



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Agropecuarias

INGENIERÍA EN AGRONOMÍA PARA LA PRODUCCIÓN
SUSTENTABLE

TESIS DE LICENCIATURA

Aplicación foliar de diterpenos de *Croton morifolius* para el control de *Botrytis cinerea*
en el cultivo de rosa.

Para obtener el título de:

Ingeniero Agrónomo para la Producción Sustentable

PRESENTA

Oscar Fragoso Palafox

Directora de Tesis:

Dra. Iridiam Hernández Soto

Codirector de Tesis:

Dr. René Velázquez Jiménez

Asesores de Tesis:

Dra. Mariana Saucedo García

Dr. Juan Ocampo López

Ing. Néstor Gildardo León Islas

Tulancingo de Bravo, Hgo., México, a 17 junio de 2026.



Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo

Instituto de Ciencias Agropecuarias

Institute of Agricultural Sciences

Área Académica de Ciencias Agrícolas y Forestales

Academic Area of Agricultural and Forestry Sciences

Tulancingo de Bravo, Hidalgo., a 17 de junio de 2026

Asunto: Autorización de impresión

Mtra. Ojuky del Rocío Islas Maldonado

Directora de Administración Escolar de la UAEH

Por este conducto y con fundamento en el Título Cuarto, Capítulo I, Artículo 40 del Reglamento de Titulación, le comunico que el jurado que le fue asignado a él pasante de Licenciatura en Ingeniería en Agronomía Para La Producción Sustentable, **Oscar Fragoso Palafox**, quien presenta el trabajo de Tesis denominado **“Aplicación foliar de diterpenos de *Croton morifolius* para el control de *Botrytis cinerea* en el cultivo de rosa”**, que después de revisarlo en reunión de sinodales, ha decidido autorizar la impresión de este, hechas las correcciones que fueron acordadas.

A continuación, se anotan las firmas de conformidad de los miembros del jurado:

PRESIDENTE Dr. Juan Ocampo López

SECRETARIO Ing. Néstor Gildardo León Islas

VOCAL 1 Dra. Iridiam Hernández Soto

VOCAL 2 Dr. René Velazquez Jiménez

VOCAL 3 Dra. Mariana Saucedo García

[Handwritten signatures of the jury members]
Mariana S. G

Sin otro particular por el momento, me despido de usted.

Atentamente
“Amor, Orden y Progreso”

[Handwritten signature of Dr. Sergio Rubén Pérez Ríos]

Dr. Sergio Rubén Pérez Ríos
Coordinador de la Licenciatura en
Ingeniería en Agronomía Para La Producción Sustentable



“Amor, Orden y Progreso”



Av. Universidad No. 133, Col. San Miguel Huatengo, Santiago
Tulantepec. C.P. 43775. Hidalgo, Mexico.
Teléfono: 7717172000 Ext. 42073
profe_5566@uaeh.edu.mx

uaeh.edu.mx

Agradecimientos

A la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, por permitirme realizar mis estudios desde la Preparatoria Número Uno, y al Instituto de Ciencias Agropecuarias, por permitirme cursar la carrera profesional de Ingeniería en Agronomía para la Producción Sustentable.

A la Dra. Iridiam Hernández Soto, directora de esta tesis, le expreso mi más sincero agradecimiento por su invaluable apoyo, por el significativo enriquecimiento académico brindado a lo largo de la ingeniería, por la confianza que mantuvo en mí durante el desarrollo de esta investigación. Asimismo, agradezco profundamente su orientación, asesoría y acompañamiento constante a lo largo de mi proceso de titulación.

Al Dr. Antonio de Jesús Cenobio Galindo, por su valioso acompañamiento profesional, por la calidez y empatía con las que guió mi proceso y por su constante motivación, que fue esencial para seguir adelante; asimismo, por su disposición a facilitar materiales y a utilizar equipos de laboratorio.

A la Dra. Mariana Saucedo García, por su apoyo en el desarrollo de esta investigación, así como por la facilitación de equipo de laboratorio. Agradezco profundamente su disposición a compartir sus conocimientos y su destacada labor como docente durante mi formación en la carrera.

Al Ing. Néstor Gildardo León Islas, por los valiosos conocimientos transmitidos a lo largo de esta investigación, por la paciencia y el acompañamiento constante en los momentos más críticos del laboratorio y por tus recomendaciones, que fueron clave para la culminación de este trabajo.

Al Dr. Juan Ocampo López, por su invaluable apoyo, así como por la provisión de reactivos y equipos de laboratorio. Agradezco también su asesoría y disposición para resolver dudas a lo largo de la investigación, además de la oportunidad de integrarme a su laboratorio, a cargo del área de histología.

Al Dr. René Velázquez Jiménez, por la confianza y por facilitar las fracciones que resultaron fundamentales para el desarrollo de esta investigación; sin él, no habría sido posible llevar a cabo este trabajo ni generar conocimientos relevantes en el ámbito agronómico.

A la Mtra. María Guadalupe Ramírez Muñoz y Annie Alessandra Rebollar, a quienes admiro y aprecio por su increíble trabajo en histología. Gracias por guiarme en cada procedimiento y por resolver mis dudas con paciencia. Contribuyeron enormemente a mi aprendizaje.

A la Dra. Eliazar Aquino Torres, quien me brindó apoyo incondicional en el laboratorio de química agrícola, proporcionándome los materiales y equipos necesarios para realizar esta investigación. Agradezco ampliamente su destacada experiencia docente en mi formación académica.

Al Dr. Cristián Raziél Delgado Gonzáles, por haber sido mi maestro en asignaturas fundamentales de la carrera, transmitiéndome conocimientos valiosos que fortalecieron mi perfil profesional y brindándome siempre su apoyo, incluso en la explicación más mínima de cualquier duda que se me presentara en esta investigación.

Dedicatoria

A mi papá José Fragoso Franco y a mi mamá María Isabel Palafox Valencia, quienes me han forjado para ser alguien en la vida y llegar hasta este grado, gracias por depositar su confianza y por nunca dejarme solo; siempre estaré en deuda con ustedes por todo el sacrificio que hacen para mantenerme en pie en mis peores batallas.

A Michelle Martínez Avalos, mi compañera de vida, por brindarme la oportunidad de compartir cada momento a su lado, especialmente en los días de mayor carga académica y laboral. Su compromiso, lealtad y apoyo constante han sido invaluableles en este camino. Gracias por ayudarme a ver los momentos más difíciles desde otra perspectiva y por impulsarme a transformarlos en oportunidades para seguir adelante.

Índice de contenido

Resumen.....	1
1. Introducción.....	2
2. Antecedentes	4
3. Marco teórico	5
3.1 Manejo agronómico.....	5
3.1.1. Descripción del rosal	5
3.1.2. Propagación de las rosas.....	5
3.1.3. Densidad de plantación de las rosas.....	5
3.1.4. Riego	5
3.1.5. Condiciones ambientales	5
3.1.6. Nutrición de las rosas	6
3.1.7. Poda de rosas	7
3.2 Diterpenoides del género <i>Croton</i>	7
3.3 Actividad antifúngica y mecanismo de acción de los diterpenos.....	7
3.4 Importancia del cultivo de rosa y problemática fitosanitaria	8
3.5 <i>Botrytis cinerea</i>	8
3.5.1. Taxonomía	8
3.5.2. Características morfológicas	8
3.5.3. Ciclo de vida.....	9
3.5.4. Mecanismos de patogenicidad	10
3.6 Control de <i>Botrytis cinerea</i>	11
3.6.1. Control químico	11
3.6.2. Control biológico.....	11
3.6.3. Control biorracional	12
3.6.4. Prácticas culturales	12
3.7 Regulación de bioproductos.....	12
3.7.1. Marco institucional.....	12
3.7.2. Normatividad aplicable	13
3.8 Importancia del uso de biofungicidas	14

4. Justificación.....	14
5. Hipótesis	15
6. Objetivos	15
6.1 Objetivo general	15
6.2 Objetivos específicos	15
7. Materiales y métodos	16
7.1 Obtención y caracterización de fracciones de <i>Croton morifolius</i>	16
7.2 Obtención de rosa	17
7.3 Crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i>	19
7.4 Inoculación y control <i>in situ</i> de <i>Botrytis cinerea</i>	21
7.4.1. Incidencia	23
7.4.2. Severidad	24
7.4.3. Área de lesión	26
7.5 Parámetros colorimétricos de los pétalos de rosa.....	26
7.6 Histopatología de pétalos de rosa	27
7.7 Determinación de peroxidación lipídica.....	32
7.8 Análisis estadístico.....	33
8. Resultados	33
8.1 Análisis estructural de clerodanos del extracto crudo de <i>Croton morifolius</i>	33
8.2 Evaluación <i>in vitro</i> del efecto fungistático de fracciones enriquecidas de diterpenos sobre el crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i>	34
8.3 Evaluación <i>in situ</i> del efecto fungistático de los tratamientos sobre <i>Botrytis cinerea</i> en pétalos de rosas	36
8.3.1. Incidencia de la enfermedad	36
8.3.2. Severidad de la enfermedad	37
8.3.3. Área de lesión de la enfermedad.....	37
8.4 Histopatología de los pétalos de rosa	39
8.5 Peroxidación lipídica en los pétalos de rosa	43
8.6 Evaluación de los parámetros de colorimetría CIELAB en los pétalos de rosa...	45
9. Discusión.....	47

10. Conclusión	55
11. Referencias	56

Índice de Figuras

Figura 1. Ciclo de vida de <i>Botrytis cinerea</i>	10
Figura 2. Diagrama del procedimiento de cromatografía en columna aplicado al extracto metanólico de la raíz de <i>C. morifolius</i>	17
Figura 3. Área de producción y de manejo poscosecha de rosas.	18
Figura 4. Aislamiento de <i>Botrytis cinerea</i> utilizado como inóculo experimental.	19
Figura 5. Manipulación y pesaje de fracciones.	20
Figura 6. Sistema de almacenamiento para rosas de la variedad Samurái.	22
Figura 7. Diagrama del proceso experimental <i>in situ</i>	23
Figura 8. Medición de parámetros de color	27
Figura 9. Pétalo de rosa de la variedad Samurái siendo transferido a un histocassette.	29
Figura 10. Bloques de parafina solidificados en moldes metálicos.	29
Figura 11. Obtención de cortes histológicos mediante el micrótopo rotatorio Leica RM2125RT.	30
Figura 12. Portaobjetos en fase de drenado tras la tinción con safranina y azul alcian.	31
Figura 13. Espectros de RMN- ¹ H de las fracciones del extracto metanólico de <i>C. morifolius</i>	34
Figura 14. Inhibición <i>in vitro</i> del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> mediante el medio PDA envenenado.	36
Figura 15. Incidencia, severidad y área de lesión de los pétalos de rosa sobre el crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i>	38
Figura 16. Rosa sana (Rs): pétalos de rosa sin tratamiento adicional.	40
Figura 17. Rosa sana + fracción F3 (Rs+F3): pétalos de rosa sanos tratados con la fracción F3.	41
Figura 18. Rosa enferma (Rbo): pétalos de rosa inoculados con <i>B. cinerea</i>	41

Figura 19. Rosa enferma + fracción F3 (Rbo+F3): pétalos de rosa inoculados con <i>B. cinerea</i> tratados con la fracción 3.	42
Figura 20. Rosa enferma + Captan (Rbo+Cap): pétalos de rosa inoculados con <i>B. cinerea</i> y tratados con el fungicida Captan®.	42
Figura 21. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) en pétalos de rosa mediante tinción con 3,3'-diaminobencidina (DAB)..	45

Índice de tablas

Tabla 1. Uso de terpenos con actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos	4
Tabla 2. Manejo nutricional de rosas mediante la solución nutritiva de Hoagland	6
Tabla 3. Fungicidas químicos utilizados para el control de <i>Botrytis cinerea</i>	11
Tabla 4. Escala de severidad de síntomas en pétalos de rosa basada en el diámetro de las lesiones visibles.....	25
Tabla 5. Efecto de los tratamientos sobre la integridad tisular de pétalos de rosa inoculados con <i>Botrytis cinerea</i>	43
Tabla 6. Valores colorimétricos CIELAB de los pétalos de rosa según el tratamiento..	46
Tabla 7. Representación del color de los pétalos de rosa tratados tras 144 horas.....	47

Resumen:

En esta investigación se evaluó la efectividad antifúngica de diterpenos de *Croton morifolius* como alternativa ecológica para el manejo de *Botrytis cinerea* en rosas de corte de la variedad Samurái. *C. morifolius* es una planta traqueofita de la familia Euphorbiaceae conocida en México como palillo o vara blanca. Por su parte, *B. cinerea* es un hongo fitopatógeno necrotrófico causante de la enfermedad del moho gris, capaz de provocar pérdidas de hasta un 30% en la producción de rosas de corte y dañar significativamente la calidad poscosecha. El estudio *in vitro* mostró que la fracción enriquecida de diterpenos (F3) puede inhibir el crecimiento micelial hasta un 32% y el tratamiento químico (Captan®) puede inhibir hasta un 72% a las 144 horas. En condiciones *in situ*, la fracción F3 presentó la mayor actividad biofungicida, reduciendo la incidencia de la enfermedad en un 56%; sin embargo, este valor fue menor al alcanzado por el control químico con Captan®, que logró una reducción del 69% a las 144 horas. En los análisis histopatológicos se observó que los pétalos tratados con diterpenoides conservaron su estructura vegetal, con menor colapso celular, en contraste con los tejidos infectados. Además, la acumulación de especies reactivas de oxígeno fue considerablemente menor en los tratamientos con diterpenos, lo que evidencia una reducción del estrés oxidativo inducido por *B. cinerea*. En cuanto a la calidad visual, los parámetros colorimétricos muestran mejoras en la luminosidad (L^*) de los pétalos tratados, lo que sugiere que los diterpenos no son fitotóxicos, sino que preservan la calidad del tejido floral. Los resultados demuestran que los diterpenos de *C. morifolius* presentan actividad para el control de *B. cinerea*, lo que aporta una alternativa para reducir el uso de fungicidas sintéticos y promover prácticas agronómicas más sustentables en la floricultura.

Palabras clave: *Croton morifolius*; *Botrytis cinerea*; biofungicida; sustentabilidad; rosa de corte.

1. Introducción

La floricultura, disciplina de la horticultura, constituye un sector de gran relevancia en los ámbitos económico y social, especialmente en países con alto desarrollo productivo y exportador. Sin embargo, el panorama actual enfrenta grandes retos relacionados con la sustentabilidad, la organización entre los actores del sector y la necesidad de potenciar los procesos de producción y comercialización. Ante este escenario es resaltante el poder promover estrategias en el área económica, social y ambiental (Arenas-Echeverri *et al.*, 2023). Dentro de la floricultura, la rosa de corte se destaca como una de las especies ornamentales de mayor importancia debido a su alta demanda en el mercado (Tiasmalomo *et al.*, 2025). Sin embargo, su producción requiere un manejo adecuado, ya que diversos factores pueden comprometer su calidad tanto durante el cultivo como en la poscosecha. La enfermedad conocida como moho gris, causada por el hongo *Botrytis cinerea*, es uno de los principales problemas fitosanitarios que afectan la producción de rosas de corte. Este hongo fitopatógeno puede estar presente desde el cultivo y en la etapa de poscosecha, causando daños fisiológicos en la flor, como marchitez, manchas y pérdida de la apertura floral (Ha *et al.*, 2023). Además, su presencia durante el almacenamiento y transporte se reduce la vida útil de la flor y afecta su aceptación en el mercado florícola.

El control de *B. cinerea* se ha basado notablemente en la aplicación de fungicidas químicos convencionales; sin embargo, con el paso del tiempo se han identificado diversas desventajas, como la contaminación del agua y suelo, la afectación en organismos no deseados y la resistencia de los patógenos (Mahedi, 2025). En la producción ornamental se emplean de manera intensiva insecticidas y fungicidas, lo que provoca grandes daños en los ecosistemas, con mayor toxicidad en los cultivos extensivos (Yin *et al.*, 2023). Frente a esta problemática actual de la agricultura, se ha tenido que implementar enfoques más sostenibles, donde las soluciones se planifiquen de manera escalonada a partir de los puntos críticos

destacados y de la adaptación a situaciones complejas, desarrollando así prácticas que fortalezcan los sistemas agrícolas haciéndolos más resilientes y sostenibles (Hazard *et al.*, 2026). En este contexto, las regulaciones más estrictas han limitado el uso de fungicidas tradicionales, mientras que la resistencia de los patógenos y los efectos negativos sobre la salud humana y el medio ambiente se han vuelto cada vez más evidentes. Estas condiciones han impulsado la búsqueda de biopesticidas como alternativas sostenibles, capaces de actuar sobre fases iniciales del proceso infeccioso, incluyendo la germinación de esporas y la colonización de los tejidos vegetales (Rezaee-Danesh *et al.*, 2026). Investigaciones realizadas en distintas especies de plantas traqueofitas del género *Croton spp.*, han evidenciado que producen una gran variedad de metabolitos secundarios, entre los que destacan diterpenoides, sesquiterpenoides, alcaloides, cembranoides y limonoides (Coy-Barrera *et al.*, 2025). Entre ellos, el ácido abiético es un diterpeno con actividad antifúngica. Este metabolito secundario puede alterar procesos clave en el desarrollo de algunos hongos fitopatógenos, como la síntesis de ergosterol y aumento de peroxidación lipídica, lo que compromete la integridad de la membrana celular del fitopatógeno (Adamczyk *et al.*, 2023). Sin embargo, aún se conoce poca información sobre cómo actúan los diterpenos en condiciones reales de poscosecha, particularmente cuando se aplican directamente a tejidos florales, donde la respuesta puede ser distinta de la observada *in vitro*.

Por lo expuesto, resulta relevante evaluar la eficacia de los diterpenos de la planta traqueofita *C. morifolius* (conocida como palillo o vara blanca) como alternativa al control químico del moho *B. cinerea* en rosas de corte. El uso de este tipo de compuestos no solo representa una estrategia innovadora en el manejo fitosanitario, sino que también contribuye al desarrollo de prácticas más sostenibles, orientadas a reducir el impacto ambiental y a mejorar la inocuidad y la calidad de la floricultura.

2. Antecedentes

Los compuestos bioactivos extraídos de diferentes órganos vegetales son alternativas seguras y eficaces para proteger los cultivos (Godlewska *et al.*, 2021). Entre los metabolitos secundarios, los terpenos representan el grupo más abundante, por su papel clave en la protección de microorganismos, herbívoros y la competencia con otras especies vegetales (Ninkuu *et al.*, 2021). En la Tabla 1 se describen algunos terpenos con propiedades fungistáticas.

Tabla 1. Uso de terpenos con actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos

Material vegetal	Tipo de terpeno	Fitopatógeno	Nombre común	Dosis / concentración	Efecto reportado	Referencia
<i>Nicotiana tabacum</i>	Diterpeno (α -CBT diol)	<i>Rhizoctonia solani</i>	Pudriciones / damping-off	2,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	65,9% de inhibición in vitro	Capdesuñer <i>et al.</i> (2023)
<i>Citrus sinensis</i> (mezcla comercial de terpenos)	Monoterpenos (D-limoneno, 96.8%)	<i>Alternaria tenuissima</i>	Mancha foliar / falsa cenicilla	80,946 ppm	Inhibición total del crecimiento de esporas in vitro	Quintana-Obregón <i>et al.</i> (2017)
<i>Citrus sinensis</i> (aceite esencial)	Monoterpenos (limoneno, β -mirceno, α -pineno)	<i>Fusarium sp.</i>	Pudriciones / hongos poscosecha	3,5% (v/v)	Inhibición total del crecimiento radial in vitro	Santiago <i>et al.</i> (2022)
Semillas de <i>Annona glabra</i>	Caureno	<i>Fusarium solani</i>	Pudrición de raíz o tallo	1,000 mgL	50,58% de inhibición in vitro	Martínez <i>et al.</i> (2024)

3. Marco teórico

3.1 Manejo agronómico

3.1.1. Descripción del rosal

El rosal es un arbusto leñoso con espinas. Sus hojas son compuestas imparipinnadas, formadas por 3, 5, 7 y 9 folíolos ovalados, caducas y nervadura pinnada (González-Fernández *et al.*, 2021). Presenta raíz pivotante, flores completas (Yong Ania, 2004) y posee pseudofrutos (Mamma *et al.*, 2025)

3.1.2. Propagación de las rosas

La propagación vegetal es una práctica fundamental donde se aplican técnicas para multiplicar plantas con características similares. El injerto de yema es el método de propagación más usado comercialmente, mientras que por semilla limita la producción (Portal frutícola, 2022).

3.1.3. Densidad de plantación de las rosas

La densidad de plantación de la rosa mejorando calidad y manejo se recomienda a 4.4 plantas/ m^2 y maximizando productividad 6.7 plantas/ m^2 (Pittaluga *et al.*, 2003).

3.1.4. Riego

El manejo hídrico del cultivo de rosa se realiza mediante la aplicación de láminas de riego del 70 al 100% de la evapotranspiración del cultivo (ET_c). Ajustando niveles de agua según la relación de la planta y variables climáticas (Arévalo-H *et al.*, 2012).

3.1.5. Condiciones ambientales

Las rosas requieren temperaturas de 17–25 °C y humedades relativas de 70–80%. Además, niveles de CO₂ cercanos a 1200 mg/L incrementan la producción y

mejoran la calidad de la flor (Yong Ania, 2004). Los rosales en agricultura protegida demanda alta luminosidad, puede utilizarse luz artificial de 3000 lux por 16 horas (Portal frutícola, 2022).

3.1.6. Nutrición de las rosas

En un cultivar de rosa de corte producido en condiciones de invernadero, su rendimiento y comportamiento poscosecha dependen en gran medida de la nutrición vegetal (Tabla 2), especialmente del suministro de hierro (Fe), calcio (Ca) y zinc (Zn) (Rezai *et al.*, 2025).

Tabla 2. Manejo nutricional de rosas mediante la solución nutritiva de Hoagland

Compuesto	Concentración de la solución madre (gL ⁻¹)	Volumen de solución madre por litro de solución final (mL)	Elemento	Concentración final del elemento (mgL ⁻¹)
KNO ₃	101.10	6.00	N	224
Ca(NO ₃) ₂ -4H ₂ O	236.16	4.00	K	235
NH ₄ H ₂ PO ₄	115.08	2.00	Ca	160
MgSO ₄ -7H ₂ O	246.49	1.00	P	62
			S	32
			Mg	24
KCl	1.86	2.00	Cl	1.77
H ₃ BO ₃	0.77	2.00	B	0.27
MnSO ₄ -H ₂ O	0.17	2.00	Mn	0.11
ZnSO ₄ -7H ₂ O	0.29	2.00	Zn	0.13
CuSO ₄ -5H ₂ O	0.06	2.00	Cu	0.03
H ₂ MoO ₄ (85% MoO ₃)	0.04	2.00	Mo	0.05
NaFeDTPA (10% Fe)	30.00	3–1	Fe	1–3

Fuente: Khosravi *et al.* (2025)

3.1.7. Poda de rosas

La poda es una práctica agrícola que consiste en cortar ramas, tallos o partes de tejido vegetal. En el rosal, uno de los principales propósitos es estimular la producción de nuevos brotes florales. Además, se pueden realizar con fines de formación, producción, renovación o sanidad del rosal. Esto se planifica conforme al ciclo fenológico del cultivo y a las elevadas demandas del mercado (Yong Ania, 2004). El rosal debe ajustarse a la fuerza de cada planta; las débiles se podan más cortas. En los primeros años se forman buenas ramas y raíces. En climas templados, se podan entre diciembre y febrero; en zonas con heladas tardías, cuando brotan las primeras yemas, para evitar daños por el frío (Gostincha *et al.*, 1954).

3.2 Diterpenoides del género *Croton*

En México, la familia Euphorbiaceae destaca por su notable diversidad: 43 géneros y más de 782 especies registradas. A nivel mundial, este grupo botánico se sitúa en el sexto lugar, con 8,700 especies distribuidas en más de 300 géneros (Steinmann, 2002). En este contexto, el género *Croton* resalta por su composición fitoquímica, ya que contiene diversos metabolitos secundarios, entre los cuales destacan los diterpenoides, estos presentan potencial bioactivo, destacando la actividad antifúngica (Liang *et al.*, 2018).

3.3 Actividad antifúngica y mecanismo de acción de los diterpenos

Los diterpenoides son metabolitos secundarios característicos del género *Croton* y presentan una elevada diversidad estructural. Diversos estudios han demostrado que estos compuestos presentan actividad antifúngica, al inhibir el crecimiento de mohos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y *Botryotinia fuckeliana*, así como de oomicetos como *Phytophthora cactorum* y *Phytophthora fragariae*, además de *Mycocentrospora acerina* y especies del género *Cylindrocarpon* (Adamczyk *et al.*,

2023). Su acción se asocia principalmente a la alteración de la membrana celular fúngica, mediante la inhibición de la síntesis de ergosterol y el incremento del estrés oxidativo (Mesa *et al.*, 2019).

3.4 Importancia del cultivo de rosa y problemática fitosanitaria

La rosa de corte es una producción de gran importancia económica en el mercado mundial, la cual se ve afectada por la enfermedad micótica conocida como podredumbre gris o tizón del rosal, causada por el moho *Botrytis cinerea*, que es actualmente la principal limitante sanitaria a nivel mundial para la producción de rosa de corte, dado que se estima que produce pérdidas del 30% en la producción mundial de rosa de corte y contribuye a pérdidas globales estimadas entre 10 y 100 mil millones de dólares anuales (Ullah *et al.*, 2024).

3.5 *Botrytis cinerea*

3.5.1. Taxonomía

Botrytis cinerea es un hongo fitopatógeno necrotrófico, mata células del huésped y posteriormente se alimenta de tejido muerto (Amselem *et al.*, 2011). Es del reino Fungi; filo: Ascomycota; subfilo: Pezizomycotina; clase: Leotiomycetes; orden: Helotiales; familia: Sclerotiniaceae. Según esta jerarquía taxonómica, el organismo se denomina como: Género *Botrytis*; Especie *cinerea* (Cheung *et al.*, 2020)

3.5.2. Características morfológicas

Botrytis cinerea desarrolla colonias de crecimiento rápido, con un micelio blanco al inicio de su desarrollo que, con el avance, se torna gris debido a la gran producción de conidios. Su micelio es hialino y septado, lo que actúa como una estructura resistente. Microscópicamente, muestra conidióforos erectos, septados y ramificados, dispuestos en racimo característico. Sus conidios son unicelulares, ovoides u oblongos, de color que varía de gris a gris pardo y con agrupación en

masas pulverulentas consideradas características del moho gris (Spada *et al.*, 2024).

3.5.3. Ciclo de vida

Botrytis cinerea presenta un ciclo de vida predominantemente asexual (Fig. 1). Las condiciones favorables para su desarrollo permiten una rápida propagación en la rosa de corte. El hongo se dispersa mediante la producción de conidios que infectan los tejidos florales a través de heridas producidas por la cosechadora, heridas naturales o tejido senescente, y puede pasar por una fase de incubación latente. Los niveles de humedad (80–90%) y las temperaturas óptimas, cercanas a 10 °C, favorecen el desarrollo del hongo, especialmente en la poscosecha. El ciclo de la enfermedad se inicia con la dispersión de conidios, que constituyen la principal fuente de inóculo. Estos germinan sobre tejidos sanos y susceptibles cuando la humedad relativa es elevada. La infección se produce tras una penetración directa o por medio de una herida preexistente, o bien a través de estructuras especializadas como los apresorios; posteriormente, el patógeno coloniza al hospedante (Poveda *et al.*, 2020).

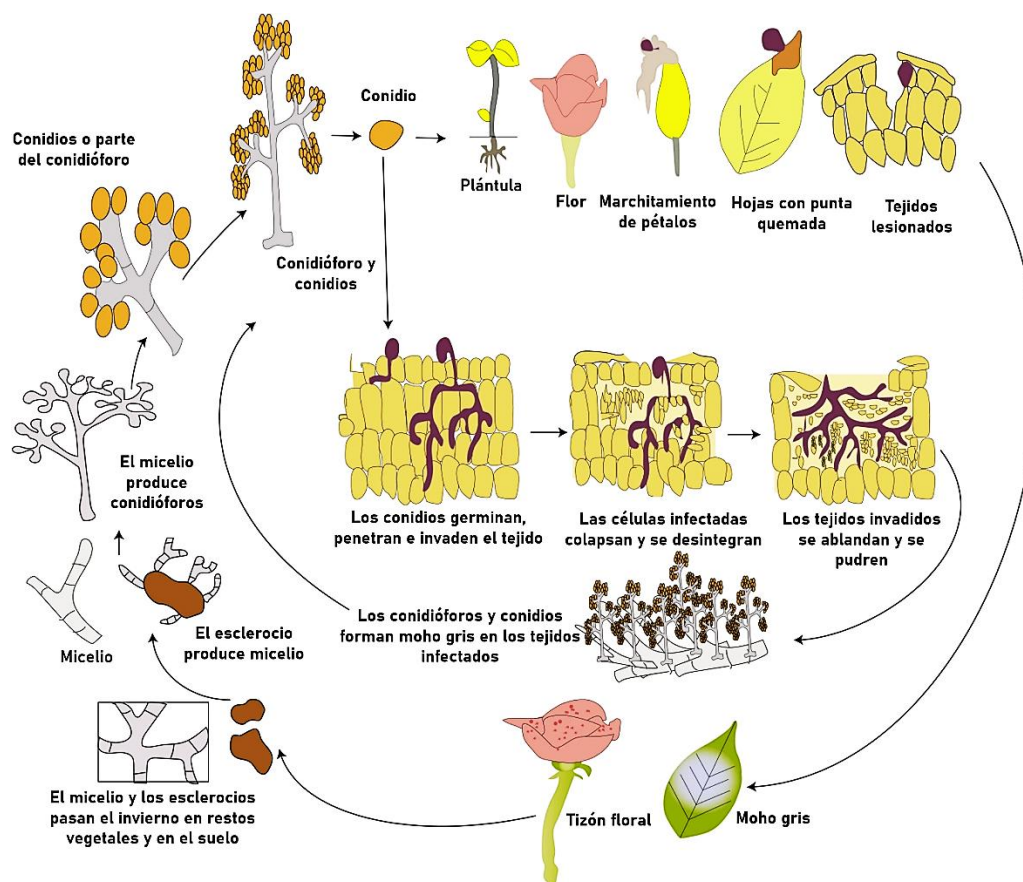


Figura 1. Ciclo de vida de *Botrytis cinerea*.

Fuente: Ullah *et al.* (2024).

3.5.4. Mecanismos de patogenicidad

Durante este proceso, el hongo produce enzimas hidrolíticas, toxinas y diversos metabolitos fitotóxicos, entre los que se encuentran botrydial y botcinin, que favorecen la necrosis y el avance de las lesiones. Una vez que el tejido colapsa, el hongo produce una gran cantidad de conidios que actúan como inóculo secundario y repiten el ciclo (Bi *et al.*, 2023). En este estadio, el hongo secreta enzimas y compuestos fitotóxicos que provocan muerte celular, maceración del tejido y pérdida de calidad comercial (Byung-Chun *et al.*, 2021).

3.6 Control de *Botrytis cinerea*

3.6.1. Control químico

La aplicación de fungicidas sintéticos es una herramienta esencial para el manejo de *Botrytis cinerea*, ya que permite disminuir su desarrollo y severidad. No obstante, el uso continuo repercute en mecanismos de resistencia (Islam *et al.*, 2024).

Tabla 3. Fungicidas químicos utilizados para el control de *Botrytis cinerea*

Familia química	Ingrediente activo	Concentración %	Formulación	Referencia
Carboxamida + Anilino pirimidin	Boscalid + Cyprodinil	No reportado	SC	(Castellano- Cañizares <i>et al.</i> , 2025)
Fenilpirrol	Fludioxonil	20%	SC	(Kim <i>et al.</i> , 2016)
Ditiocarbamatos + Estrobilurinas	Metiram+ Piraclostrobina	55% + 5%	WG	(Ullah <i>et al.</i> , 2024)
Benzimidazoles + Ftalimidas	Benomilo + Captan	50% + 80%	WP	(T. & C., 2001)
Fenilpirroles + Anilino pirimidina s	Fludioxonil + Ciprodinil	62.5%	WG	(Larios- Palacios <i>et al.</i> , 2020)

Nota. SC, suspensión concentrada; WP, polvo humectable; WG, granulado dispersable en agua.

3.6.2. Control biológico

Este control consiste en el uso de microorganismos vivos para el manejo de plagas y enfermedades de importancia agronómica. Se indica que la bacteria *Bacillus subtilis* (1×10^{12} UFC/mL) puede emplearse para el control de *Botrytis cinerea* en la

rosa. El tratamiento reduce la incidencia y severidad del moho gris, posiblemente a través de antibiosis y producción de lipopeptidos antifúngicos (Morales & Meneses, 2025).

3.6.3. Control biorracional

Con respecto al control biorracional de *Botrytis cinerea*, se ha demostrado que el extracto obtenido a partir del árbol neem (*Azadirachta indica*), muestra una reducción significativa del crecimiento micelial del moho gris una concentración del 15% *in vitro* (Jatoi *et al.*, 2022). El hongo fitopatógeno *B. cinerea*, mostró inhibición total del crecimiento micelial a la aplicación de extracto de canela (*Cinnamomum verum*), un árbol aromático rico en metabolitos bioactivos como el trans-cinamaldehído, a una concentración de 800 µL/L en ensayos *in vitro* (Dèné & Valiuškaitė, 2021).

3.6.4. Prácticas culturales

Las prácticas culturales son medidas de manejo mediante acciones físicas e integrales que regulan condiciones del cultivo. En los sistemas productivos de rosa bajo agricultura protegida, *Botrytis cinerea* se controla regulando la humedad relativa mediante un sistema de ventilación adecuado que facilite el secado del follaje, lo cual es fundamental para mantenerla por debajo del 80%. Los efectos de la radiación UV (300–400 nm) sobre la esporulación y de la luz azul (380–530 nm) sobre la conidiación justifican el uso de cubiertas fotoselectivas. (Ullah *et al.*, 2024).

3.7 Regulación de bioproductos

3.7.1. Marco institucional

En México, la regulación de los plaguicidas utilizados en la agricultura, incluidos los de origen biológico, se realiza mediante la colaboración de diversas instituciones. Entre las principales se encuentran la COFEPRIS, la SEMARNAT y el SENASICA,

que trabajan de manera coordinada para asegurar que estos productos cumplan con los requisitos de seguridad fitosanitaria, de protección del medio ambiente y de sanidad vegetal.

3.7.2. Normatividad aplicable

La evaluación de la aplicación foliar de diterpenos aislados de *Croton morifolius* para el control de *Botrytis cinerea* en rosa se fundamenta en el marco normativo aplicable a la investigación y evaluación de insumos fitosanitarios de origen vegetal.

Conforme a la NOM 059 SEMARNAT 2010, que establece las categorías de riesgo para las especies nativas de flora silvestre en México, *Croton morifolius* (Euphorbiaceae) no se encuentra listado en ninguna categoría de protección, por lo que su recolección y aprovechamiento con fines de investigación científica no implica restricciones derivadas de dicha norma (SEMARNAT, 2010).

En el contexto de estos lineamientos, Ley Federal de Sanidad Vegetal, se establece que se deben desarrollar e investigar métodos alternativos para el manejo de fitopatógenos de forma sustentada y biológicamente efectiva (DOF, 1994)

El Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos, para efectos del registro, considera a los insumos fitosanitarios botánicos como plaguicidas botánicos, para los cuales, previamente a cualquier registro, se debe justificar su eficacia frente al organismo objetivo (DOF, 2004). Además, la NOM-082-SAG-FITO/SSA1-2017 establece que los cultivos ornamentales, como la rosa, están exentos del establecimiento de límites máximos de residuos por no ser material destinado al consumo humano directo (DOF, 2017). Finalmente, la Ley General de Salud establece los criterios generales para el control sanitario que debe ejercer el hombre sobre este tipo de sustancias en relación con la salud humana (DOF, 1984).

3.8 Importancia del uso de biofungicidas

El uso de biofungicidas en la floricultura representa una alternativa importante para disminuir el impacto ambiental, ya que permite reducir la dependencia de los fungicidas químicos y, con ello, la contaminación del suelo, del agua y del aire. Además, promueve un sistema de producción más seguro y responsable al limitar la presencia de residuos tóxicos en las flores ornamentales y al proteger la salud de quienes realizan labores agrícolas. Por último, el empleo de estos productos favorece el acceso a mercados ecológicos y de exportación, donde se reconoce y valora cada vez más la producción sostenible basada en el uso de extractos vegetales y compuestos de origen natural (Hernández-Soto *et al.*, 2024).

4. Justificación

El moho gris, causado por *Botrytis cinerea*, es una de las causas principales de pérdidas en la poscosecha de rosas de corte, debido a su rápida propagación en condiciones de humedad y temperatura habituales durante el transporte y el almacenamiento (Ullah *et al.* 2024). Aunque el uso de fungicidas químicos ha sido la estrategia más utilizada para su control, su aplicación ha generado problemas asociados a la resistencia del patógeno, al impacto ambiental y a las limitaciones regulatorias, lo que ha impulsado la búsqueda de alternativas más sostenibles y compatibles con la floricultura moderna (Gutarra-García *et al.*, 2024). En este contexto, los compuestos derivados de plantas constituyen una fuente relevante de metabolitos con actividad antifúngica. Los diterpenos, en particular, han demostrado interferir en procesos esenciales del desarrollo fúngico y poseen una amplia diversidad estructural que favorece su potencial biológico (Sritharan *et al.* 2025). El género *Croton* es reconocido por su riqueza fitoquímica y por la presencia de diterpenoides (Coy-Barrera *et al.*, 2025); sin embargo, existe información limitada sobre su aplicación y efecto directo en tejidos florales.

La presente investigación se justifica por la necesidad de evaluar el efecto de los diterpenos identificados en *Croton morifolius* no solo sobre el desarrollo de *B. cinerea*, sino también sobre la respuesta del tejido del pétalo, considerando la integridad anatómica, el estrés oxidativo y la conservación de la calidad visual de la flor. Este enfoque permite generar información integral que contribuya al desarrollo de estrategias alternativas de manejo poscosecha, orientadas a reducir la dependencia de fungicidas sintéticos y a promover prácticas más sostenibles en la producción de rosas de exportación.

5. Hipótesis

Los diterpenos identificados de *Croton morifolius* presentan actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea*, reduciendo su crecimiento micelial, la incidencia y la severidad de la enfermedad en pétalos de rosa, además de preservar la integridad anatómica del tejido vegetal mediante la disminución del estrés oxidativo y de la colonización fúngica, con una eficacia comparable o superior a la del fungicida químico.

6. Objetivos

6.1 Objetivo general

Evaluar el efecto antifúngico de los diterpenos identificados de *Croton morifolius* como alternativa sostenible al uso de fungicidas sintéticos aplicados en poscosecha para el manejo de *Botrytis cinerea* en rosas destinadas a exportación.

6.2 Objetivos específicos

1. Evaluar el efecto de las fracciones enriquecidas de diterpenos de *Croton morifolius* sobre el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea*.

2. Determinar la eficacia de los diterpenos de *Croton morifolius* en el control de *Botrytis cinerea* en pétalos de rosa, mediante la cuantificación de la incidencia, la severidad y el área de lesión bajo condiciones simuladas de transporte poscosecha.
3. Analizar la integridad anatómica de los pétalos de rosa tratados con diterpenos de *Croton morifolius*, para evaluar el grado de daño tisular y la colonización fúngica.
4. Evaluar la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en pétalos de rosa tratados con diterpenos de *Croton morifolius* y expuestos a *Botrytis cinerea*.
5. Determinar el efecto de los diterpenos de *Croton morifolius* sobre la calidad visual de los pétalos de rosa mediante análisis colorimétrico en el sistema CIELAB (L^* , a^* , b^* , c^* , h^*).

7. Materiales y métodos

7.1 Obtención y caracterización de fracciones de *Croton morifolius*

Las fracciones (F1-F4) enriquecidas de diterpenos utilizadas en el presente estudio fueron proporcionadas por el Centro de Investigaciones Químicas de la Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo, la metodología esta descrita por Velázquez-Jiménez *et al.*, (2023). Estas fueron previamente obtenidas, fraccionadas e identificadas por el grupo donante a partir de la especie *C. morifolius* (Figura 2).

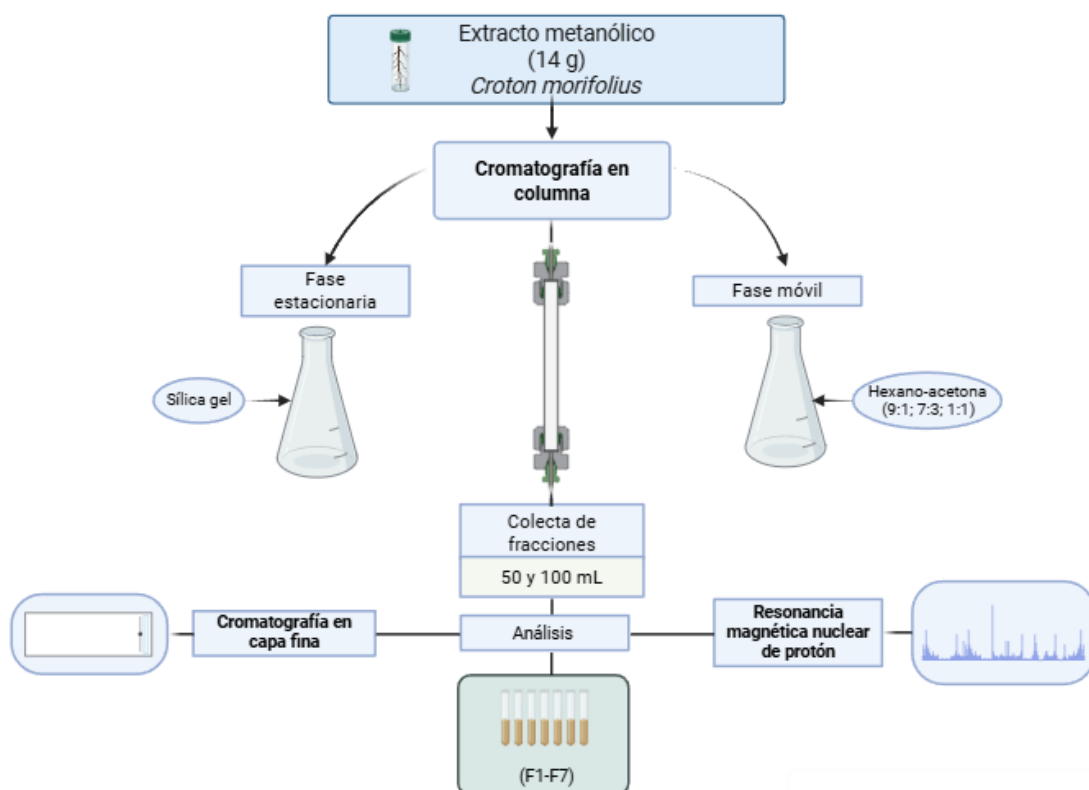


Figura 2. Diagrama del procedimiento de cromatografía en columna aplicado al extracto metanólico de la raíz de *C. morifolius*.

Elaboración propia BioRender ®.

7.2 Obtención de rosa

Las rosas empleadas en el presente estudio se obtuvieron de una unidad de producción comercial ubicada en la localidad de Santa Inés, municipio de Mineral del Chico, Hidalgo, México (20.218303, -98.808023) (Fig. 3). Santa Inés se sitúa en una franja altitudinal de aproximadamente 2,000 a 2,500 metros sobre el nivel del mar (msnm). De acuerdo con la regionalización climática, el área presenta un clima C(m), templado húmedo, con una temperatura media anual de 12 a 18 °C. Durante el periodo más frío del año se registran temperaturas que oscilan entre -3,5 y 18 °C, mientras que en el mes más cálido permanecen por debajo de 22 °C. La

precipitación anual se sitúa entre 800 y 1,200 mm, con un patrón de lluvias predominante en la temporada de verano. El mes más seco presenta valores inferiores a 40 mm, y la contribución de las lluvias invernales representa entre 5 y 10.2% del total anual (García, 2001).



Figura 3. Área de producción y de manejo poscosecha de rosas. Unidad comercial ubicada en Santa Inés, Mineral del Chico, Hidalgo, México.

Fuente: autoría propia.

En cuanto a las características edáficas y de uso del suelo, la zona está dominada por suelos de tipo Cambisol, principalmente asociados a la agricultura de temporal. Asimismo, el río Los Toros se destaca como la principal corriente superficial de la localidad, de acuerdo con la información cartográfica disponible del (INEGI, 2022). Se utilizó la variedad de rosa de corte Samurái, ampliamente cultivada en sistemas de producción orientados a los mercados nacionales. Es una rosa de flor doble, con pétalos de color rojo intenso, fragancia débil, tallos de longitud media y hojas verdes oscuras y brillosas; además, es susceptible al moho gris (*Botrytis cinerea*), al oídio (*Sphaerotheca pannosa*) y al mildiu vellosa (*Peronospora sparsa*) (ICAMEX, 2025).

Las flores fueron seleccionadas en estado de botón comercial, descartando aquellas que no presentaran daños mecánicos visibles ni síntomas aparentes de enfermedad. Las rosas fueron trasladadas a una caja refrigerada que simuló las condiciones reales de transporte comercial a 23 ± 2 °C y con humedades relativas del 50-60%. Una vez dentro de la cámara, se dividieron y se etiquetaron para aplicar los distintos tratamientos experimentales.

7.3 Crecimiento micelial *in vitro* de *Botrytis cinerea*

La actividad antifúngica de las fracciones (F1-F4) enriquecidas en diterpenos de la especie *Croton morifolius* frente al crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* se evaluó mediante ensayos *in vitro* con la técnica de medio envenenado. El aislamiento de *B. cinerea* utilizado en este estudio fue donado por el laboratorio de Química Agrícola Ambiental (Fig. 4).

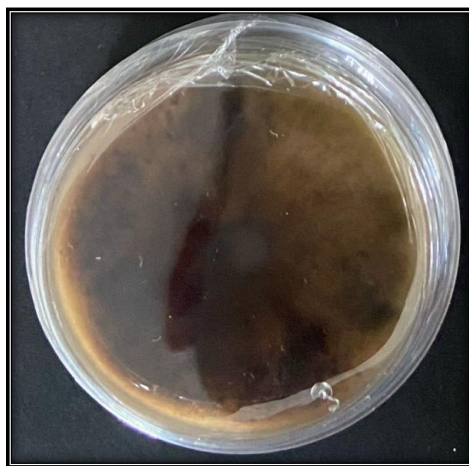


Figura 4. Aislamiento de *Botrytis cinerea* utilizado como inóculo experimental.

Fuente: autoría propia.

El medio de cultivo utilizado fue caldo dextrosa y papa comercial (MCD LAB). Para el experimento, se preparó a una concentración de 39 g/L. Después, el medio se esterilizó en un autoclave electrónico-quirúrgico LORMA®, modelo AV-07, utilizando

agua destilada hasta el nivel operativo indicado por el fabricante, a 121 °C durante 15 minutos. Los tratamientos establecidos fueron: el control, en PDA sin adición de fracciones ni solventes; el tratamiento químico con Captan® a una concentración de 1:1000; y las fracciones de diterpenos de *C. morifolius* (F1-F4). Para cada fracción se disolvieron 2 mg (Fig. 5) en 1 mL de hexano. Posteriormente, se añadió Tween 20® al 0,1% como agente surfactante, a fin de favorecer la dispersión homogénea de las fracciones en el PDA.



Figura 5. Manipulación y pesaje de fracciones.

Fuente: autoría propia.

Previo a la incorporación de las fracciones, el medio PDA esterilizado se dejó enfriar hasta alcanzar una temperatura inferior a 50 °C, a fin de evitar la degradación térmica de los compuestos bioactivos. La suplementación del medio y el vertido en placas se realizaron en condiciones de asepsia, en una campana de flujo laminar Tequimec®. Posteriormente, el medio se distribuyó en cajas Petri estériles de 60 mm de diámetro y se dejó solidificar a temperatura ambiente. Una vez solidificado el medio, cada placa fue inoculada en el centro con un explante de 10 mm de diámetro, obtenido de cultivos activos de *B. cinerea* con 7 días de crecimiento. Las placas se incubaron en una incubadora Binder®, serie ED115, a 28 °C, y el

desarrollo del micelio se evaluó durante un periodo total de 144 h. El crecimiento fúngico se determinó mediante la medición del crecimiento radial del micelio (mm), con registros cada 24 h, utilizando un vernier digital TRUPER® modelo CALDI-6MP y tomando como referencia el diámetro de la colonia en cada caja Petri.

El crecimiento del hongo se calculó según Hernández-Soto *et al.*, (2025):

$$\% \text{ Crecimiento} = \left(\frac{P_h}{P_p} \right) \times 100$$

P_h = diámetro del crecimiento del hongo en el tratamiento

P_p = diámetro del crecimiento del hongo en el control sin extracto

Con el valor anterior se determinó el porcentaje de inhibición usando la expresión:

$$\% \text{ GI} = 100 - \% \text{ crecimiento}$$

$\% \text{ GI}$ = grado de inhibición provocado por el tratamiento

7.4 Inoculación y control *in situ* de *Botrytis cinerea*

La evaluación *in situ* del efecto antifúngico se realizó en pétalos de rosa bajo condiciones simuladas de poscosecha (Fig. 6): Se establecieron cinco tratamientos experimentales: Rs (rosas sanas), RBo (rosas inoculadas con *Botrytis cinerea*), RBo+Cap (rosas inoculadas con *Botrytis cinerea* tratadas con Captan®), RBo+F3 (rosas inoculadas con *Botrytis cinerea* tratadas con la fracción F3) y Rs+F3 (rosas sanas tratadas con la fracción F3). Para cada tratamiento se emplearon 12 rosas. La selección de la fracción 3 (F3) se basó en su mayor actividad fungistática observada en los ensayos *in vitro*, donde se presentó el mayor porcentaje de inhibición del crecimiento micelial en comparación con las demás fracciones evaluadas.

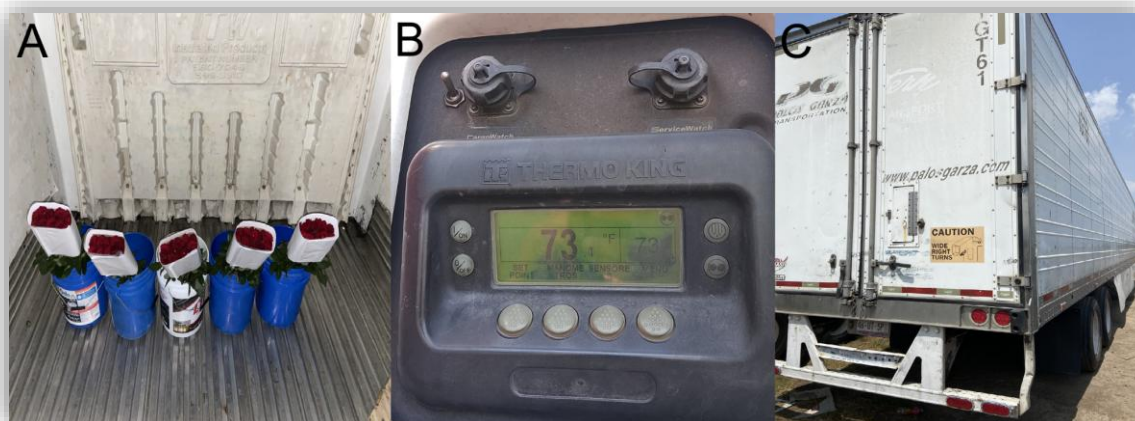


Figura 6. Sistema de almacenamiento para rosas de la variedad Samurái. (A) Interior del contenedor refrigerado Utility, modelo 2006, con ramos de rosas de la variedad Samurái colocados en cubetas. (B) Difusor del sistema de refrigeración Thermo King modelo SB 210, en el que se observa una temperatura de 22.8 °C. (C) Vista posterior.

Fuente: autoría propia.

Cada tratamiento se mantuvo separado mediante barreras plásticas para evitar la contaminación cruzada durante el desarrollo del experimento. La concentración de la suspensión de esporas de *B. cinerea* se determinó mediante recuento directo en una cámara de Neubauer. La inoculación del patógeno se realizó mediante la aplicación de una suspensión de esporas de *B. cinerea* ajustada a una concentración de 1×10^5 esporas mL^{-1} . Posteriormente, la suspensión se diluyó con agua destilada estéril hasta obtener una concentración final de 1×10^5 esporas mL^{-1} , utilizando la relación de dilución $C_1V_1 = C_2V_2$ (Scholz *et al.*, 2023). Para cada tratamiento se prepararon 5 mL de inóculo ajustado a dicha concentración. Tras la inoculación, las muestras se mantuvieron bajo las condiciones experimentales establecidas, incluyendo la aplicación periódica de nebulización fina para favorecer y mantener una humedad relativa aproximada del $50 \pm 2\%$, así como una temperatura controlada de 23 ± 2 °C, condiciones necesarias para el desarrollo de *B. cinerea*. La fracción enriquecida de diterpenos se aplicó en

los tratamientos RBo+F3 y Rs+F3, mediante la formulación de 20 mg de la fracción F3 en 10 mL de hexano, 5 mL de agua destilada estéril y 15 μ L de Tween 20® (Zerdoner *et al.*, 2025, modificado). En los tratamientos que incluían la fracción F3 y el fungicida Captan®, se realizaron dos aplicaciones foliares mediante atomización, asegurando una cobertura uniforme del tejido floral, a las 48 y 96 horas. El monitoreo se efectuó cada 24 horas durante un periodo total de 144 horas. Los primeros signos y síntomas de infección comenzaron a observarse después de 72 horas de incubación y se incrementaron progresivamente hasta las 144 horas, momento en que se dio por concluido el experimento (Fig. 7).

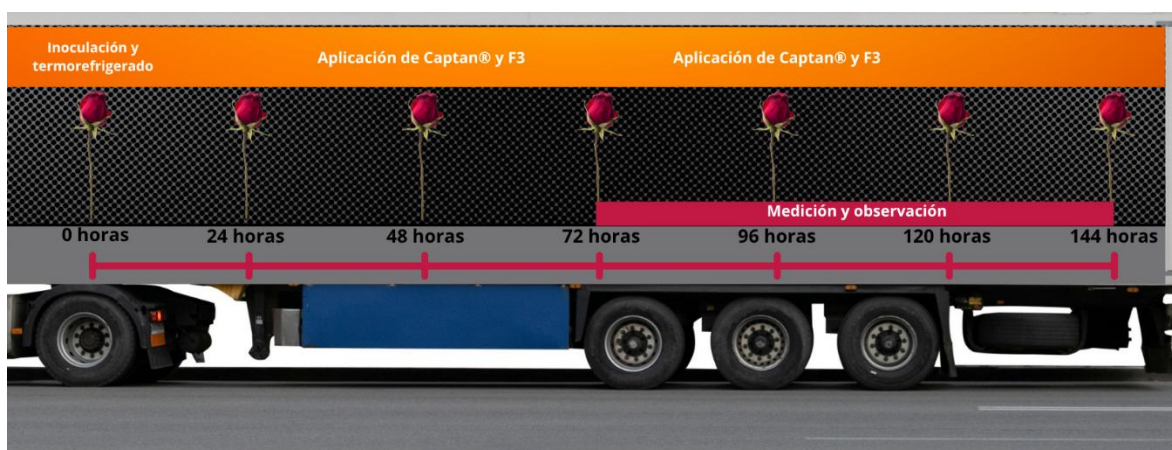


Figura 7. Diagrama del proceso experimental *in situ*.

Fuente: autoría propia, elaborado en Canva (2026).

7.4.1. Incidencia

La incidencia de la enfermedad se determinó mediante la evaluación visual de los signos y síntomas asociados a la infección por *Botrytis cinerea* en las rosas de cada tratamiento experimental. Para este análisis se consideraron las 12 rosas asignadas

a cada tratamiento, que fueron monitoreadas cada 24 horas durante las 144 horas del periodo establecido para la evaluación *in situ*. Se consideró como rosa afectada aquella que presentó al menos un signo o síntoma visible de infección, tales como lesiones necróticas, manchas de color pardo-grisáceo, áreas húmedas o colapsadas en los pétalos, o cualquier manifestación característica del desarrollo del patógeno. Las rosas que no presentaron alteraciones visibles en los pétalos se clasificaron como no afectadas. La incidencia se expresó como el número total de rosas con síntomas en relación con el total de rosas evaluadas por tratamiento, lo que permitió comparar la frecuencia de aparición de la enfermedad entre los diferentes tratamientos y describir el efecto de la fracción F3 y del fungicida químico Captan® sobre la presencia de *B. cinerea* en condiciones simuladas de poscosecha.

La incidencia de la enfermedad en rosas se determinó mediante la ecuación:

$$P = \left(\frac{n}{N} \right) \times 100$$

P es la incidencia (%), *n* el número de rosas con síntomas y *N* el total de rosas evaluadas (Hernández-Soto *et al.*, 2025).

7.4.2. Severidad

La severidad de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* se determinó mediante una evaluación visual detallada del daño en los pétalos de rosa (Tabla 4), considerando tanto la intensidad como la progresión de los síntomas observados a lo largo del periodo de monitoreo. Esta evaluación permitió estimar el nivel de afectación del tejido vegetal en respuesta a la infección y a la aplicación de los distintos tratamientos.

Tabla 4. Escala de severidad de síntomas en pétalos de rosa basada en el diámetro de las lesiones visibles

Grado de severidad	Descripción del síntoma
0	Ausencia total de síntomas visibles en los pétalos.
1	Presencia de síntomas iniciales, evidenciados por una lesión incipiente con un diámetro ≤ 1 mm.
2	Desarrollo de lesiones pequeñas, con un diámetro comprendido entre 2– 5 mm.
3	Aparición de lesiones de tamaño intermedio, con diámetros entre 6 y 10 mm.
4	Presencia de lesiones extensas, con un diámetro aproximado de 11–17 mm.
5	Grado máximo de severidad, caracterizado por lesiones con un diámetro igual o superior a ≥ 18 mm.

Fuente: Zerdoner *et al.* (2025).

Cada rosa fue evaluada de manera individual y clasificada conforme a esta escala durante el periodo de observación de 144 horas.

La severidad de la enfermedad en rosas se calculó utilizando la fórmula reportada (Hernández-Soto *et al.*, 2025):

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

Donde *IS* es el índice de severidad, *NC* el número de clasificación en la escala de severidad, *NPC* el número de rosas en cada clasificación, *NTP* el total de rosas evaluadas y *CMA* la clasificación máxima de la escala empleada.

7.4.3. Área de lesión

El área de lesión en los pétalos dañados se determinó mediante la medición directa de las lesiones visibles con un vernier digital Truper® modelo CALDI-6MP. Las mediciones se realizaron cada 24 horas en los pétalos con síntomas de infección, registrándose el tamaño de las lesiones en milímetros. Los datos obtenidos permitieron cuantificar objetivamente el grado de expansión del daño tisular provocado por el patógeno en cada tratamiento y evaluar el efecto de la fracción F3 y del tratamiento químico en la reducción del área afectada.

7.5 Parámetros colorimétricos de los pétalos de rosa

Al concluir el periodo de incubación bajo condiciones simuladas de poscosecha, equivalente a 144 horas en la caja refrigerada, las rosas de cada tratamiento experimental fueron trasladadas al Laboratorio de Química Agrícola del Instituto de Ciencias Agropecuarias para la evaluación de los parámetros de color (Fig. 8). Se seleccionaron pétalos representativos de las rosas correspondientes a los tratamientos Rs, RBo, RBo+Cap, RBo+F3 y Rs+F3, procurando la homogeneidad del material vegetal. Durante la selección se evitó el uso de zonas con daño mecánico marcado o necrosis evidente, a fin de no interferir con las lecturas instrumentales. La evaluación del color se realizó mediante un colorímetro portátil Linshang modelo LS173, previamente calibrado con un patrón blanco estándar conforme a las indicaciones del fabricante. En cada pétalo se registraron los parámetros del sistema de color CIELAB,

Las mediciones se efectuaron seleccionando áreas representativas. Para cada tratamiento se obtuvieron 12 lecturas y los valores registrados en los distintos puntos de medición se promediaron para obtener un valor representativo por tratamiento. Esta metodología permitió evaluar objetivamente las variaciones en la coloración de los pétalos asociadas tanto a la infección por *Botrytis cinerea* como a los tratamientos aplicados en condiciones poscosecha (Kim *et al.*, 2023).



Figura 8. Medición de parámetros de color.

Fuente: autoría propia.

Para complementar la interpretación visual, los valores obtenidos se mostraron mediante un generador de color en línea ToolsBox (2026), utilizado únicamente para representar el tono aproximado correspondiente a los valores L^* , a^* y b^* de cada tratamiento.

7.6 Histopatología de pétalos de rosa

Con el fin de analizar la integridad anatómica del tejido vegetal y detectar la presencia de estructuras fúngicas asociadas a la infección, se realizó un estudio histológico en pétalos de rosa. Se incluyeron cinco tratamientos: Rs (Rosa sana), RBo (Rosa enferma), RBo+Cap (Rosa enferma tratada con Captan®), RBo+F3 (Rosa enferma tratada con la fracción 3) y Rs+F3 (Rosa sana tratada con la fracción 3), lo que permitió establecer comparaciones en la organización tisular y en el grado de daño estructural entre los tratamientos. Para ello, se seleccionaron pétalos de

flores sin signos visibles de infección y otros con síntomas evidentes, lo que garantizó una representación adecuada de cada tratamiento.

Las muestras vegetales se fijaron en solución FAA (formaldehído, alcohol etílico y ácido acético glacial) durante 24 horas a temperatura ambiente, con el propósito de preservar la estructura tisular y prevenir la degradación celular (Megías *et al.*, 2025). Posteriormente, los pétalos fueron procesados por el método de inclusión en parafina (Prophet, 1995), para lo cual se colocaron en *histocassettes* (Fig. 9) y fueron llevados al procesador automático de tejidos (*histokinette*) marca Microm TP1020, donde se realizaron de manera controlada las etapas de lavado deshidratación, aclaramiento e infiltración necesarias para la inclusión en parafina (Valdebenito *et al.*, 2025).

El lavado se realizó con agua destilada, para eliminar el exceso de fijador; la deshidratación consistió en el paso del material vegetal por una serie ascendente de soluciones de agua destilada y etanol al 70%, 80%, 95% y 100%, con una permanencia de dos horas en cada concentración, lo que permitió la eliminación gradual del agua presente en los tejidos. Posteriormente, las muestras fueron sometidas a un proceso de aclaramiento mediante dos inmersiones consecutivas en xileno, una de una hora y otra de dos horas, con el fin de sustituir el alcohol residual y favorecer la infiltración de parafina.



Figura 9. Pétalo de rosa de la variedad Samurái siendo transferido a un histocassette

Fuente: autoría propia

Una vez aclaradas, las muestras se infiltraron con parafina líquida a 60 °C y se incluyeron en moldes metálicos, formando bloques sólidos adecuados para el seccionamiento histológico. Los bloques se dejaron solidificar por completo antes de proceder al corte (Fig. 10).



Figura 10. Bloques de parafina solidificados en moldes metálicos.

Fuente: autoría propia.

El corte se realizó con un micrótopo rotatorio manual Leica *RM2125RT*, obteniéndose cortes transversales de aproximadamente 20 μm (Fig. 11).



Figura 11. Obtención de cortes histológicos mediante el micrótopo rotatorio Leica RM2125RT.

Fuente: autoría propia.

Los cortes se colocaron en un baño de flotación para tejidos (tissue floating bath XH1001) que contenía agua destilada caliente a 37 °C adicionada con grenetina comercial al 0,5%, lo que permitió una adecuada extensión del tejido y la eliminación de pliegues. Posteriormente, las secciones se montaron sobre portaobjetos y se dejaron secar a temperatura ambiente y en el hornillo a 60°C durante 1 min, en intervalos, para asegurar su correcta adhesión antes del proceso de tinción. Previo a la coloración, los cortes fueron desparafinados mediante dos inmersiones consecutivas en xileno y, posteriormente, rehidratados mediante una serie decreciente de agua destilada con etanol al 100%, 95%, 80% y 70%, con un tiempo de 2 min en cada concentración. Finalmente, se realizó un lavado con agua destilada (Megías *et al.*, 2024).

Para la diferenciación de los componentes celulares se empleó una tinción doble con safranina y azul alcian (Megías *et al.*, 2025). Antes de comenzar la tinción, los tejidos se prepararon con etanol al 50% durante 1 minuto; posteriormente, las secciones se tiñeron con safranina al 1% durante 30 minutos, lo que permitió resaltar las paredes celulares secundarias y los tejidos lignificados (Megías *et al.*, 2022). El exceso de colorante se eliminó mediante cuatro lavados consecutivos en agua destilada de 20 segundos cada uno, seguidos de una diferenciación en etanol al 96% durante 1 minuto. Posteriormente, se aplicó azul alcian al 1 % durante un intervalo de 2 a 15 segundos como colorante de contraste, lo que permitió visualizar las paredes celulares primarias no lignificadas (Fig. 12).



Figura 12. Portaobjetos en fase de drenado tras la tinción con safranina y azul alcian.

Fuente: autoría propia.

Finalmente, las preparaciones se deshidrataron en etanol al 96%, se aclararon en xileno durante 1 minuto y se montaron con resina sintética como medio de montaje. El análisis microscópico se realizó en un microscopio óptico de campo claro Olympus *BX41* (Megías *et al.*, 2024), utilizando un aumento total de 100X para la

observación general del tejido y de 400X para el análisis detallado de las capas epidérmicas y subepidérmicas (Megías M. et al., 2024).

7.7 Determinación de peroxidación lipídica

La acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) en pétalos de rosa se determinó mediante la técnica de tinción con 3,3'-diaminobencidina (DAB; Sigma-Aldrich, $\geq 96\%$), que permite evidenciar cualitativamente la presencia de peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en tejidos vegetales. Este procedimiento se utilizó para evaluar el impacto de la infección por *Botrytis cinerea* y de los tratamientos aplicados en el estado oxidativo del tejido floral en condiciones simuladas de poscosecha.

Para el análisis se seleccionaron pétalos representativos de los tratamientos experimentales establecidos, que incluyeron pétalos sanos (Rs), pétalos sanos tratados con la fracción 3 (Rs+F3), pétalos infectados con *B. cinerea* (RBo), pétalos inoculados con el hongo tratados con la fracción 3 (RBo+F3) y pétalos inoculados con el hongo tratados con Captan® (RBo + Cap).

La detección de H_2O_2 en los pétalos se realizó mediante tinción con 3,3'-diaminobenzidina (DAB). Los pétalos previamente fijados fueron sumergidos en una solución de DAB a 1 mg mL^{-1} ajustada a pH 3.8 e incubados durante 2 h bajo iluminación blanca (Saucedo-García et al., 2025).

Una vez finalizada la incubación, se retiró la solución y las muestras se colocaron directamente en un baño de agua a $90\text{--}95\text{ }^{\circ}\text{C}$ durante 30 min, con el propósito de eliminar pigmentos residuales y estabilizar el precipitado. Posteriormente, los pétalos se sometieron a tres lavados sucesivos con etanol al 74 % hasta la eliminación completa de las clorofilas y de los compuestos solubles.

Las muestras aclaradas se conservaron en una solución de glicerol/agua/ácido acético (70/20/10, v/v/v), lo que permitió preservar la integridad del tejido y mejorar el contraste en la documentación fotográfica. La presencia de H_2O_2 se evidenció mediante la formación de un precipitado insoluble de color marrón-rojizo en las zonas de mayor actividad oxidativa (Saucedo-García et al., 2023).

La evaluación se realizó de manera comparativa entre los distintos tratamientos, lo que permitió identificar diferencias en los patrones de tinción asociados tanto a la infección fúngica como a la aplicación de la fracción F3 y del fungicida químico Captan®. Este procedimiento permitió estimar cualitativamente la acumulación relativa de ROS en los pétalos de rosa bajo las condiciones experimentales evaluadas.

7.8 Análisis estadístico

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre las variables de respuesta, se aplicó un análisis de varianza multivariado de medidas repetidas (MANOVA), un método estadístico que permite analizar distintas variables de respuesta simultáneamente, considerando que se evaluaron repetidamente en los mismos individuos a lo largo de cada experimento. Cuando el análisis multivariado indicó diferencias significativas entre tratamientos, se procedió a la comparación de medias mediante la prueba de Hotelling, con un nivel de significancia ($\alpha = 0.05$), utilizando el software InfoStat 2020.

8. Resultados

8.1 Análisis estructural de clerodanos del extracto crudo de *Croton morifolius*

Los espectros de resonancia magnética nuclear de protón (RMN- ^1H) de las fracciones (F1-F4) del extracto metanólico de raíz de *Croton morifolius* fueron analizados y comparados con lo reportado por Velázquez *et al.* (2023), con la finalidad de caracterizar y determinar el grado de pureza de cada una de las fracciones. El análisis de los espectros RMN de ^1H (Fig. 13), se observa entre las señales más representativas, señales simples a un δ_{H} de 9.20 ppm, características de un hidrógeno de grupo aldehído, señales que corresponden a hidrógenos de

anillos de furano entre un δ_H de 7.48 a 6.42 ppm, características de compuestos tipo diterpeno, otra señal en δ_H 3.70 corresponde a una señal simple de un grupo metoxilo. Adicionalmente, a frecuencias bajas señales dobles y simples que pertenecen a metilos secundarios y terciarios. El análisis de espectros de las fracciones permitió determinar de forma preliminar que su composición química es principalmente de compuestos de tipo diterpenoide (Velázquez *et al.*, 2023).

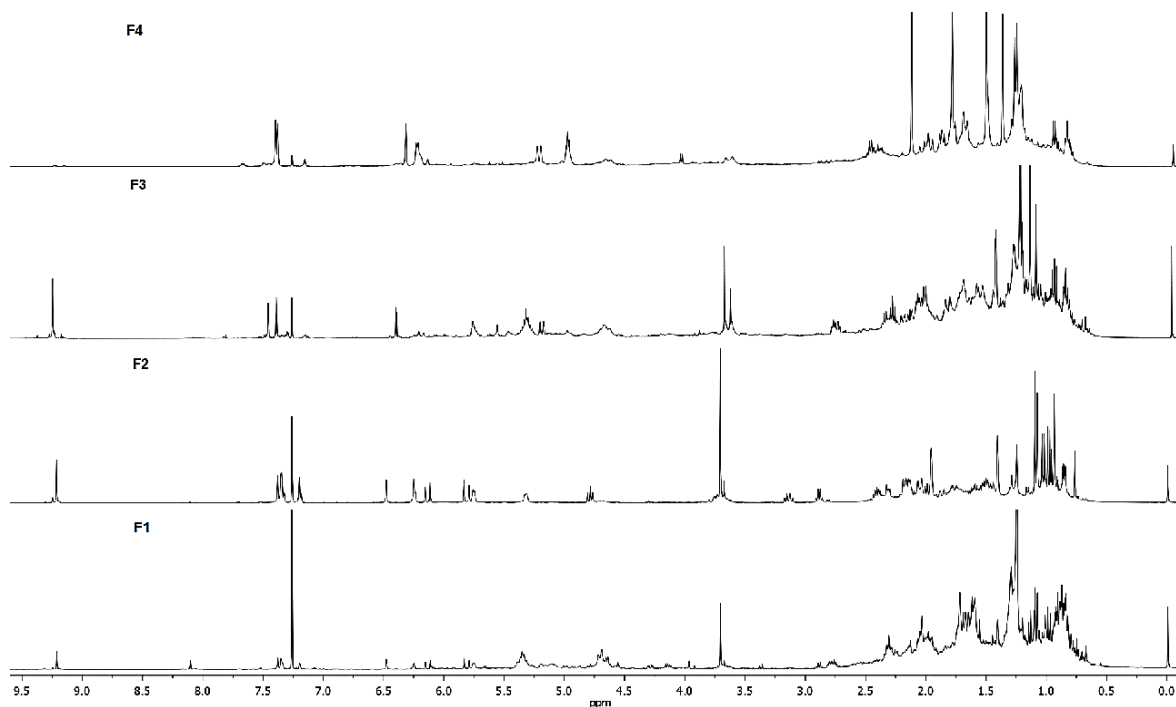


Figura 13. Espectros de RMN-¹H de las fracciones del extracto metanólico de *C. morifolius*.

8.2 Evaluación *in vitro* del efecto fungistático de fracciones enriquecidas de diterpenos sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea*

Para evaluar el efecto inhibitorio de las fracciones de *Croton morifolius* sobre *Botrytis cinerea*, se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (Fig. 14). En las primeras 24 horas se observó un efecto inicial: la fracción F3 logró un 87% más de inhibición que RBo+Cap, mientras que F4 aumentó un 32% de

inhibición frente a RBo+Cap; además, F3 superó a F4 en un 29%. Sin embargo, este comportamiento temprano no se mantuvo a lo largo del ensayo. Al llegar a las 144 horas, el tratamiento con RBo+Cap se posicionó como el tratamiento más eficaz, con una inhibición de un 56% respecto a F3 y de un 63% frente a la fracción F4. Aun así, F3 mantuvo una ventaja constante sobre F4, alcanzando una diferencia de 17% en la última evaluación.

Además de las diferencias en la inhibición, se observaron cambios en el color del micelio y del medio PDA. En el tratamiento con Captan®, no se desarrolló *Botrytis cinerea* y el medio se mantuvo blanco. En las fracciones F3 y F4, el micelio presentó una tonalidad más clara y blanquecina, mientras que el medio se observó ligeramente más intenso. En contraste, en el control y en las fracciones F1 y F2 se observó la coloración grisácea de *B. cinerea*, y el medio no presentó cambios relevantes.

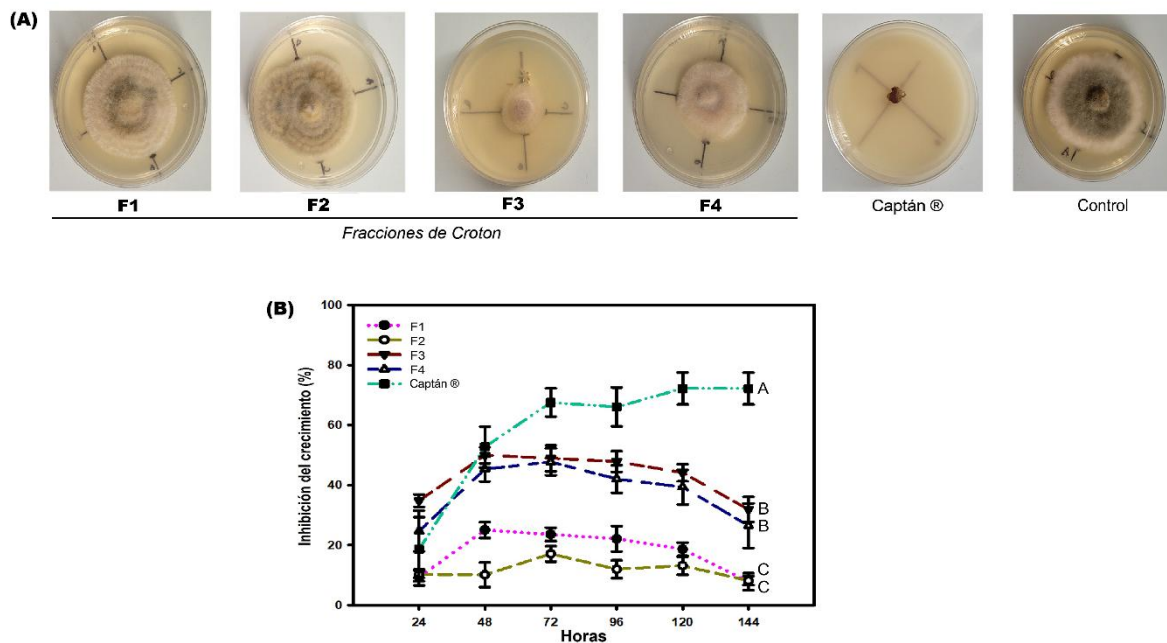


Figura 14. Inhibición *in vitro* del crecimiento de *Botrytis cinerea* mediante el medio PDA envenenado. (A) crecimiento micelial en cajas Petri correspondiente a los tratamientos con fracciones (F1-F4), Captan® y el control; y (B) porcentaje de inhibición del crecimiento micelial de las fracciones (F1-F4) y de Captan®. Se aplicó un análisis de varianza multivariado de medidas repetidas (MANOVA). Diferentes letras indican diferencias estadísticamente significativas, de acuerdo con la prueba de Hotelling ($\alpha = 0,05$). Se emplearon 5 réplicas por tratamiento.

8.3 Evaluación *in situ* del efecto fungistático de los tratamientos sobre *Botrytis cinerea* en pétalos de rosas

8.3.1. Incidencia de la enfermedad

Para evaluar el efecto de los tratamientos sobre la incidencia de *B. cinerea* en pétalos de rosa, se realizó el monitoreo correspondiente (Fig. 15). Los resultados de los tratamientos a las 96 horas: RBo+F3 redujo la incidencia en un 28% respecto a RBo y RBo+Cap. Al finalizar el ensayo, a las 144 horas, RBo+Cap disminuyó la

incidencia en un 23% frente a RBo; sin embargo, el tratamiento RBo+F3 disminuyó la incidencia en un 33% respecto a RBo y disminuyó la incidencia en un 19% en comparación con RBo+Cap.

8.3.2. Severidad de la enfermedad

La severidad de las rosas, debida al desarrollo de *B. cinerea* (Fig. 15), muestra que, a las 96 horas, RBo aumentó la severidad en un 39% con respecto a RBo+F3; el tratamiento RBo+F3 disminuyó la severidad en un 28% respecto a RBo+Cap, mientras que, a las 144 horas, RBo+Cap disminuyó la severidad en un 23% frente a RBo. El tratamiento RBo+F3 disminuyó la severidad en un 33% respecto a RBo y disminuyó la severidad en un 19% en comparación con RBo+Cap.

8.3.3. Área de lesión de la enfermedad

Se evidenciaron lesiones causadas por *B. cinerea* (Fig. 15). A las 96 horas, el tratamiento RBo+F3 mostró la mayor eficacia, con una reducción del área de lesión en un 44% respecto de RBo y en un 50% frente a RBo+Cap. A las 144 horas, el tratamiento RBo+F3 mostró la mayor eficacia, con una reducción del área de lesión en un 65% respecto al RBo y en un 54% frente a RBo+Cap. Al finalizar la evaluación, RBo+Cap disminuyó el área lesionada en un 25% respecto a RBo.

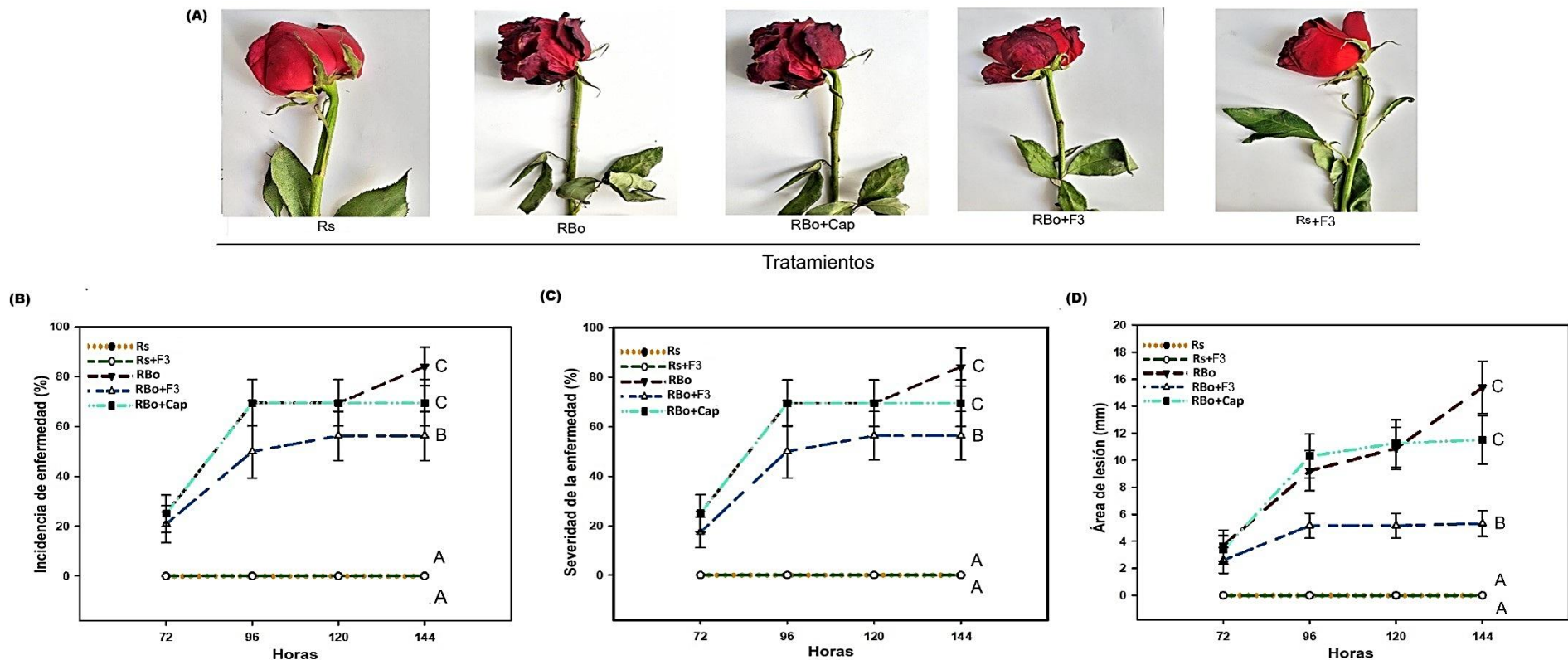


Figura 15. Incidencia, severidad y área de lesión de los pétalos de rosa sobre el crecimiento de *B. cinerea*. (A) Apariencia de los pétalos de rosa de cada tratamiento; (B) incidencia de la enfermedad (%); (C) severidad de la enfermedad (%); (D) área de lesión (mm). Rs (Rosa sana), RBo (Rosa enferma), RBo+Cap (Rosa enferma tratada con Captan®), RBo+F3 (Rosa enferma tratada con la fracción 3) y Rs+F3 (Rosa sana tratada con la fracción 3) corresponden a los tratamientos evaluados en pétalos de rosa. Se aplicó un análisis de varianza multivariado de medidas repetidas (MANOVA). Las distintas letras en los puntos de las curvas indican diferencias significativas según la prueba de Hotelling ($\alpha = 0,05$); $n = 12$.

8.4 Histopatología de los pétalos de rosa

Los cortes histológicos de pétalos de rosa teñidos con safranina–azul alcían rápido permitieron comparar la integridad anatómica entre los distintos tratamientos evaluados. En la rosa sana (Rs), la arquitectura tisular se observó completamente conservada. La epidermis adaxial presentó células papilosas, mientras que la epidermis abaxial mostró células planas continuas en la parte inferior. En el mesófilo petalar se observan el parénquima y vacuolas amplias. Los haces vasculares teñidos de rojo no están delimitados (Figura 16). En las rosas sanas tratadas con la fracción 3 (Rs+F3), la epidermis adaxial y abaxial sin células papilosas, con capa continua de células conservada, el mesófilo petalar con células parenquimatosas isodiamétricas, paredes celulares bien definidas y abundantes espacios intercelulares (Fig. 17). Los pétalos de la rosa inoculados con *Botrytis cinerea* (RBo) presentaron pérdida de continuidad tisular, colapso celular y pérdida de continuidad de la epidermis (adaxial y abaxial). En el mesófilo petalar se observa un colapso celular, con células comprimidas y deformadas; no hay límites claros entre ellas, probablemente debido al efecto de las enzimas pectinolíticas. Tejido irregular, con zonas densamente teñidas y células colapsadas (Fig. 18).

En los pétalos inoculados con *B. cinerea* tratados con la fracción 3 (RBo+F3), se observan células epidérmicas adaxiales y abaxiales, sin células papilosas, con continuidad celular, ausencia de rupturas significativas y límites relativamente bien definidos. Mesófilo petalar íntegro en su mayoría, con células reconocibles, paredes celulares bien definidas y espacios intercelulares distinguibles. Lúmenes celulares visibles; no se observan zonas colapsadas ni tinción diferencial; arquitectura general intacta (Fig. 19). En los pétalos inoculados con *B. cinerea* tratados con el fungicida Captan® (Rbo+Cap), se distinguen las células papilosas de la epidermis adaxial; ambas superficies epidérmicas están intactas, con clara continuidad celular;

El mesófilo está bien organizado, con límites celulares definidos, de forma rectangular y espacios intercelulares conservados; el haz vascular central es íntegro, con continuidad vascular, organización compacta y ausencia de deformaciones. Tinción (safranina) cargada hacia el límite inferior, posiblemente por acumulación celular o compuestos fenólicos (Fig. 20).

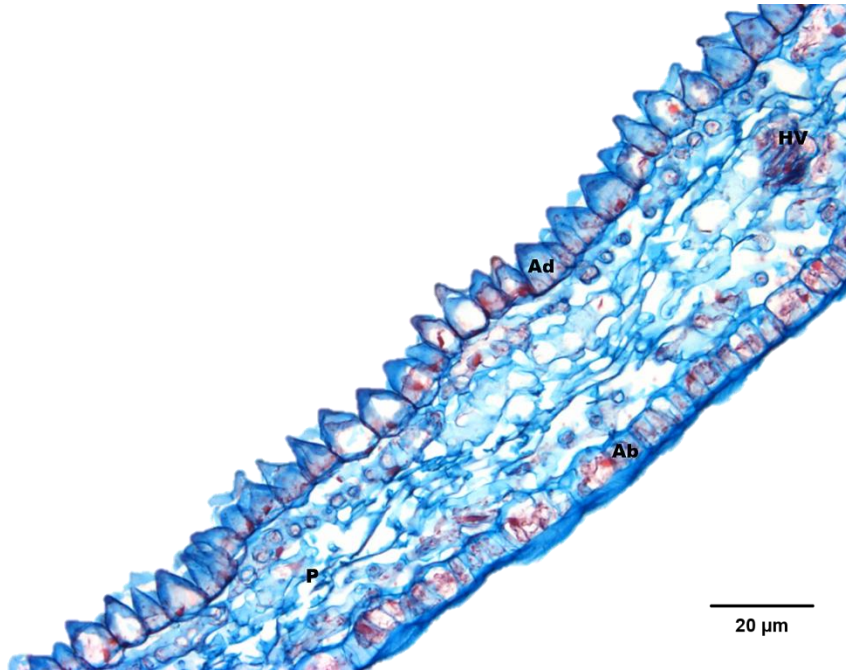


Figura 16. Rosa sana (Rs): pétalos de rosa sin tratamiento adicional. Ad – epidermis adaxial; Ab – epidermis abaxial; P – parénquima; HV – haz vascular.

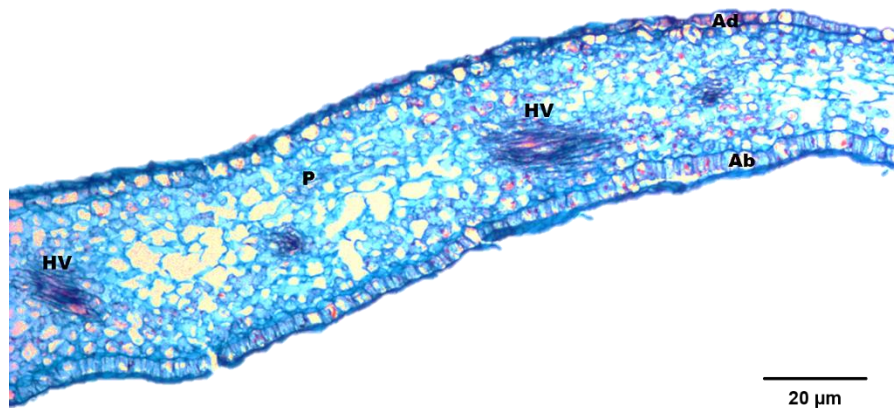


Figura 17. Rosa sana + fracción F3 (Rs+F3): pétalos de rosa sanos tratados con la fracción F3. Ad – epidermis adaxial; Ab – epidermis abaxial; P – parénquima; HV – haz vascular.

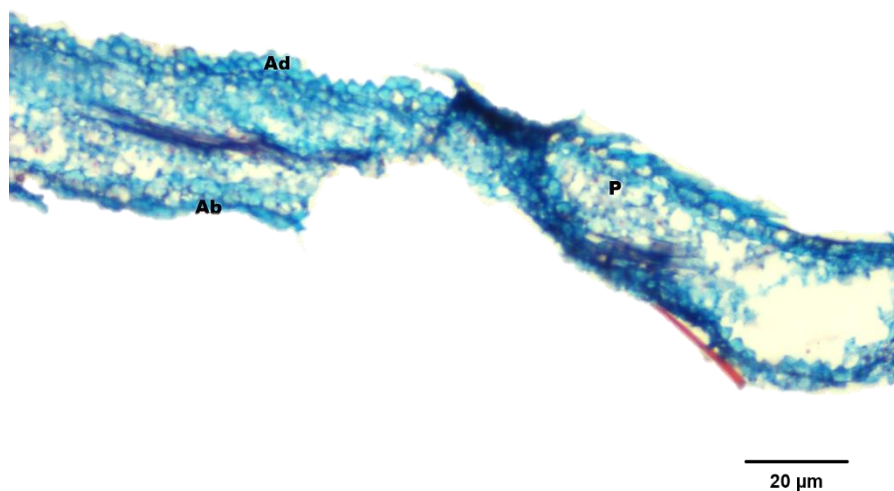


Figura 18. Rosa enferma (Rbo): pétalos de rosa inoculados con *B. cinerea*. Ad – epidermis adaxial; Ab – epidermis abaxial; P – parénquima.

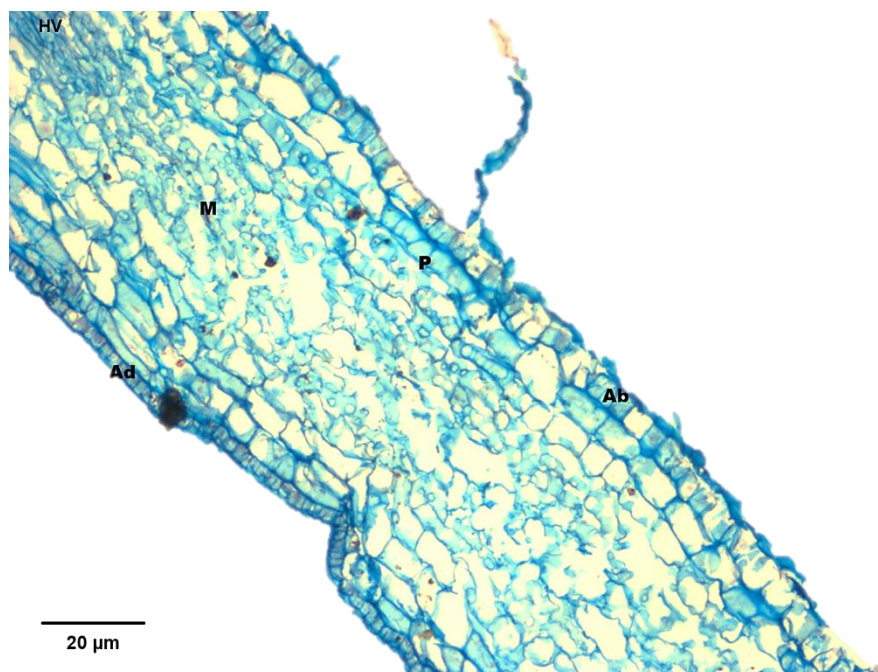


Figura 19. Rosa enferma + fracción F3 (Rbo+F3): pétalos de rosa rosa inoculados con *B. cinerea* tratados con la fracción F3. Ad – epidermis adaxial; Ab – epidermis abaxial; HV – haz vascular; M – mesófilo; P – parénquima.

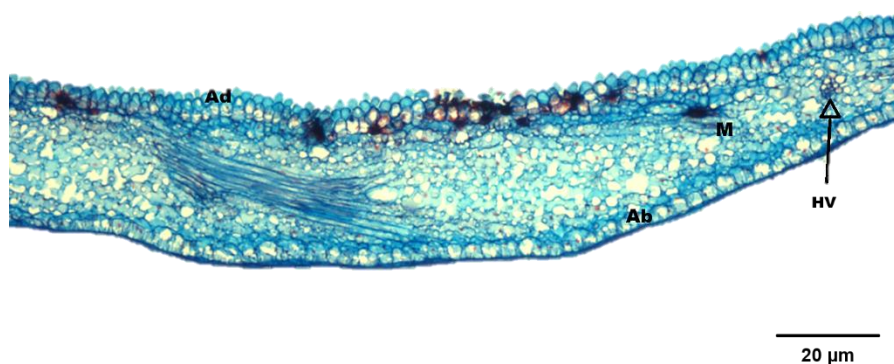


Figura 20. Rosa enferma + Captan® (Rbo+Cap): pétalos de rosa inoculados con *B. cinerea* y tratados con el fungicida Captan®. Ad – epidermis adaxial; Ab – epidermis abaxial; P – parénquima; HV – haz vascular.

Los resultados se resumen en la Tabla 5, donde se clasifica la integridad tisular de los pétalos bajo los diferentes tratamientos establecidos.

Tabla 5. Efecto de los tratamientos sobre la integridad tisular de pétalos de rosa inoculados con *Botrytis cinerea*

Característica	Rs	Rs+F3	RBo	RBo+F3	RBo+Cap
Integridad Epidérmica	Alta	Alta	Baja	Alta	Alta
Organización del Mesófilo	Alta	Alta	Baja	Alta	Alta
Colapso celular	Ausente	Ausente	Marcado	Escaso	Escaso
Continuidad Tisular	Conservada	Conservada	Alterada	Conservada	Conservada
Haces vasculares	Conservado	Conservado	Alterado	Conservado	Conservado
Evidencia de daño por <i>B. cinerea</i>	No	No	Alta	Baja	Baja

8.5 Peroxidación lipídica en los pétalos de rosa

En pétalos de rosa. La infección por *Botrytis cinerea* se asocia con un aumento de las especies reactivas de oxígeno (ROS) y de la peroxidación lipídica en el tejido floral. Se evaluó el efecto de la fracción F3 sobre la acumulación de ROS en los pétalos de rosa. Se empleó la tinción con DAB para comparar el control y 4 tratamientos: pétalos sanos (Rs); pétalos sanos tratados con la fracción F3 (Rs+F3); pétalos inoculados (RBo); pétalos inoculados tratados con la fracción F3 (RBo+F3); y pétalos inoculados tratados con Captan® (RBo+Cap). La tinción mostró que los pétalos sanos, tanto sin tratamiento como con la aplicación de la fracción F3, presentaron una coloración uniforme y sin señales evidentes de oxidación, lo que indica niveles mínimos de acumulación de ROS en condiciones normales. En contraste, los pétalos infectados sin tratamiento presentaron un oscurecimiento marcado y generalizado, lo que refleja una elevada acumulación de especies reactivas de oxígeno y un deterioro tisular avanzado (Fig. 21).

En los pétalos inoculados con el hongo y tratados con la fracción F3, la intensidad de la oxidación disminuyó notablemente. El tejido conservó una mayor homogeneidad en la coloración y mostró un daño menos pronunciado, lo que sugiere que el compuesto contribuye a reducir la acumulación de ROS inducida por *B. cinerea*. Por su parte, el pétalo inoculado con el hongo tratado con Captan® también presentó una reducción del daño respecto al pétalo infectado sin tratamiento; sin embargo, la zona café fue más amplia. En conjunto, la comparación visual de la Figura 21 indica que la infección por *B. cinerea* incrementa la oxidación en los pétalos, mientras que la fracción F3 atenúa dicho efecto. No obstante, el patrón de coloración observado sugiere que cada tratamiento actúa mediante mecanismos distintos: la fracción 3 parece proteger directamente al tejido frente al estrés oxidativo, mientras que Captan® limita la progresión del hongo fitopatógeno, pero deja una oxidación más evidente.

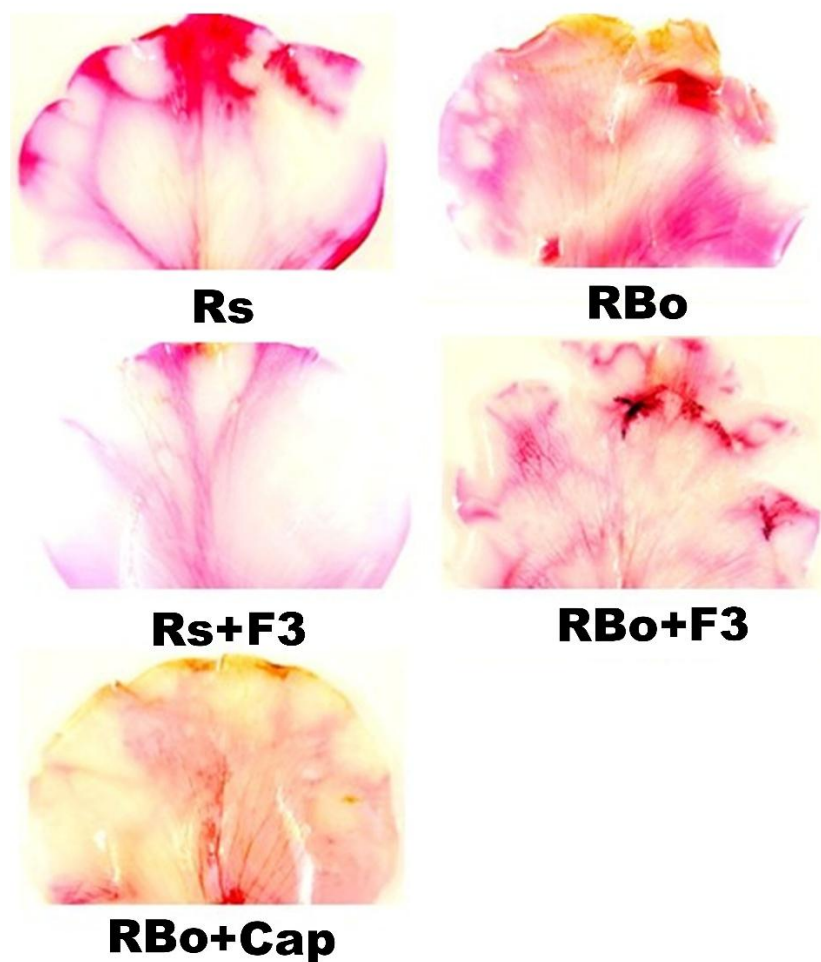


Figura 21. Detección de especies reactivas de oxígeno (ROS) en pétalos de rosa mediante tinción con 3,3'-diaminobencidina (DAB). Se muestran pétalo sano (Rs), pétalo sano tratado con la fracción 3 (Rs+F3), pétalo inoculado con *B. cinerea* (RBo), pétalos inoculados con la fracción F3 (Rbo+F3) y pétalos inoculados con Captan® (Rbo+Cap).

8.6 Evaluación de los parámetros de colorimetría CIELAB en los pétalos de rosa

Los parámetros de color se evaluaron mediante el sistema CIELAB (Tabla 6): L^* representa luminosidad, cuya escala va de 0 (negro) a 100 (blanco); a^* (eje negativo

tiende a verde y positivo a rojo); y b^* (eje negativo tiende a azul y positivo a amarillo) (Zhang *et al.*, 2025). Además de estos valores fundamentales, el equipo también midió los parámetros c^* (saturación) y h^* (tono).

Tabla 6. Valores colorimétricos CIELAB de los pétalos de rosa según el tratamiento

Tratamiento	L^*	a^*	b^*	c^*	h^*
Rs	33.67 ± 0.34^B	41.25 ± 0.47^C	12.12 ± 0.18^A	42.95 ± 0.47^{AB}	16.12 ± 0.2^B
RBo	32.95 ± 0.51^B	37.70 ± 1.06^B	10.76 ± 0.44^C	39.21 ± 1.13^C	15.71 ± 0.29^{ABC}
RBo+Cap	34.52 ± 0.51^C	39.30 ± 0.79^{BC}	11.22 ± 0.32^{BC}	40.87 ± 0.84^{BC}	15.79 ± 0.28^{BC}
RBo+F3	34.88 ± 0.34^C	40.51 ± 0.57^C	11.17 ± 0.26^{BC}	40.74 ± 1.26^{BC}	15.35 ± 0.25^{AC}
Rs+F3	36.92 ± 0.31^A	44.02 ± 0.50^A	11.85 ± 0.22^{AB}	45.45 ± 0.47^A	15.06 ± 0.25^A

Nota: Los tratamientos evaluados fueron: Rs (rosa sana), RBo (rosa enferma), RBo+Cap (rosa enferma más Captan®), RBo+F3 (rosa enferma más la fracción F3 y Rs+F3 (rosas sanas más fracción F3). Se aplicó un análisis de varianza multivariado de medidas repetidas (MANOVA). Las letras diferentes a las medias indican diferencias significativas entre tratamientos según la prueba de Hotelling ($\alpha = 0.05$); $n = 24$.

La representación cromática (Tabla 7) obtenida a partir de los valores CIELAB mostró resultados distintivos de cada tratamiento. Los pétalos del Control conservaron características de un tejido sano y, por ende, los parámetros más estables, mientras que los pétalos inoculados con el hongo fitopatógeno representaron valores ligeramente menores. El tratamiento rosa sana tratada con la fracción F3 (Rs+F3) evidenció los valores más altos de L^* , a^* y C^* . En conjunto estos resultados muestran que al desarrollarse *Botrytis cinerea* en los pétalos de rosa reduce la intensidad cromática del tejido, mientras que al aplicar la fracción F3 enriquecida de diterpenos permitió mantener e incluso aumentar algunos de los parámetros. Los colores representan la conversión aproximada de los valores L^* , a^* y b^* (Tabla 7) utilizando el programa digital ToolsBox (2026).

Tabla 7. Representación del color de los pétalos de rosa tratados tras 144 horas

Horas/Tratamientos	Rs	RBo	RBo+Cap	RBo+F3	Rs+F3
L* a* b*					
144					

9. Discusión

Los resultados *in vitro* indican que durante las primeras 24 a 48 horas de incubación, las fracciones F3 y F4 mostraron una inhibición inicial del crecimiento de *Botrytis cinerea*, siendo este efecto más pronunciado en la fracción 3, con una mayor eficiencia asociada a los diterpenoides, los cuales son capaces de interferir en el desarrollo del hongo fitopatógeno (Fig. 14). Además, los espectros de resonancia magnética nuclear indican que las fracciones están formadas principalmente por diterpenoides, por lo que la mayor actividad antifúngica observada podría estar relacionada con un mayor grado de concentración o de pureza del compuesto. Esta respuesta puede asociarse a la presencia de metabolitos secundarios como: flavonoides, taninos, esteroides, triterpenoides, alcaloides, leucoantocianidinas, cumarinas y saponinas, con capacidad de interferir de forma temprana con procesos clave del patógeno, como la germinación de conidias y el establecimiento del micelio (Iparraguirre *et al.*, 2025). Considerando este comportamiento, es posible que los diterpenoides presentes en la fracción F3 interfieran con el efecto fungistático. Ninkuu *et al.* (2021) reportan que los terpenos han sido identificados con función fitoalexínica, participando en los mecanismos de defensa de las plantas frente a hongos fitopatógenos en condiciones naturales.

Entre las 48 y las 96 horas se registró un cambio en la inhibición micelial: disminuyó en los tratamientos con la fracción 3, lo que indica una pérdida gradual de la efectividad. Esto podría explicarse por lo recientemente reportado de que *B. cinerea*

puede adaptarse y detoxificar compuestos activos mediante transportadores de flujo y enzimas metabolizadoras, lo que le permite recuperar su crecimiento tras una inhibición inicial (Bulasag *et al.*, 2023). Sin embargo, la fracción enriquecida de diterpenos ha demostrado actividad antifúngica, lo que coincide con ejercer su acción mediante la inhibición de la síntesis de ergosterol y el incremento de la peroxidación lipídica, mecanismos que comprometen la integridad de la membrana fúngica y afectan directamente la germinación y el desarrollo inicial del micelio (Adamczyk *et al.*, 2023). Además de estos mecanismos de acción, reportan Hernández-Soto *et al.* (2024) que los biofungicidas actúan sobre diferentes rutas fungistáticas, incluyendo: inhibición de la síntesis de ADN y proteínas, alteración de la membrana y mitocondrias, inhibición del transporte de electrones, daño de hifas y reducción de la esporulación.

Por otro lado, el tratamiento químico con Captan® presentó un crecimiento reducido debido a su acción fungicida, al perturbar mecanismos fisiológicos clave de la célula del hongo, lo que da como resultado la erradicación del patógeno. Se indica que este compuesto compromete el metabolismo energético mitocondrial, provoca alteraciones estructurales en las membranas celulares y bloquea la actividad de enzimas cuya función depende de grupos sulfhidrilo, procesos críticos para la supervivencia fúngica. La alteración conjunta de estos sistemas vitales provoca la pérdida de viabilidad del hongo y explica la eficacia fungicida observada (Vargas-Hernández *et al.*, 2021). Provoca daño en los tejidos, principalmente en el punto de contacto, debido a su alta reactividad con las biomembranas. Durante esta interacción, se liberan especies químicas altamente reactivas, como el tiofosgeno, que desencadenan citotoxicidad y alteraciones estructurales en las células expuestas (Kluxen *et al.*, 2022).

En la evaluación *in situ*, se realizaron en una caja refrigerada de tráiler, simulando las condiciones reales de transporte comercial de rosas. Las flores de corte, incluidas las rosas, se transportan comúnmente en cámaras o unidades refrigeradas

para preservar su calidad poscosecha, manteniendo temperaturas entre 23 ± 2 °C y una humedad relativa del $50 \pm 2\%$ (Ha *et al.*, 2023). En la Fig. 15, los tratamientos Rs (Rosa sana) y Rs+F3 (Rosa sana tratada con la fracción F3) no presentaron presencia del fitopatógeno en los tejidos florales de la rosa durante todo el periodo experimental, lo que confirma que los pétalos sanos no desarrollan infección por el patógeno. En contraste, los tratamientos aplicados sobre pétalos previamente infectados mostraron incrementos progresivos en el área de lesión, la incidencia y la severidad, lo que confirma la actividad patogénica de *B. cinerea*, un hongo fitopatógeno oportunista con un estilo de vida necrotrófico, cuya infección se caracteriza por la inducción de la muerte celular del hospedero mediante la secreción de enzimas degradativas y metabolitos con actividad tóxica. Como consecuencia, el patógeno coloniza los tejidos ya afectados, lo que favorece el aumento del tamaño de las lesiones y la progresión de la enfermedad (Canessa & Ferrari, 2025).

El tratamiento RBo (rosa enferma) presentó el avance más acelerado, con un aumento continuo de la lesión desde las 72 horas. Este comportamiento coincide con la biología del patógeno. En estudios recientes se ha señalado que, durante las etapas iniciales de la infección, se observa una fase temprana no destructiva, también conocida como criptobiótica o biotrófica transitoria, en la cual el hongo crece de manera limitada sobre el tejido vivo sin causar síntomas visibles (Rajarammohan, 2021). El ciclo patológico de *B. cinérea* y la planta hospedera se inicia cuando los conidios asexuales del hongo se adhieren a la superficie del tejido vegetal y germinan, dando lugar a la formación de tubos germinativos. En esta etapa temprana de la infección, las hifas pueden diferenciar apresorios simples y cojines de infección, que actúan como estructuras especializadas que facilitan la penetración del patógeno y funcionan como centros de producción de factores de virulencia (Choquer *et al.*, 2021). Tras interpretar los datos, se observa que los incrementos en incidencia, severidad y área de lesión entre las 120 y 144 horas corresponden a la transición natural de *B. cinerea* desde la fase criptobiótica inicial

hacia la fase necrotrófica, donde el hongo secreta enzimas degradadoras de pared celular (BcPG1, BcPG2, celulasas, xilanasas) y toxinas como botrydial y botcinin (Bi *et al.*, 2023). Las cuales contribuyen directamente a la necrosis del tejido vegetal. Como resultado de este proceso, se forma una zona localizada de tejido muerto que favorece la acumulación de biomasa fúngica. Lo cual responde al aumento progresivo del daño en los pétalos infectados. En los tratamientos aplicados a las rosas con la fracción F3 enriquecida de diterpenos, se observó un comportamiento significativo que se puede explicar a partir de los mecanismos de acción atribuidos al compuesto, los cuales coinciden con la actividad fungistática de múltiples dianas; además, pueden interferir con la formación de biopelículas para reducir la capacidad de adhesión y limitar el desarrollo del hongo (Basilio-Heredia *et al.*, 2026). En conjunto, estos mecanismos explican la reducción de la incidencia, la severidad y el área de lesión observadas en los tratamientos RBo+F3 y Rs+F3 como se muestra en la Figura 15. La fracción 3 interfiere con procesos clave de supervivencia de *B. cinerea*.

Los resultados histopatológicos obtenidos evidencian diferencias en la integridad anatómica del pétalo de rosa bajo los distintos tratamientos, lo que permite analizar el papel de las fracciones enriquecidas en diterpenos en la preservación de la estructura tisular frente a la infección por *B. cinerea*. En los pétalos sanos (Rs), la epidermis adaxial papilosa, la epidermis abaxial continua y el mesófilo con células isodiamétricas y vacuolas amplias reflejan un tejido fisiológicamente estable, sin colapso celular ni necrosis. Este patrón también se observó en los pétalos tratados con la fracción 3 (Rs+F3); mostraron una organización tisular conservada, característica de tejidos fisiológicamente estables. La ausencia de alteraciones anatómicas o de signos de fitotoxicidad en los pétalos sanos tratados con la fracción F3 sugiere que el compuesto no interfiere negativamente con la homeostasis celular ni con la arquitectura del tejido floral (Yan *et al.*, 2022).

En contraste, los pétalos inoculados por *B. cinerea* (RBo) mostraron el deterioro anatómico, reflejado en la desorganización del parénquima, el colapso de las células y la ruptura de la epidermis. Esta interpretación coincide con lo documentado por Leisen *et al.* (2022), quienes demostraron que *B. cinerea* secreta múltiples proteínas inductoras de muerte celular y metabolitos tóxicos, entre ellos poligalacturonasas, botrydial y botcininas, que actúan conjuntamente para generar necrosis y facilitar la invasión del tejido vegetal. El tratamiento con Captan® (RBo+Cap) redujo parcialmente el daño tisular, preservando la continuidad epidérmica y la organización del mesófilo. Sin embargo, la presencia de zonas de tinción intensa y la persistencia de áreas alteradas sugieren que, aunque el fungicida limita el desarrollo superficial del patógeno, no protege completamente la fisiología del tejido vegetal. Esto es coherente con la naturaleza de N-(triclorometiltio), que pueden comprometer la integridad de membranas y proteínas, favoreciendo procesos de estrés oxidativo y deterioro celular (EFSA, 2024).

En conjunto, estos mecanismos explican cómo la exposición del tejido vegetal a Captan® contribuye a las alteraciones histopatológicas observadas. De manera notable, los pétalos infectados tratados con la fracción 3 (RBo+F3) mostraron una preservación de la arquitectura tisular, la continuidad epidérmica, la definición de las paredes celulares y la ausencia de rupturas significativas. Este comportamiento indica un efecto protector al inhibir el patógeno y apunta a un mecanismo activo de conservación tisular, dado que los diterpenos pueden ejercer una acción fungicida directa al inhibir el crecimiento y la penetración micelial; a nivel histopatológico, este efecto se manifiesta con un menor daño en el mesófilo y en las células epidérmicas, lo que conlleva una reducción en la liberación local de pectinasas, celulasas y otras hidrolasas responsables de la degradación de la matriz de la pared celular. Al disminuir la actividad de estas enzimas, se evita la ruptura masiva de la pared, se reduce la separación intercelular y se previene el colapso del tejido, lo que explica la conservación histológica observada en los pétalos tratados (Zhao *et al.*, 2025).

Estudios realizados en rosa han demostrado que genes de la familia terpene synthase, involucrados en la biosíntesis de terpenos, incluidos aquellos asociados con la producción de los diterpenos, presentan una expresión elevada en los pétalos, particularmente en respuesta a condiciones de estrés. Este patrón sugiere que los diterpenos forman parte de una respuesta defensiva endógena del tejido floral, orientada a proteger tanto la funcionalidad como la estructura del pétalo. El efecto observado en los pétalos infectados tratados con la fracción F3 es coherente con esta función, ya que los diterpenos aplicados de manera exógena refuerzan mecanismos de defensa que la planta normalmente activa de manera insuficiente o tardía durante la inoculación (Yan *et al.*, 2022).

La preservación de la estructura anatómica observada puede explicarse por las funciones fisiológicas atribuidas a los terpenoides en los tejidos vegetales. Câmara *et al.* (2024) señalan que estos metabolitos, incluidos los diterpenos derivados del geranilgeranil difosfato, participan en la estabilización de membranas, la modulación de la fluidez lipídica y la protección frente al estrés oxidativo, además de presentar actividad antioxidante y antimicrobiana. Estas funciones resultan esenciales para mantener la integridad celular, especialmente en tejidos delicados como los pétalos, donde la pérdida de la continuidad membranal conduce rápidamente al colapso celular y a la necrosis. De manera complementaria, Sritharan *et al.* (2025) reportan que los diterpenos y otros terpenoides bioactivos pueden preservar la organización celular, reducir el daño oxidativo y limitar la degradación tisular inducida por patógenos, lo cual concuerda con la menor invasión micelial y la conservación del parénquima observadas en los pétalos tratados.

En conjunto, los resultados histopatológicos indican que la fracción F3 actúa mediante un doble efecto: por un lado, reduce la colonización y el avance del patógeno y, por otro, preserva activamente la estructura tisular del pétalo al

mantener la integridad celular, disminuir el colapso del mesófilo y conservar la organización de las epidermis. Esta preservación no responde únicamente a un efecto antifúngico directo, sino también a la capacidad que poseen los diterpenos para estabilizar el tejido vegetal frente al estrés biótico, lo que explica por qué los pétalos tratados mantienen una arquitectura notablemente más cercana a la de la condición sana.

Algunos estudios han demostrado que los terpenos, desempeñan un papel clave en la protección frente al estrés oxidativo en los tejidos vegetales. Estos metabolitos secundarios presentan propiedades antioxidantes que les permiten intervenir en la regulación del equilibrio redox celular, reduciendo la acumulación excesiva de especies reactivas de oxígeno (ROS) y contribuyendo a la estabilidad de las membranas (Câmara *et al.*, 2024). Este mecanismo resulta especialmente relevante durante la interacción con *B. cinerea*, ya que la sobreproducción de ROS asociada a la infección favorece procesos de peroxidación lipídica. En este contexto, Sritharan *et al.* (2025) indican que los diterpenos pueden amortiguar estos efectos y contribuir a la preservación de la estructura tisular bajo estrés biótico. Estos resultados también pueden explicarse por la respuesta oxidativa del tejido vegetal. En los pétalos de rosa infectados con *B. cinerea* se observó la acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS), lo que evidencia un estado de estrés oxidativo asociado directamente por *B. cinerea*, (Herrera-Téllez *et al.*, 2019). En los parámetros de color CIELAB. En particular, el tratamiento RBo (rosa enferma) presentó los valores más bajos de L^* y c^* , lo que indica un tejido más oscuro. Este comportamiento coincide con el avance de la necrosis, la degradación de los pigmentos y el colapso celular ocasionado por el hongo. El tratamiento con Captan® también redujo el daño en el pétalo infectado, debido a su función como fungicida de contacto, que inactiva proteínas y el metabolismo del hongo; sin embargo, su acción puede dañar el tejido vegetal por su reacción con el grupo tiol de las

moléculas biológicas (Gordon, 2010), lo que explica que, aunque mantenga el color, no sea fisiológicamente firme.

En los pétalos sanos, la tinción fue notablemente baja debido a la escasa acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS). Esto coincide con el funcionamiento normal del tejido vegetal, en el que las ROS se generan de manera continua en organelos como los cloroplastos y las mitocondrias, pero son rápidamente eliminadas por el sistema antioxidante enzimático. En este sistema participan enzimas como la superóxido-dismutasa, la catalasa y las peroxidasas, que transforman radicales reactivos en moléculas menos dañinas y evitan la peroxidación de los lípidos de la membrana (Rajput *et al.*, 2021). Esta respuesta también se refleja en los parámetros colorimétricos, con valores intermedios de L^* y c^* , lo que indica que, sin contacto con un fitopatógeno, mantienen la luminosidad y la saturación del color, así como la autenticidad de los pétalos sanos, sin estrés oxidativo.

De la misma manera, el tratamiento con pétalos sanos más la fracción 3, no resultó oxidativo en el tejido del pétalo, sino que también repercutió en el color, donde se observaron los valores más altos de L^* , c^* y a^* . Este comportamiento es relevante, dado que los pétalos de rosa contienen metabolitos secundarios, como terpenos, flavonoides y compuestos fenólicos (Wang, 2023). Esta coincidencia estructural permite que los diterpenos externos se integren sin generar estrés oxidativo. Se ha reportado recientemente por Demurtas *et al.* (2023) que los terpenos se generan a partir del apoplasto y se ha señalado que los diterpenos pueden movilizarse fácilmente mediante la adaptación de las membranas (Raza *et al.*, 2023), lo que explica la posibilidad de que el tejido petalar resultara estable.

10. Conclusión

El presente estudio demuestra que las fracciones ricas en diterpenos, obtenidas de *Croton morifolius*, ejercen un efecto fungistático consistente frente a *Botrytis cinerea* en rosas de corte, tanto en condiciones controladas como en escenarios simulados de poscosecha. La reducción del crecimiento micelial y de la incidencia de la enfermedad en etapas críticas del desarrollo del patógeno indica que estos metabolitos secundarios interfieren eficazmente en el establecimiento y la progresión de la infección, lo cual es un aspecto clave para el manejo poscosecha de este fitopatógeno. El análisis integral de los tejidos florales evidenció que el tratamiento con diterpenos no solo limita el daño causado por *B. cinerea*, sino que también contribuye a preservar la integridad estructural del pétalo.

De manera complementaria, la reducción de la acumulación de especies reactivas de oxígeno en los pétalos tratados indica que los diterpenos modulan la respuesta oxidativa del tejido, lo que reduce el estrés asociado a la infección sin comprometer la funcionalidad del órgano floral. Este efecto, aunado a la ausencia de alteraciones en los parámetros colorimétricos, confirma que el tratamiento no afecta negativamente la calidad visual de la flor, un criterio esencial para su aceptación comercial. En conjunto, los resultados obtenidos posicionan a los diterpenos de *C. morifolius* como compuestos con potencial para integrarse en estrategias alternativas de manejo de *B. cinerea* en floricultura, particularmente en sistemas orientados a reducir el uso de fungicidas sintéticos. Más allá de su aplicación inmediata, este trabajo aporta evidencia sobre el valor de los metabolitos como herramientas funcionales para la protección poscosecha y abre futuras líneas de investigación enfocadas en su mecanismo de acción, formulación, movilización y aplicación a escala productiva.

11. Referencias:

- Adamczyk, S., Latvala, S., Poimala, A., Adamczyk, B., Hytönen, T., & Pennanen, T. (2023). Diterpenes and triterpenes show potential as biocides against pathogenic fungi and oomycetes: a screening study. *Biotechnology Letters*, 45(11–12), 1555–1563. <https://doi.org/10.1007/s10529-023-03438-z>
- Amselem, J., Cuomo, C. A., Van Kan, J. A. L., Viaud, M., & Benito, E. P. (2011). Genomic Analysis of the Necrotrophic Fungal Pathogens *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *PLoS Genetics* | www.plosgenetics.org, 1(8), 1002230. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1002230>
- Arenas Echeverri, C. N., Betancur Vélez, M., Molina Sáenz, N. F., Miranda López, J., & Quintero Cuervo, J. (2023). Fortalezas y desafíos de una floricultura que propicie el desarrollo territorial y la gobernanza de la provincia de la paz en el Oriente antioqueño. *Lúmina*, 24(1), E0030. <https://doi.org/10.30554/lumina.v24.n1.4718.2023>
- Arévalo-H, J. J., Vélez, J. E., & Camacho-Tamayo, J. H. (2012). *Uso eficiente del agua para el cultivo de rosa cv. Freedom bajo invernadero*. <http://www.agriambi.com.br>
- Basilio-Heredia, J., Gutiérrez-Grijalva, E. P., Valencia-Sandoval, K., García-Estrada, R. S., Jiménez-Ortega, L. A., Valdez-Baro, O., & Contreras-Angulo, L. A. (2026). *Revista Mexicana de Fitopatología Fitoquímicos de residuos agrícolas y agroindustriales: Una alternativa para el control de bacterias y hongos fitopatógenos*. <https://doi.org/10.18781/R.ME>
- Bi, K., Liang, Y., Mengiste, T., & Sharon, A. (2023). Killing softly: a roadmap of *Botrytis cinerea* pathogenicity. *Trends in Plant Science*, 28(2), 211–222. <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.08.024>
- Bulasag, A. S., Camagna, M., Kuroyanagi, T., Ashida, A., Ito, K., Tanaka, A., Sato, I., Chiba, S., Ojika, M., & Takemoto, D. (2023). *Botrytis cinerea* tolerates phytoalexins produced by Solanaceae and Fabaceae plants through an efflux

- transporter BcatrB and metabolizing enzymes. *Frontiers in Plant Science*, 14. <https://doi.org/10.3389/fpls.2023.1177060>
- Byung-Chun, I., Suong Tuyet Thi Ha, & Bongsu, C. (2021). Nature and Regulation of *Botrytis cinerea* in *Rosa hybrida*. *Flower Research Journal*, 29(3), 129–137. <https://doi.org/10.11623/frj>
- Câmara, J. S., Perestrelo, R., Ferreira, R., Berenguer, C. V., Pereira, J. A. M., & Castilho, P. C. (2024). Plant-Derived Terpenoids: A Plethora of Bioactive Compounds with Several Health Functions and Industrial Applications—A Comprehensive Overview. *Molecules* 2024, Vol. 29, 29(16). <https://doi.org/10.3390/MOLECULES29163861>
- Canessa, P., & Ferrari, S. (2025). Editorial: Molecular interactions and control strategies for *Botrytis cinerea* in crop production. En *Frontiers in Plant Science* (Vol. 16). Frontiers Media SA. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1624296>
- Canva. (2026). *Diagrama del proceso experimental in situ - Gráfica*. <https://www.canva.com/design/DAHlfGooczwm4XZ-C7gykob-5VGCGbjvQ/edit>
- Capdesuñer, Y., Linares, C., Schöne, J., El-Hasan, A., Vögele, R., Yanes-Paz, E., Ortega-Delgado, E., Martínez-Montero, M. E., Rodríguez, E., & Quiñones-Gálvez, J. (2023). Tobacco Leaf-Surface Extracts: Antimicrobial Potential against Phytopathogenic Fungi and *In Vitro* Culture Bacterial Contaminants. *International Journal of Plant Biology* 2023, Vol. 14, Pages 1017-1033, 14(4), 1017–1033. <https://doi.org/10.3390/IJPB14040074>
- Castellano-Cañizares, R. X., Granja-Guerra, E., Luzón-Toscano, N. S., & Escobar-Barragán, P. R. (2025). *Eficacia de cuatro fungicidas para control de Botrytis cinerea en el cultivo de Rosa sp.* <https://doi.org/10.5281/ZENODO.14765510>
- Cheung, N., Tian, L., Liu, X., & Li, X. (2020). The destructive fungal pathogen *Botrytis cinerea*—insights from genes studied with mutant analysis. En *Pathogens* (Vol. 9, Número 11, pp. 1–46). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/pathogens9110923>

- Choquer, M., Rasclé, C., Gonçalves, I. R., de Vallée, A., Ribot, C., Loisel, E., Smilevski, P., Ferria, J., Savadogo, M., Souibgui, E., Gagey, M. J., Dupuy, J. W., Rollins, J. A., Marcato, R., Noûs, C., Bruel, C., & Poussereau, N. (2021). The infection cushion of *Botrytis cinerea*: a fungal 'weapon' of plant-biomass destruction. *Environmental Microbiology*, 23(4), 2293–2314. <https://doi.org/10.1111/1462-2920.15416>
- Coy-Barrera, C. A., Galvis, L., Rueda, M. J., & Torres-Cortés, S. A. (2025). The Croton genera (Euphorbiaceae) and its richness in chemical constituents with potential range of applications. En *Phytomedicine Plus* (Vol. 5, Número 1). Elsevier B.V. <https://doi.org/10.1016/j.phyplu.2025.100746>
- Demurtas, O. C., Nicolai, A., & Diretto, G. (2023). Terpenoid Transport in Plants: How Far from the Final Picture? *Plants* 2023, Vol. 12, 12(3). <https://doi.org/10.3390/PLANTS12030634>
- Déné, L., & Valiūškaitė, A. (2021). Sensitivity of *botrytis cinerea* isolates complex to plant extracts. *Molecules*, 26(15). <https://doi.org/10.3390/molecules26154595>
- DOF. (1984). *LEY GENERAL DE SALUD*.
- DOF. (1994). *LEY FEDERAL DE SANIDAD VEGETAL*. En *Artículo reformado DOF*.
- DOF. (2004). *Reglamento en Materia de Registros, Autorizaciones de Importación y Exportación y Certificados de Exportación de Plaguicidas, Nutrientes Vegetales y Sustancias y Materiales Tóxicos o Peligrosos*.
- DOF. (2017). *NOM-082-SAG-FITO/SSA1-2017*.
- EFSA. (2024). Statement on the refined environmental risk assessment and impact of the new classification for captan. *European Food Safety Authority Journal*, 22(2). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2024.8576>
- García, E. (2001). *Acervo de Datos Geoespaciales: capas de clima, precipitación e hipsometría*. <http://www.conabio.gob.mx/informacion/gis/>
- Godlewska, K., Ronga, D., & Michalak, I. (2021). Plant extracts - importance in sustainable agriculture. *Italian Journal of Agronomy*, 16(2), 1851. <https://doi.org/10.4081/IJA.2021.1851>

- González-Fernández, E., Kennedy, R., Osborn, R., Fernández-González, M., & Rodríguez-Rajo, F. J. (2021). *Botrytis cinerea* Airborne Conidia and Their Germination Ability Assessed by Immunological Methods in a NW Spain Vineyard. *Agronomy*, 11(7), 1441. <https://doi.org/10.3390/agronomy11071441>
- Gordon, E. B. (2010). Captan and Folpet. En *Hayes' Handbook of Pesticide Toxicology* (pp. 1915–1949). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-374367-1.00090-2>
- Gutarra García, B. I. (2024). *Botrytis spp.*: Importancia Económica, Biológica y Ecológica. *Ciencia Latina Revista Científica Multidisciplinar*, 8(4), 9359–9371. https://doi.org/10.37811/cl_rcm.v8i4.13080
- Gostincha, P. J., hogar, dulce, & Harvey, F. (1954). *CULTIVO DEL ROSAL*.
- Ha, S. T. T., Kim, Y. T., & In, B. C. (2023). Early Detection of *Botrytis cinerea* Infection in Cut Roses Using Thermal Imaging. *Plants*, 12(24). <https://doi.org/10.3390/plants12244087>
- Hazard, L., Crivits, M., Ducos, A., Levain, A., Magrini, M. B., & Salembier, C. (2026). Pragmatic principles for supporting the agroecological transition in the field: a review. En *Agronomy for Sustainable Development* (Vol. 46, Número 2). Springer-Verlag Italia s.r.l. <https://doi.org/10.1007/s13593-026-01092-z>
- Hernández-Soto, I., Cenobio-Galindo, A. de J., Cenobio-Galindo, M. F., González-Cortázar, M., Cerón-López, A., Saucedo-García, M., Olmedo Juárez, A., Vicente-Flores, M., & González-Monriel, L. (2025). The bioactive compounds from *Argemone mexicana* L. extracts control *Colletotrichum acutatum* in apples and improve postharvest quality. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici Cluj-Napoca*, 53(4), 14835. <https://doi.org/10.15835/nbha53414835>
- Hernández-Soto, I., Cenobio-Galindo, A. de J., Hernández-Fuentes, A. D., González-Lemus, U., Zaldívar-Ortega, A. K., González-Montiel, L., & Madariaga-Navarrete, A. (2024). Biofungicides Based on Plant Extracts: On the Road to Organic Farming. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol.

- 25, Número 13). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25136879>
- Herrera-Téllez, V. I., Cruz-Olmedo, A. K., Plasencia, J., Gavilanes-Ruíz, M., Arce-Cervantes, O., Hernández-León, S., & Saucedo-García, M. (2019). The protective effect of trichoderma asperellum on tomato plants against fusarium oxysporum and *botrytis cinerea* diseases involves inhibition of reactive oxygen species production. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(8). <https://doi.org/10.3390/ijms20082007>
- ICAMEX. (2025). *Variedades de rosa para corte, una experiencia de mejoramiento genético mutacional* (Primera edición). icamex.edomex.gob.mx
- INEGI. (2022). *Instituto Nacional de Estadística y Geografía (INEGI)*. <https://www.inegi.org.mx/>
- Iparraguirre, H. C., Ramos, A. B., Orellana, H. C., Surco-Laos, F., & García, J. A. C. (2025). Antifungal activity of plant extracts against *Botrytis cinerea*, *Lasiodiplodia theobromae*, and *Fusarium* sp.: Effectiveness in controlling *Erysiphe necator* and phytotoxic effect on wheat seeds. *Scientia Agropecuaria*, 16(4), 521–539. <https://doi.org/10.17268/sci.agropecu.2025.040>
- Islam, T., Danishuddin, Tamanna, N. T., Matin, M. N., Barai, H. R., & Haque, M. A. (2024). Resistance Mechanisms of Plant Pathogenic Fungi to Fungicide, Environmental Impacts of Fungicides, and Sustainable Solutions. *Plants* 2024, Vol. 13, 13(19). <https://doi.org/10.3390/PLANTS13192737>
- Jatoi, G. H., Abro, M. A., Ahmed, S. M., Al-Ani, L. K. T., Ali, U., Jatoi, M. A., Figari, I. M. G., Qambrani, J., Ahmed, I., Soomro, A. S., & Khaskheli, N. K. (2022). Preliminary selection and evaluation of fungicides and natural compounds to control grey mold disease of rose caused by *Botrytis cinerea*. *International Journal of Phytopathology*, 11(1), 49–58. <https://doi.org/10.33687/phytopath.011.01.4181>
- Khosravi, S., Tehranifar, A., Khoshgoftarmanesh, A. H., Selahvarzi, Y., & Cheheltanan, L. (2025). Morpho-chemical response of *Rosa hybrida* L. cultivars

- to the different source of calcium fertilizers under hydroponic conditions. *Scientia Horticulturae*, 347. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2025.114181>
- Kim, J. O., Shin, J. H., Gumilang, A., Chung, K., Choi, K. Y., & Kim, K. S. (2016). Effectiveness of Different Classes of Fungicides on *Botrytis cinerea* Causing Gray Mold on Fruit and Vegetables. *The Plant Pathology Journal*, 32(6), 570. <https://doi.org/10.5423/PPJ.NT.05.2016.0114>
- Kluxen, F. M., Roper, C. S., Jensen, S. M., & Koenig, C. M. (2022). Characterizing Local Acute Irritation Properties of Captan and Folpet with New Approach Methods. *Applied In Vitro Toxicology*, 8(3), 83–101. <https://doi.org/10.1089/aivt.2022.0004>
- Larios-Palacios, O. E., López-Vázquez, É. Y., Rodríguez, A. C., Ruíz-Espinoza, F. de J., Solano-Vidal, R., & Serrato-Cruz, M. Á. (2020). Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 11(3), 593–606. <https://doi.org/10.29312/REMEXCA.V11I3.2077>
- Leisen, T., Werner, J., Pattar, P., Safari, N., Ymeri, E., Sommer, F., Schroda, M., Suárez, I., Collado, I. G., Scheuring, D., & Hahn, M. (2022). Multiple knockout mutants reveal a high redundancy of phytotoxic compounds contributing to necrotrophic pathogenesis of *Botrytis cinerea*. *PLoS Pathogens*, 18(3). <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1010367>
- Liang, Q., Liu, W. Y., & Xu, W.-H. (2018). Chemical constituents from croton species and their biological activities. En *Molecules* (Vol. 23, Número 9). MDPI AG. <https://doi.org/10.3390/molecules23092333>
- Mahedi, M. (2025). Fungal Biocontrol in Agriculture: A Sustainable Alternative to Chemical Pesticides – A Comprehensive Review. *World Journal of Advanced Research and Reviews*, 26(1), 2305–2316. <https://doi.org/10.30574/wjarr.2025.26.1.0732>
- Martínez, O. M. M., Rivera, A. I. G., Álvarez, G. E. G., Osorio, N. P. D., & Hurtado, N. C. (2024). *In vitro* effect of polar extracts from *Annona glabra* seeds on

- Fusarium solani*. *Revista Caatinga*, 37. <https://doi.org/10.1590/1983-21252024v3711810rc>
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. (2022). *Atlas de histología vegetal y animal*. <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. A. (2024). *Técnicas histológicas Inclusión*. www.texstudio.org/
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. A. (2025, mayo 10). *Fijador FAA*. Universidad de Vigo. <http://mmegias.webs.uvigo.es/inicio.html>
- Megías, M., Molist, P., & Pombal, M. A. (2025). *Técnicas Histológicas. Protocolos*. Safranina, azul alcian o verde rápido. <https://mmegias.webs.uvigo.es/6-tecnicas/protocolos/p-tincion-safranina-a-v.php>
- Mesa, V. A. M., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., Monsalve, Z., Mesa, V. A. M., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., & Monsalve, Z. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 45(1), 23–30. https://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1669-23142019000100023&lng=es&nrm=iso&tlng=es
- Morales, R. J. E., & Meneses, Q. O. (2025). Evaluation of two *Bacillus* sp. strains as an alternative to chemical fungicides for controlling *Botrytis cinerea* in roses destined for preservation. *Comunicata Scientiae*, 16. <https://doi.org/10.14295/cs.v16.4332>
- Ninkuu, V., Zhang, L., Yan, J., Fu, Z., Yang, T., & Zeng, H. (2021). Biochemistry of terpenes and recent advances in plant protection. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 22, Número 11). MDPI. <https://doi.org/10.3390/ijms22115710>
- Pittaluga, D., Benedicto, D., Di Benedetto, A., & Marcella, G. (2003). *Efecto de la densidad de plantación sobre la productividad comercial en rosas para corte*. Portal frutícola. (2022). *Manual completo para producir rosas*. <https://www.portalfruticola.com/>

- Poveda, J., Barquero, M., & González-Andrés, F. (2020). Insight into the Microbiological Control Strategies against *Botrytis cinerea* Using Systemic Plant Resistance Activation. *Agronomy* 2020, Vol. 10, 10(11). <https://doi.org/10.3390/AGRONOMY10111822>
- Prophet, E. [Ed.] (1995). Métodos histotecnológicos. Ed. Instituto de Patología de las Fuerzas Armadas de los Estados Unidos de América (AFIP). E.U.A. pp. 55-57.
- Quintana-Obregón, E. A., Sánchez-Mariñez, R. I., Cortez-Rocha, M. O., & González-Aguilar, G. A. (2017). Actividad antifúngica *in vitro* de mezcla de terpenos de naranja contra *Alternaria tenuissima* *In vitro* antifungal activity of a mix orange terpenes against *Alternaria tenuissima*. *Scientia Fungorum*, 45, 7–12.
- Rajarammohan, S. (2021). Redefining Plant-Necrotroph Interactions: The Thin Line Between Hemibiotrophs and Necrotrophs. *Frontiers in Microbiology*, 12. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2021.673518>
- Rajput, V. D., Harish, Singh, R. K., Verma, K. K., Sharma, L., Quiroz-Figueroa, F. R., Meena, M., Gour, V. S., Minkina, T., Sushkova, S., & Mandzhieva, S. (2021). Recent Developments in Enzymatic Antioxidant Defence Mechanism in Plants with Special Reference to Abiotic Stress. *Biology* 2021, Vol. 10, 10(4). <https://doi.org/10.3390/BIOLOGY10040267>
- Raza, S., Miller, M., Hamberger, B., & Vermaas, J. V. (2023). Plant Terpenoid Permeability through Biological Membranes Explored via Molecular Simulations. *The Journal of Physical Chemistry. B*, 127(5), 1144. <https://doi.org/10.1021/ACS.JPCB.2C07209>
- Rezaee-Danesh, Y., Keskin, N., Najafi, S., Hatterman-Valenti, H., & Kaya, O. (2026). Next-Generation Biopesticides for the Control of Fungal Plant Pathogens. *Plants*, 15(2), 312. <https://doi.org/10.3390/plants15020312>
- Rezai, S., Sabzalian, M. R., Nikbakht, A., Zarei, H., Baroodkoo, S. S., & Beshkar, F. (2025). Roses exhibited higher production and postharvest longevity in

- response to nano-nutrients of Fe, Ca and Zn under LED supplemental lighting. *BMC Plant Biology*, 25(1). <https://doi.org/10.1186/s12870-025-07000-z>
- Santiago, S., Angelica, M., González, M., & Graciela, M. (2022). Crecimiento de *Fusarium* sp. en presencia de aceite esencial de *Citrus sinensis* (L.). *Revista Tendencias en Docencia e Investigación en Química*, 2022. <http://revistatediq.azc.uam.mx>Año8
- Scholz, P., Chapman, K. D., Ischebeck, T., & Guzha, A. (2023). Quantification of *Botrytis cinerea* Growth in *Arabidopsis thaliana*. *Bio-protocol*, 13(16). <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.4740>
- SEMARNAT. (2010). *NORMA OFICIAL MEXICANA NOM-059-SEMARNAT-2010*.
- Spada, M., Pugliesi, C., Fambrini, M., & Pecchia, S. (2024). Challenges and Opportunities Arising from Host–*Botrytis cinerea* Interactions to Outline Novel and Sustainable Control Strategies: The Key Role of RNA Interference. En *International Journal of Molecular Sciences* (Vol. 25, Número 12). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/ijms25126798>
- Sritharan, N., Sakthi, K. J., Djanaguiraman, M., Kumar, G. S., & Marimuthu, S. (2025). Terpenes: Multifunctional roles for plant survival and sustainable farming. *Plant Science Today*, 12(sp3), 1–13. <https://doi.org/10.14719/pst.8414>
- Steinmann, V. W. (2002). Diversidad y endemismo de la familia Euphorbiaceae en México. *Acta Botanica Mexicana*, (61), 61–93. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=57406107>
- T., E. B., & C., J. G. (2001). Eficacia de benomilo+captan y bc1000 en el control de *botrytis cinerea* y *alternaria alternata* en arándano alto (*Vaccinium corymbosum*) cv. Bluejay. *Agro Sur*, 29(1), 12–19. <https://doi.org/10.4206/AGROSUR.2001.V29N1-02>
- ToolsBox. (2026). *CIELAB Color Calculator*. <https://toolbox.io/colors/cielab-color-calculator>

- Ullah, I., Yuan, W., Khalil, H. B., Khan, M. R., Lak, F., Uzair, M., Abbas, A., Mirzadi Gohari, A., & Wu, H. (2024). Understanding *Botrytis cinerea* infection and gray mold management: a review paper on deciphering the rose's thorn. En *Phytopathology Research* (Vol. 6, Número 1). BioMed Central Ltd. <https://doi.org/10.1186/s42483-024-00262-9>
- Valdebenito, S., Rubio, A., Moller, A., Santa Cruz, J., Castillo, P., Providell, M. L., Cáceres, C., Calbucho, D., Hernández, I., & Peñaloza, P. (2025). Histological and Immunolabeling Techniques in Arabidopsis thaliana: A Practical Guide and Standardization Roadmap. En *Agronomy* (Vol. 15, Número 10). Multidisciplinary Digital Publishing Institute (MDPI). <https://doi.org/10.3390/agronomy15102357>
- Vargas-Hernández, M., Ayvar-Serna, S., Díaz-Nájera, J. F., Enciso-Maldonado, G. A., Alvarado-Gómez, O. G., & Ortiz-Martínez, A. I. (2021). *Actividad antifúngica de pesticidas biológicos, botánicos y químicos sobre el agente causal de la marchitez vascular del jitomate.*
- Velázquez-Jiménez, R., Hernández-Sosa, A., Martínez-Otero, D., González-Montiel, S., Sánchez-Ortega, I., & González-Ramírez, C. A. (2023). First 6, 7-Seco-Clerodane Furan Diterpenoid from Croton morifolius. *Records of Natural Products*, 17(1), 106–112. <https://doi.org/10.25135/rnp.332.2204-2422>
- Wang, H. (2023). Beneficial medicinal effects and material applications of rose. *Heliyon*, 10(1), e23530. <https://doi.org/10.1016/J.HELİYON.2023.E23530>
- Yan, Y., Li, M., Zhang, X., Kong, W., Bendahmane, M., Bao, M., & Fu, X. (2022). Tissue-Specific Expression of the Terpene Synthase Family Genes in Rosa chinensis and Effect of Abiotic Stress Conditions. *Genes*, 13(3). <https://doi.org/10.3390/genes13030547>
- Yin, X., Feng, L., & Gong, Y. (2023). Mitigating Ecotoxicity Risks of Pesticides on Ornamental Plants Based on Life Cycle Assessment. *Toxics*, 11(4). <https://doi.org/10.3390/toxics11040360>
- Yong Ania. (2004). El cultivo del rosal y su propagación. *Cultivos Tropicales*, 25, 53–60. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=193225911005>

- Zerdoner, M., Gabriëls, S., Arens, P., Visser, R. G. F., & Mishra, P. (2025). Detection of *Botrytis cinerea* severity in rose petals using hyperspectral imaging for plant breeding applications. *Computers and Electronics in Agriculture*, 233. <https://doi.org/10.1016/j.compag.2025.110210>
- Zhang, Y., Chen, H., Deng, S., Bai, Q., Zhang, Y., Zhao, H., Liu, K., Chu, Y., & Ren, L. (2025). Integrating phenotypic analyses and color parameters: a multidimensional framework for precise color characterization in eggplant fruit. *Frontiers in Plant Science*, 16. <https://doi.org/10.3389/fpls.2025.1689896>
- Zhao, Y., Zhu, X.-X., Li, X., Xu, J.-B., & Gao, F. (2025). Diterpenoids from the genus *Croton* and their biological activities. *Archives of Pharmacal Research*, 48(11–12), 1023–1093. <https://doi.org/10.1007/s12272-025-01588-4>