43.65	Pirrol, 2-metil-5-fenil-	$C_{11}H_{11}N$	157	66.9	146744	116564	7.91	
47.68	Oxiclورو de fósforo	C_3OP	152	51.9	222490	15714	0.42	
48.56	Metanosfonato de diisopropilo	$C_7H_{17}O_3P$	180	55.9	52095	12789	0.22	
54.55	4H-piran-4-ona, 2,6-difenil-	$C_{17}H_{12}O_2$	248	72.4	11991	25268	0.22	
59.98	Ciclopentano, 1-bromo-2-metoxi-, trans-	C_5H_9BrO	178	50.2	42198	33059	0.30	

T R: Tiempo de retención; MW: Peso molecular; P: Probabilidad; Estructura química (Fuente: JSME Molecular Editor).

De acuerdo a los resultados obtenidos en GC-MS los compuestos con mayor actividad antifúngica ya reportada, se extraen en su mayoría con el solvente de acetato de etilo y metanol, sin embargo, los compuestos con mayor % de área en las muestras de *A. mexicana* se extraen con agua. En la figura 13, se presenta una gráfica donde se muestran los compuestos que ocuparon un mayor % de área en chicalote y a su vez, con que solvente se extrajo.

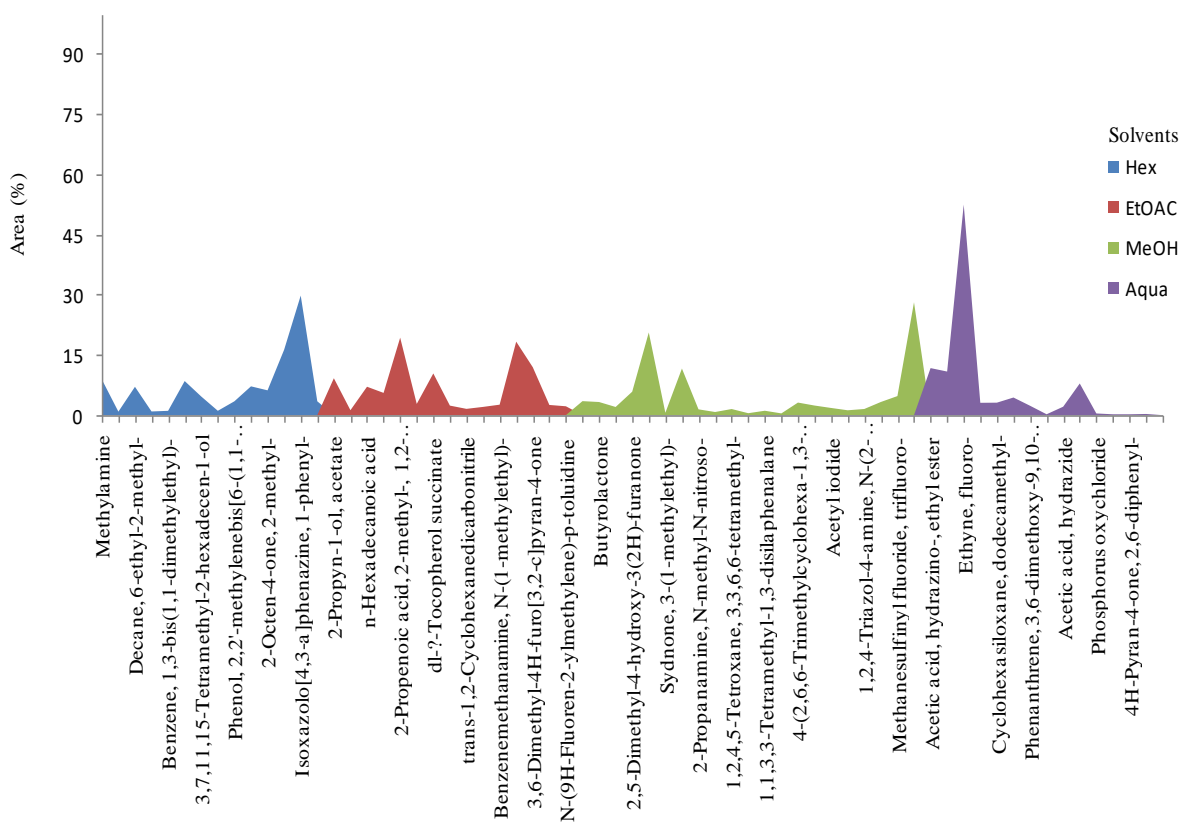


Figura 13. Nivel de porcentaje de área de compuestos de *A. Mexicana* identificados a partir de espectros GC-MS de cuatro solventes diferentes

9. Conclusiones

Debido a que los extractos de acetato de etilo y metanol de las hojas de *A. mexicana* L. presentaron una actividad antifúngica en los fitopatógenos *M. fructicola* (97.44 y 95.11% respectivamente), *C. gloeosporioides* (100%), *F. oxysporum* (100 % de inhibición) y *S. sclerotiorum* (98%) en ambos casos; y a la identificación de compuestos bioactivos con actividad antifúngica como: Fitol; 2-ácido propenoico, 2-metil-, 1,2-etanodiil éster; 1,1,3,3-tetrametil-1,3-disilafenalano; Ciclohexasiloxano, dodecametil-. *A. mexicana* podría ser considerada una fuente natural para la producción de biofungicidas. En el futuro es necesario realizar un análisis metabolómico para proveer un mejor entendimiento en el mecanismo de acción de los compuestos de chicalote contra estos fitopatógenos, así como llevar a cabo un programa de domesticación con el objetivo de contar con suficiente material vegetal, así como evaluar su efectividad *in vivo* y ajustar la concentración y formulación más adecuadas para el uso de *A. mexicana* como un biofungicida efectivo.

10. Referencias

1. Addor, R. W., Kuhn, D. G., & Wright Jr, D. P. (1989). *U.S. Patent No. 4,814,349*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
2. Agrios, G. N. (2005). Introduction to plant pathology. *Elsevier Academic Press Publication*.
3. Alagesaboopathi, C., & Kalaiselvi, N. (2012). Antimicrobial activities of the root, stem and leaf extracts of *Argemone mexicana* L. *Int J Biosci*, 2, 61-68.
4. Anantha Padmanabhan, S., Wyson, J., Marimuthu, S., Saravanan, P., & Anand, D. (2017). Isolation of endophytic bacteria, bioactive compounds and its antiviral activity against herpes simplex virus type-1. *International Journal of Pharmaceutical Sciences and Drug Research*, 9(3), 113-117.
5. Ascencion, L. C., Liang, W. J., & Yen, T. B. (2015). Control of *Rhizoctonia solani* damping-off disease after soil amendment with dry tissues of Brassica results from increase in Actinomycetes population. *Biological Control*, 82, 21-30.
6. Ávalos García A. y Pérez-Urria Carril E. Reduca (Biología). Serie Fisiología Vegetal. 2 (3): 119-145, 2009. (<http://www.revistareduca.es/index.php/biologia/article/view/798/814>).
7. Ávila, A. C., Ochoa, J., Proaño, K., & Martínez, M. C. (2019). Jasmonic acid and nitric oxide protects naranjilla (*Solanum quitoense*) against infection by *Fusarium oxysporum* f. sp. *quitoense* by eliciting plant defense responses. *Physiological and molecular plant pathology*, 106, 129-136.
8. Azmir, J., Zaidul, I. S. M., Rahman, M. M., Sharif, K. M., Mohamed, A., Sahena, F. & Omar, A. K. M. (2013). Techniques for extraction of bioactive compounds from plant materials: A review. *Journal of food engineering*, 117(4), 426-436.
9. Bagiu, R. V., Vlaicu, B., & Butnariu, M. (2012). Chemical composition and in vitro antifungal activity screening of the *Allium ursinum* L.(Liliaceae). *International journal of molecular sciences*, 13(2), 1426-1436.
10. Barkai-Golan, R. (2001). *Postharvest diseases of fruits and vegetables: development and control*. Elsevier.
11. Bautista-Baños, S., Garcia-Dominguez, E., Barrera-Necha, L. L., Reyes-Chilpa, R., & Wilson, C. L. (2003). Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. *Postharvest biology and technology*, 29(1), 81-92.
12. Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop protection*, 22(9), 1087-1092.

13. Bennett, R. N., & Wallsgrave, R. M. (1994). Secondary metabolites in plant defence mechanisms. *New phytologist*, 127(4), 617-633.
14. Bhalke, R. D., & Gosavi, S. A. (2009). Anti-stress and antiallergic effect of Argemone mexicana stems in asthma. *Arch Pharm Sci Res*, 1(1), 127-129.
15. Bienfait, B., Ertl, P. JSME: un editor de moléculas gratuito en JavaScript. *J Cheminform* 5, 24 (2013). <http://biomodel.uah.es/en/DIY/JSME/draw.es.htm>
16. Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L., & Thompson, A. K. (2014). The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (Persea americana Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64, 159-167.
17. Blanco, J. M., Romero, M. C., & Díaz, R. M. J. (2008). Estimación de la diversidad genética en hongos fitopatógenos mediante herramientas moleculares. *Herramientas biotecnológicas en fitopatología*, 167.
18. Boiteux, J., Monardez, C., de los Angeles Fernandez, M., Espino, M., Pizzuolo, P., & Silva, M. F. (2018). Larrea divaricata volatilome and antimicrobial activity against Monilinia fructicola. *Microchemical Journal*, 142, 1-8.
19. Boland, G. J., and Hall, R. "Index of plant hosts of Sclerotinia sclerotiorum." *Canadian Journal of Plant Pathology* 16.2 (1994): 93-108.
20. Bolton, M. D., Thomma, B. P., & Nelson, B. D. (2006). Sclerotinia sclerotiorum (Lib.) de Bary: biology and molecular traits of a cosmopolitan pathogen. *Molecular plant pathology*, 7(1), 1-16.
21. Brahmachari, G., Gorai, D., & Roy, R. (2013). Argemone mexicana: chemical and pharmacological aspects. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 23(3), 559-567.
22. Bubalo, M. C., Vidović, S., Redovniković, I. R., & Jokić, S. (2018). New perspective in extraction of plant biologically active compounds by green solvents. *Food and bioproducts processing*, 109, 52-73.
23. Byrde, R. J. W., & Willetts, H. J. (2013). *The brown rot fungi of fruit: their biology and control*. Elsevier.
24. Calo, L., Garc_ia, I., Gotor, C., Romero, L.C. (2006). Leaf hairs influence phytopathogenic fungus infection and confer an increased resistance when expressing a Trichoderma alpha-1,3-glucanase. *J. Exp. Bot.* 57, 3911e3920.
25. Carnero, K. G., Medina, E. L., Salvatierra, C. Z., Castillo, J. D. L. C., & Miranda, W. M. (2013). Efecto biofungicida de Trichoderma harzianum y de extractos de Eucalyptus globulus, Rosmarinus officinalis y Ricinus communis sobre Rhizoctonia solani. *Revista REBIOLEST*, 1(1), 43-48.
26. Celis, C., García, A., Sequeda, G., Mendez, G., & Torrenegra, R. (2011). Antimicrobial activity of extracts obtained from Anacardium excelsum againsts some pathogenic microorganisms. *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 249-257.

27. Chuang, P. H., Lee, C. W., Chou, J. Y., Murugan, M., Shieh, B. J., & Chen, H. M. (2007). Anti-fungal activity of crude extracts and essential oil of *Moringa oleifera* Lam. *Bioresource technology*, 98(1), 232-236.
28. Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad *Argemone mexicana* L. Chicalote. Available online: <http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/papaveraceae/argemone-mexicana/fichas/ficha.htm>. (Acceso 16 October 2019).
29. Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clinical microbiology reviews*, 12(4), 564-582.
30. Damjanović, B., Skala, D., Baras, J., & Petrović-Djakov, D. (2006). Isolation of essential oil and supercritical carbon dioxide extract of *Juniperus communis* L. fruits from Montenegro. *Flavour and fragrance journal*, 21(6), 875-880.
31. Das, S., & Sukul, N. C. (1988). Nematicidal effect of the oil from the seeds of *Argemone mexicana*. *Environment and Ecology*, 6(1), 194-197.
32. De Rodríguez, D. J., 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(1), 960-966.
33. De Rodríguez, D. J., Salas-Méndez, E. D. J., Rodríguez-García, R., Hernández-Castillo, F. D., Díaz-Jiménez, M. L. V., Sáenz-Galindo, A., ... & Carrillo-Lomelí, D. A. (2017). Antifungal activity in vitro of ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Flourensia* spp. against postharvest fungi. *Industrial crops and products*, 107, 499-508.
34. De Silva, D. D., Crous, P. W., Ades, P. K., Hyde, K. D., & Taylor, P. W. (2017). Life styles of *Colletotrichum* species and implications for plant biosecurity. *Fungal Biology Reviews*, 31(3), 155-168.
35. Di Liberto, M. G., Stegmayer, M. I., Svetaz, L. A., & Derita, M. G. (2019). Evaluation of Argentinean medicinal plants and isolation of their bioactive compounds as an alternative for the control of postharvest fruits phytopathogenic fungi. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, 29(5), 686-688.
36. Dinh, S. Q., Chongwungse, J., Pongam, P., & Sangchote, S. (2003). Fruit infection by *Colletotrichum gloeosporioides* and anthracnose resistance of some mango cultivars in Thailand. *Australasian Plant Pathology*, 32(4), 533-538.
37. Dixon, R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. *Nature*, 411(6839), 843-847.
38. Emery, K. M., Michailides, T. J., & Scherm, H. (2000). Incidence of latent infection of immature peach fruit by *Monilinia fructicola* and relationship to brown rot in Georgia. *Plant Disease*, 84(8), 853-857.
39. Espinosa-García, F. J., & Díaz-Pérez, R. (1996). El uso campesino de plantas arvenses como forraje en el valle de México. *ETNOECOLOGIA*, VOL. III NO. 4-5, 88.

40. Feng, G., Zhang, X. S., Zhang, Z. K., Ye, H. C., Liu, Y. Q., Yang, G. Z., ... & Zhang, J. X. (2019). Fungicidal activities of camptothecin semisynthetic derivatives against *Colletotrichum gloeosporioides* in vitro and in mango fruit. *Postharvest biology and technology*, 147, 139-147.
41. Ferdes, M., Al Juhaimi, F., Özcan, M. M., & Ghafoor, K. (2017). Inhibitory effect of some plant essential oils on growth of *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae*, *Mucor pusillus* and *Fusarium oxysporum*. *South African Journal of Botany*, 113, 457–460.
42. Fiehn, O., Kopka, J., Dörmann, P., Altmann, T., Trethewey, R. N., & Willmitzer, L. (2000). Metabolite profiling for plant functional genomics. *Nature biotechnology*, 18(11), 1157-1161.
43. Finney, D. J. (1952). *Probit analysis: a statistical treatment of the sigmoid response curve*. Cambridge university press, cambridge.
44. Fravel, D., Olivain, C., & Alabouvette, C. (2003). *Fusarium oxysporum* and its biocontrol. *New phytologist*, 157(3), 493-502.
45. Gacche R.N, Shaikh RU, Pund M.M. (2011). *In vitro* evaluation of anticancer and antimicrobial activity of selected medicinal plants from Ayurveda. *Asian J Trad Med* 6: 127-133.
46. Gatto, M. A., Ippolito, A., Linsalata, V., Casciarano, N. A., Nigro, F., Vanadia, S., & Di Venere, D. (2011). Activity of extracts from wild edible herbs against postharvest fungal diseases of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*, 61(1), 72-82
47. Ghaneian, M. T., Ehrampoush, M. H., Jebali, A., Hekmatimoghaddam, S., & Mahmoudi, M. (2015). Antimicrobial activity, toxicity and stability of phytol as a novel surface disinfectant. *Environmental Health Engineering and Management Journal*, 2(1), 13-16.
48. Granados-Chinchilla, F., Villegas, E., Molina, A., & Arias, C. (2016). Composition, chemical fingerprinting and antimicrobial assessment of Costa Rican cultivated guavas (*Psidium friedrichsthalianum* (O. Berg) Nied. and *Psidium guajava* L.) essential oils from leaves and fruits. *Natural Products Chemistry & Research*.
49. Guerrero-Rodríguez, E., Solís-Gaona, S., Hernández-Castillo, F. D., Flores-Olivas, A., Sandoval-López, V., & Jasso-Cantú, D. (2007). Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* DC en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y *Sacc.* y *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. *Revista mexicana de Fitopatología*, 25(1), 48-53.
50. Gullino, M. L., Minuto, A., Gilardi, G., & Garibaldi, A. (2002). Efficacy of azoxystrobin and other strobilurins against *Fusarium* wilts of carnation, cyclamen and Paris daisy. *Crop Protection*, 21(1), 57-61.
51. Halama, P., & Van Haluwin, C. (2004). Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids. *BioControl*, 49(1), 95-107.
52. Halket, J. M., & Zaikin, V. G. (2003). Derivatization in mass spectrometry—1. Silylation. *European Journal of Mass Spectrometry*, 9(1), 1-21.

53. Hernández Lauzardo, A. N., Bautista Baños, S., & Velázquez del Valle, M. G. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 30(2).
54. 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. Vitivinic.*, Vol. (33).
55. Hernández, M., Murace, M., Ringuelet, J., Petri, I., Gallo, D., & Arambarri, A. (2013). Effect of aqueous and alcohol extracts of *Phytolacca tetramera* (Phytolaccaceae) leaves on *Colletotrichum gloeosporioides* (Ascomycota) Efecto de los extractos acuoso y alcohólico de la hoja de *Phytolacca tetramera* (Phytolaccaceae) sobre *Colletotrichum*... *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 48(2), 201-209
56. Hernández, M., Murace, M., Ringuelet, J., Petri, I., Gallo, D., & Arambarri, A. (2013). Effect of aqueous and alcohol extracts of *Phytolacca tetramera* (Phytolaccaceae) leaves on *Colletotrichum gloeosporioides* (Ascomycota) Efecto de los extractos acuoso y alcohólico de la hoja de *Phytolacca tetramera* (Phytolaccaceae) sobre *Colletotrichum*... *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica*, 48(2), 201-209.
57. Hernández-Lauzardo, A. N., Bautista-Baños, S., Velázquez-del Valle, M. G., & Trejo-Espino, J. L. (2006). Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., causal agent of *Rhizopus* rot disease of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1), 65-69.
58. Hong, C., & Michailides, T. J. (1999). Mycelial growth, sporulation, and survival of *Monilinia fructicola* in relation to osmotic potential and temperature. *Mycologia*, 91(5), 871-876.
59. Huamán Campos, N. C. (2015). Biotoxicidad del extracto hidroalcohólico de las hojas de *Lupinus mutabilis* "tarwi" sobre larvas de *Culex quinquefasciatus*.
60. Ishikawa, S. (2004). Simple diagnosis using ethanol immersion of strawberry plants with latent infection by *Colletotrichum acutatum*, *Dendrophoma obscurans*, and *Fusarium oxysporum* f. sp. *fragariae*. *Journal of General Plant Pathology*, 70(5), 249-255.
61. Isman, M. B. (2000). Plant essential oils for pest and disease management. *Crop protection*, 19(8-10), 603-608.
62. Jasim, H., Hussein, A. O., Hameed, I. H., & Kareem, M. A. (2015). Characterization of alkaloid constitution and evaluation of antimicrobial activity of *Solanum nigrum* using gas chromatography mass spectrometry (GC-MS). *Journal of Pharmacognosy and Phytotherapy*, 7(4), 56-72.
63. Jiménez, G. S., Ducoing, H. P., & Sosa, M. R. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, 21(3), 355-363.
64. Khlif, M., Bogreau, H., Michel-Nguyen, A., Ayadi, A., & Ranque, S. (2010). Trailing or paradoxical growth of *Candida albicans* when exposed to caspofungin is not associated with microsatellite genotypes. *Antimicrobial agents and chemotherapy*, 54(3), 1365-1368.

65. Koo, I., Kim, S., Shi, B., Lorkiewicz, P., Song, M., McClain, C., & Zhang, X. (2016). *Elder: A compound identification tool for gas chromatography mass spectrometry data*. *Journal of Chromatography A*, 1448, 107–114.
66. Kordali, S., Cakir, A., Akcin, T. A., Mete, E., Akcin, A., Aydin, T., & Kilic, H. (2009). Antifungal and herbicidal properties of essential oils and n-hexane extracts of *Achillea gypsicola* Hub-Mor. and *Achillea biebersteinii* Afan.(Asteraceae). *Industrial crops and products*, 29(2-3), 562-570.
67. Kuru, M., Adugna, G., & Berecha, G. (2016). The importance of avocado (*Persea americana* Mill.) fruits anthracnose and factors influencing the disease in Mana district, south-western Ethiopia. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 49(7-8), 157-166.
68. Lagrouh, F., Dakka, N., & Bakri, Y. (2017). The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal de mycologie medicale*, 27(3), 303-311.
69. Lagunes Tejeda, A., & Vázquez Navarro, M. (1994). *El bioensayo en el manejo de insecticidas y acaricidas* (No. 04; CP, SB951. 6 L3.). Colegio de Postgraduados. Centro de Entomología y Acarología.
70. Leong, S. K., Latiffah, Z., & Baharuddin, S. (2009). Molecular characterization of *Fusarium oxysporum* F. sp. *Cubense* of banana. *American Journal of Applied Sciences*, 6(7), 1301-1307.
71. Li, S. G., Zhou, B. G., Li, M. Y., Liu, S., Hua, R. M., & Lin, H. F. (2017). Chemical composition of *Illicium verum* fruit extract and its bioactivity against the peach–potato aphid, *Myzus persicae* (Sulzer). *Arthropod-Plant Interactions*, 11(2), 203-212.
72. Lisec, J., Schauer, N., Kopka, J., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2006). Gas chromatography mass spectrometry–based metabolite profiling in plants. *Nature Protocols*, 1(1), 387–396. doi:10.1038/nprot.2006.59
73. Liu, X. P., Fan, S. R., Bai, F. Y., Li, J., & Liao, Q. P. (2009). Antifungal susceptibility and genotypes of *Candida albicans* strains from patients with vulvovaginal candidiasis. *Mycoses*, 52(1), 24-28.
74. Lizcano González, M. C. (2007). Evaluation of the antifungal activity of thyme extract (*thymus vulgaris*) against *botrys cinerea*, *fusarium oxysporum* and *sclerotinia sclerotiorum*. Degree, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia.
75. Martínez Mendoza, J. L., Ochoa Fuentes, Cerna Chávez, E. D., Delgado Ortiz, J. C. (2015). Evaluación in vitro de extractos vegetales para el control de *Sclerotinia cepivorum* B. y *Sclerotinia sclerotiorum* B.
76. Martini, C., & Mari, M. (2014). *Monilinia fructicola*, *Monilinia laxa* (*Monilinia rot*, brown rot). In *Postharvest Decay* (pp. 233-265). Academic Press.
77. Marutescu, L., Popa, M., Saviuc, C., Lazar, V., & Chifiriuc, M. C. (2017). Botanical pesticides with virucidal, bactericidal, and fungicidal activity. In *New pesticides and soil sensors* (pp. 311-335).

78. Matny, O. N., Abdul-Karim, E. K., Naemah, R. A., & Al-Ani, R. A. (2014). Activity of propolis and *Boswellia* sp. resins extract against *Sclerotinia sclerotiorum* causative agent of white rot disease of *Phaseolus vulgaris* and *Daucus carota* under storage conditions. *J. Exp. Biol. Agric. Sci*, 2, 65-71.
79. McBride, H. M. (2006). Neuspiel, M.; Wasiak, S. Mitochondria: more than just a powerhouse. *Curr. Biol*, 16(14), 551-560.
80. Melariri, P., Campbell, W., Etusim, P., & Smith, P. (2012). In vitro and in vivo antimalarial activity of linolenic and linoleic acids and their methyl esters. *Adv Stud Biol*, 4(7), 333-49.
81. Mesa-Vanegas, A. M., Zapata-Uribe, S., Arana, L. M., Zapata, I. C., Monsalve, Z., & Rojano, B. (2015). Actividad antioxidante de extractos de diferente polaridad de *Ageratum conyzoides* L. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 14(1), 1-10.
82. Michielse, C. B., & Rep, M. (2009). Pathogen profile update: *Fusarium oxysporum*. *Molecular plant pathology*, 10(3), 311-324.
83. Mohammed, I. Y., Lim, C. H., Kazi, F. K., Yusup, S., Lam, H. L., & Abakr, Y. A. (2017). Co-pyrolysis of rice husk with underutilized biomass species: a sustainable route for production of precursors for fuels and valuable chemicals. *Waste and biomass valorization*, 8(3), 911-921.
84. Moreno Ramírez, K. (2013). Evaluación de efectividad biológica de extractos de nogal *Carya illinoensis koch*, para el control de hongos del follaje *Alternaria solani* y *Monilia fructicola* Honey *in vitro*.
85. Moslem, M. A., & El-Kholie, E. M. (2009). Effect of neem (*Azadirachta indica* A. Juss) seeds and leaves extract on some plant pathogenic fungi. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 12(14), 1045.
86. Mota, T. R., Linhares, H. V., Araújo-Filho, J. H., Veras, D. M., Costa, H. P., Souza, C. M. & Martins, T. F. (2019). Protein extract from *Cereus jamacaru* (DC.) inhibits *Colletotrichum gloeosporioides* growth by stimulating ROS generation and promoting severe cell membrane damage. *Microbial pathogenesis*, 130, 71-80.
87. Moustafa, M. F., Alamri, S. A., Taha, T. H., & Alrumman, S. A. (2013). In vitro antifungal activity of *Argemone ochroleuca* Sweet latex against some pathogenic fungi. *African Journal of Biotechnology*, 12(10).
88. Naga Lakshmi, M., Pavithra, S., Ponmozhi, V., Jaganathan, J., Karthik, L., & Shree Devi, M. S. (2015). Anti-bacterial activity of selected medicinal plants.
89. O'Connell, R. J., Thon, M. R., Hacquard, S., Amyotte, S. G., Kleemann, J., Torres, M. F., ... & Altmüller, J. (2012). Lifestyle transitions in plant pathogenic *Colletotrichum* fungi deciphered by genome and transcriptome analyses. *Nature genetics*, 44(9), 1060-1065.
90. Oerke, E. C. (2006). Crop losses to pests. *The Journal of Agricultural Science*, 144(1), 31-43.
91. Ogunlesi, M., Okiei, W., Ofor, E., & Osibote, A. E. (2009). Analysis of the essential oil from the dried leaves of *Euphorbia hirta* Linn (*Euphorbiaceae*), a potential medication for asthma. *African Journal of Biotechnology*, 8(24).

92. Omoregie, G. O., Ovuakporie-Uvo, O., & Idu, M. (2018). Phyto-composition and antimicrobial activities of the ethanol seed extracts of *Buchholzia coriacea*. *African Journal of Pharmacology and Therapeutics*, 7(2).
93. Ortuño Torres, M. E. (2012). *Determinación de la Actividad Biológica del Extracto Acuoso de Saúco Sambucus nigra L. como Repelente y/o Insecticida en Lasius niger L* (Bachelor's thesis).
94. Pansera, M. R., Pauletti, M., Fedrigo, C. P., Sartori, V. C., & da Silva Ribeiro, R. T. (2013). Utilization of essential oil and vegetable extracts of *Salvia officinalis* L. in the control of rot sclerotinia in lettuce. *Applied Research & Agrotechnology*, 6(2), 83-88.
95. Patzke, H., & Schieber, A. (2018). Growth-inhibitory activity of phenolic compounds applied in an emulsifiable concentrate-ferulic acid as a natural pesticide against *Botrytis cinerea*. *Food Research International*, 113, 18-23.
96. Pazolini, K., dos Santos, I., Giaretta, R. D., Marcondes, M. M., Reiner, D. A., & Citadin, I. (2016). The use of brassica extracts and thermotherapy for the postharvest control of brown rot in peach. *Scientia Horticulturae*, 209, 41–46.
97. Pei, Q., Li, Y., Ge, X., & Tian, P. (2019). Multipath effects of berberine on peach Brown rot fungus *Monilinia fructicola*. *Crop protection*, 116, 92-100.
98. Pergomet, J. L., Di Liberto, M. G., Derita, M. G., Bracca, A. B., & Kaufman, T. S. (2018). Activity of the pterophyllins 2 and 4 against postharvest fruit pathogenic fungi. Comparison with a synthetic analog and related intermediates. *Fitoterapia*, 125, 98-105.
99. Purdy, L.H. (1979). "Sclerotinia sclerotiorum: history, diseases and symptomatology, host range, geographic distribution, and impact." *Phytopathology* 69.8: 875-880.
100. Rahman, M. M., Alam, M. J., Sharmin, S. A., Rahman, M. M., Rahman, A., & Alam, M. F. (2009). In vitro antibacterial activity of *Argemone mexicana* L (Papaveraceae). *CMU J Nat Sci*, 8, 77-84.
101. Raja Rajeswari, N., RamaLakshmi, S., & Muthuchelian, K. (2011). GC-MS analysis of bioactive components from the ethanolic leaf extract of *Canthium dicoccum* (Gaertn.) Teijsm & Binn. *J Chem Pharm Res*, 3, 792-798.
102. Robson, M. G. (1988). *Some aspects of calcium nutrition on peach growth and postharvest fruit quality* (Doctoral dissertation, Rutgers University).
103. Rodríguez Pedroso, A. T., Ramírez Arrebato, M. A., Bautista Baños, S., Cruz Triana, A., & Rivero, D. (2012). Antifungal activity of *Acacia farnesiana* extracts on the in vitro growth of *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*.
104. Rodríguez, Aida T.; Morales, Daysi; Ramírez, M. A. (2000). Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de hongos fitopatógenos. *Cultivos Tropicales*, 79-82.
105. Rodriguez, R. J., Low, C., Bottema, C. D., & Parks, L. W. (1985). Multiple functions for sterols in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Lipids and Lipid Metabolism*, 837(3), 336-343.

106. Roessner, U., Luedemann, A., Brust, D., Fiehn, O., Linke, T., Willmitzer, L., & Fernie, A. R. (2001). Metabolic profiling allows comprehensive phenotyping of genetically or environmentally modified plant systems. *The Plant Cell*, 13(1), 11-29.
107. Romanazzi, G., Lichter, A., Gabler, F. M., & Smilanick, J. L. (2012). Recent advances on the use of natural and safe alternatives to conventional methods to control postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 63(1), 141-147.
108. Saha, S.; Walia, S.; Kundu, A.; Kumar, B.; Joshi, D. (2013). Antifungal acetylinic thiophenes from *Tagetes minuta*: potential biopesticide. *J Appl Bot Food Qual.*,85(2), 207.
109. Sakthivadivel, M., & Thilagavathy, D. (2003). Larvicidal and chemosterilant activity of the acetone fraction of petroleum ether extract from *Argemone mexicana* L. seed. *Bioresource technology*, 89(2), 213-216.
110. Schäfer, H., & Wink, M. (2009). Medicinally important secondary metabolites in recombinant microorganisms or plants: progress in alkaloid biosynthesis. *Biotechnology Journal: Healthcare Nutrition Technology*, 4(12), 1684-1703.
111. Scheuerell, S., & Mahaffee, W. (2002). Compost tea: principles and prospects for plant disease control. *Compost Science & Utilization*, 10(4), 313-338.
112. 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 and Applications*, 7(1), 14.
113. Serrano, M., Coluccia, F., Torres, M., L'Haridon, F., Metraux, J.P., (2014). The cuticle and plant defense to pathogens. *Front. Plant Sci.* 5, 274.
114. Sharma, S., Sharma, M. C., & Kohli, D. V. (2010). Pharmacological screening effect of ethanolic and methanolic extract of fruits of medicinally leaves. *Digest journal of nanomaterials and Biostructures*, 5(1), 229-232.
115. Shettima, A., Karumi, Y., Sodipo, O., Usman, H., & Tijjani, M. (2013). Gas Chromatography-Mass Spectrometry (GC-MS) analysis of bioactive components of ethyl acetate root extract of *Guiera senegalensis* JF Gmel. *Gas*, 3(3).
116. Sibanda, T., Selvarajan, R., & Tekere, M. (2017). Synthetic extreme environments: overlooked sources of potential biotechnologically relevant microorganisms. *Microbial biotechnology*, 10(3), 570-585.
117. Silva, M. P., Piazza, L. A., López, D., Rivilli, M. J. L., Turco, M. D., Cantero, J. J. & Scopel, A. L. (2012). Phytotoxic activity in *Flourensia campestris* and isolation of (-)-hamanasic acid A as its active principle compound. *Phytochemistry*, 77, 140-148.
118. Simbula, G.; Glascott Jr, P. A.; Akita, S.; Hoek, J. B.; Farber, J. L. (1997). Two mechanisms by which ATP depletion potentiates induction of the mitochondrial permeability transition. *Am J Physiol Cell Physiol.*,273(2), 479-488.

119. Slaghenaufi, D., Perello, M. C., Marchand, S., & de Revel, G. (2016). Quantification of megastigmatrienone, a potential contributor to tobacco aroma in spirits. *Food chemistry*, 203, 41-48.
120. Smith, R. M. (2003). Before the injection—modern methods of sample preparation for separation techniques. *Journal of chromatography A*, 1000(1-2), 3-27.
121. Smith-White, J. L., Gunn, L. V., & Summerell, B. A. (2001). Analysis of diversity within *Fusarium oxysporum* populations using molecular and vegetative compatibility grouping. *Australasian Plant Pathology*, 30(2), 153-157.
122. Srivastava, A., & Srivastava, M. (1998). Fungi toxic effect of some medicinal plants (on some fruit pathogens). *Philippine Journal of Science (Philippines)*.
123. Srivastava, S., Kadooka, C., & Uchida, J. Y. (2018). *Fusarium* species as pathogen on orchids. *Microbiological research*, 207, 188-195.
124. Städler, E., Rosenthal, G. A., & Berenbaum, M. R. (1992). Behavioral responses of insects to plant secondary compounds. *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites: Ecological and Evolutionary Processes*, 2, 45-88.
125. Städler, E., Rosenthal, G. A., & Berenbaum, M. R. (2012). Behavioral responses of insects to plant secondary compounds. *Herbivores: Their Interactions with Secondary Plant Metabolites: Ecological and Evolutionary Processes*, 2, 45-88.
126. Stein, S. E., & Scott, D. R. (1994). Optimization and testing of mass spectral library search algorithms for compound identification. *Journal of the American Society for Mass Spectrometry*, 5(9), 859-866.
127. Strange, R.N., Scott, P.R., (2005). Plant disease: a threat to global food security. *Ann. Rev. Phytopathol.* 43, 83-116.
128. Sun, F., Sun, S., Zhu, L., Duan, C., & Zhu, Z. (2019). Confirmation of *Fusarium oxysporum* as a causal agent of mung bean wilt in China. *Crop protection*, 117, 77-85.
129. Terao, S., & Maki, Y. (1989). *U.S. Patent No. 4,857,516*. Washington, DC: U.S. Patent and Trademark Office.
130. Tian, J., Ban, X., Zeng, H., He, J., Chen, Y., & Wang, Y. (2012). The mechanism of antifungal action of essential oil from dill (*Anethum graveolens* L.) on *Aspergillus flavus*. *PloS one*, 7(1).
131. Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., & Polasky, S. (2002). Agricultural sustainability and intensive production practices. *Nature*, 418(6898), 671.
132. Tollrian, R., & Harvell, C. D. (Eds.). (1999). *The ecology and evolution of inducible defenses*. Princeton University Press.
133. Turkmen, N., Sari, F., & Velioglu, Y. S. (2006). Effects of extraction solvents on concentration and antioxidant activity of black and black mate tea polyphenols determined by ferrous tartrate and Folin–Ciocalteu methods. *Food chemistry*, 99(4), 835-841.

134. Ullah, R., Bakht, J., Shafi, M., & Shah, M. R. (2018). GC-MS profile of bioactive compounds from medicinally important *Periploca hydaspidis*. *Pakistan journal of pharmaceutical sciences*, 31(5).
135. UNAM. (2009). Biblioteca Digital de la medicina tradicional mexicana. Recuperado el 4 de marzo del 2020, de Biblioteca Digital de la medicina tradicional mexicana:<http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=Argemone%20mexicana&id=7515>
136. Usall, J., Casals, C., Sisquella, M., Palou, L., & De Cal, A. (2015). Alternative technologies to control postharvest diseases of stone fruits. *Stewart Postharvest Review*, 11(4).
137. Valenzuela, N. L., Ángel, N., Ortiz, T., Rosas, A., Santos, M. O., & García, C. F. O. (2013). Potencial antifúngico de extractos de cuatro especies vegetales sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha. *Revista Venezolana de Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4(1), 047-062.
138. Van Leeuwen, G. C. M., & Van Kesteren, H. A. (1998). Delineation of the three brown rot fungi of fruit crops (*Monilinia* spp.) on the basis of quantitative characteristics. *Canadian Journal of Botany*, 76(12), 2042-2050.
139. Vásquez Covarrubias, D. A., Belmont, R. M., Pérez, A. J., & 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).
140. Walker, G. M., & White, N. A. (2017). Introduction to fungal physiology. *Fungi: biology and applications*, 1-35.
141. Wang, W., Ben-Daniel, B. H., & Cohen, Y. (2004). Control of plant diseases by extracts of *Inula viscosa*. *Phytopathology*, 94(10), 1042-1047.
142. Wang, Y. N., Wang, H. X., Shen, Z. J., Zhao, L. L., Clarke, S. R., Sun, J. H., ... & Shi, G. L. (2009). Methyl palmitate, an acaricidal compound occurring in green walnut husks. *Journal of economic entomology*, 102(1), 196-202.
143. Wharton, P.S., Schilder, A.C. (2008). Novel infection strategies of *Colletotrichum acutatum* on ripe blueberry fruit. *Plant Pathol.* 57, 122e134.
144. Wink, M. (2008). Plant secondary metabolism: diversity, function and its evolution. *Natural Product Communications*, 3(8), 1934578X0800300801.
145. Wu, x. Z., Cheng, A. X., Sun, I. M., & Lou, H. X. (2008). Effect of plagiocin E, an antifungal macrocyclic bis (bibenzyl), on cell wall chitin synthesis in *Candida albicans* 1. *Acta Pharmacologica Sinica*, 29(12), 1478-1485.
146. Wu, X. Z., Cheng, A. X., Sun, L. M., Sun, S. J., & Lou, H. X. (2009). Plagiocin E, an antifungal bis (bibenzyl), exerts its antifungal activity through mitochondrial dysfunction-induced reactive oxygen species accumulation in *Candida albicans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 1790(8), 770-777.

147. Yadav, S. A., Ramalingam, S., Jebamalaairaj, A., Subban, R., & Sundaram, K. M. (2016). Biochemical fingerprint and pharmacological applications of *Barleria noctiflora* Lf leaves. *Journal of Complementary and Integrative Medicine*, 13(4), 365-376.
148. Yu, X., Zhao, M., Liu, F., Zeng, S., & Hu, J. (2013). Identification of 2, 3-dihydro-3, 5-dihydroxy-6-methyl-4H-pyran-4-one as a strong antioxidant in glucose–histidine Maillard reaction products. *Food research international*, 51(1), 397-403.
149. Zaker, M. (2016). Natural plant products as eco-friendly fungicides for plant diseases control-A Review. *The Agriculturists*, 14(1), 134-141.
150. Zaynab, M., Fatima, M., Abbas, S., Sharif, Y., Umair, M., Zafar, M. H., & Bahadar, K. (2018). Role of secondary metabolites in plant defense against pathogens. *Microbial pathogenesis*, 124, 198-202.
151. Zekeya, N., Chacha, M., Shahada, F., & Kidukuli, A. (2014). Analysis of phytochemical composition of *Bersama abyssinica* by gas chromatography-mass spectrometry. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 3(4), 246-252.
152. Zorov, D. B., Krasnikov, B. F., Kuzminova, A. E., Vysokikh, M. Y., & Zorova, L. D. (1997). Mitochondria revisited. Alternative functions of mitochondria. *Bioscience reports*, 17(6), 507-520.