



Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.

Posgrado en Ciencias Biológicas

**EFFECTO ANTIFÚNGICO DE PLANTAS NATIVAS DE LA
PENÍNSULA DE YUCATÁN EN PATÓGENOS DEL
CHILE HABANERO**

Tesis que presenta

PATRICIA CRUZ CERINO

En opción al título de

DOCTOR EN CIENCIAS

(Ciencias Biológicas: Opción Biotecnología)

Mérida, Yucatán, México

2022

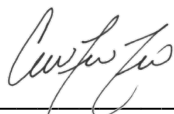
CENTRO DE INVESTIGACIÓN CIENTÍFICA DE YUCATÁN, A. C.
POSGRADO EN CIENCIAS BIOLÓGICAS



RECONOCIMIENTO

Por medio de la presente, hago constar que el trabajo de tesis de la **M. en C. Patricia Cruz Cerino** titulado “**Efecto antifúngico de plantas nativas de la península de Yucatán en patógenos del chile habanero**”, fue realizado en el Laboratorio de Productos Naturales de la **Unidad de Biotecnología** del **Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C.** y en el **Tecnológico Nacional de México campus Conkal**, en el área de Fitopatología, bajo la dirección de la **Dra. María Marcela Gamboa Angulo** y el **Dr. Jairo Cristóbal Alejo**, dentro de la opción de Biotecnología, perteneciente al Programa de Posgrado en Ciencias Biológicas de este Centro.

Atentamente



Dra. Cecilia Hernández Zepeda
Directora de Docencia

Mérida, Yucatán, México, a 07 de marzo de 2022

DECLARACIÓN DE PROPIEDAD

Declaro que la información contenida en la sección de Materiales y Métodos Experimentales, los Resultados y Discusión de este documento proviene de las actividades de experimentación realizadas durante el período que se me asignó para desarrollar mi trabajo de tesis, en las Unidades y Laboratorios del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y que a razón de lo anterior y en contraprestación de los servicios educativos o de apoyo que me fueron brindados, dicha información, en términos de la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, le pertenece patrimonialmente a dicho Centro de Investigación. Por otra parte, en virtud de lo ya manifestado, reconozco que de igual manera los productos intelectuales o desarrollos tecnológicos que deriven o pudieran derivar de lo correspondiente a dicha información, le pertenecen patrimonialmente al Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C. y en el mismo tenor, reconozco que si derivaren de este trabajo productos intelectuales o desarrollos tecnológicos, en lo especial, estos se registrarán en todo caso por lo dispuesto por la Ley Federal del Derecho de Autor y la Ley de la Propiedad Industrial, en el tenor de lo expuesto en la presente Declaración.



PATRICIA CRUZ CERINO

Este trabajo se llevó a cabo en el Laboratorio de Productos Naturales en la Unidad de Biotecnología, del Centro de Investigación Científica de Yucatán, y forma parte del proyecto CONACYT PDCN-2015-266 en el que se participó bajo la dirección de la Dra. Marcela Gamboa Angulo

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por la beca otorgada para mis estudios de Doctorado con No. 661906.

Agradezco al proyecto “Aplicaciones biotecnológicas en farmacia y agricultura de productos naturales obtenidos de la flora nativa de la península de Yucatán, promocionando su propagación, conservación y uso sostenible” con número PDCN-2015-266, por el apoyo para la presentación de parte de los resultados en el XXI Congreso Internacional & XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, en la Ciudad de Morelia, del 24-28 de agosto de 2019.

Al CICY, por las instalaciones y por crear el espacio adecuado para la generación de conocimiento.

Con especial agradecimiento al Tecnológico Nacional de México, campus Conkal, por haberme permitido utilizar sus instalaciones y realizar una parte de mi trabajo de tesis. Quiero agradecer, en especial al Dr. Jairo Cristóbal Alejo, por su apoyo y hospitalidad en el laboratorio de Fitopatología durante la realización de algunos experimentos y haber compartido conmigo sus conocimientos. A la Dra. Felicia Amalia Moo Koh le agradezco su asesoría y apoyo técnico.

Muy en especial, a mi directora de tesis la Dra. Marcela Gamboa Angulo, por depositar en mí su confianza, por su tiempo invertido en este trabajo. Agradezco su apoyo incondicional, y por compartir sabios consejos que me han servido a lo largo de mi formación profesional, para ir mejorando día a día, siempre admiraré su dedicación y amor por la investigación.

A los miembros del comité tutorial, por sus revisiones y sugerencias para la mejora de este trabajo: Dr. Jairo Cristóbal Alejo, Dra. Violeta Ruiz Carrera y Dra. Marina Vera Ku.

A mis sinodales de examen predoctoral, la Dra. Daisy de la Caridad Pérez Brito y al Dr. Arturo Reyes Ramírez por puntualizar mis carencias, teniendo la voluntad de corregir, proponer y ayudar, para reenfocar mis fortalezas.

Al Dr. Sergio R. Peraza Sánchez, por el apoyo profesional y académico brindado.

A la Dra. Violeta Ruiz Carrera, por impulsarme a continuar con mi formación académica, mil gracias por su apoyo y amistad brindada a lo largo de estos años.

Un agradecimiento, al Dr. Germán Carnevali Fernández-Concha y a los M.C José Luis Tapia y Jesús Aviles Gomez por el apoyo en la colectas e identificación del material vegetal utilizado en este trabajo.

Gracias a la I.Q. Leticia Medina Baizabal, y al M.C Luis W. Torres Tapia, por su apoyo técnico en el laboratorio y por la paciencia que me brindaron para comprender y desarrollar cada uno de los experimentos y al técnico Felipe Alonso Barredo Pool, por su asesoría para la observación de muestras en el microscopio eléctrico de barrido.

Un agradecimiento a mis compañeros del CICY y aquellas personas que de una u otra forma contribuyeron en mi formación profesional. A todos muchas GRACIAS.

LISTA DE LOS PRODUCTOS GENERADOS

1. Cruz-Cerino, P., Cristóbal-Alejo, J., Ruiz-Carrera, V., Carnevali, G., Vera-Ku, M., Martín, J., Reyes, F., Gamboa-Angulo, M. (2020). Extracts from six native plants of the Yucatán peninsula hinder mycelial growth of *Fusarium equiseti* and *F. oxysporum*, pathogens of *Capsicum chinense*. *Pathogens*, 9, 827. Doi: 10.3390/pathogens9100827
2. XXI Congreso Internacional y XLVI Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología, en la Ciudad de Morelia, del 24-28 de agosto de 2019.

DEDICATORIAS

A Dios, por ser mí guía y mi fuente de sabiduría, y darme la fuerza para continuar en este proceso de obtener uno de los anhelos más deseados.

A mis padres, quienes han sido el motivo, ejemplo y el impulso para concluir esta travesía del conocimiento, por inculcarme valores y principios, y por brindarme el apoyo, y enseñarme a luchar día con día sin decaer. Les expreso que el tiempo que le he restado a nuestra convivencia, hoy rinde un logro más, de cuya satisfacción, quiero hacerles partícipes.

En especial,

A mi madre Leticia, ejemplo de amor, entrega y esfuerzo.

A mis hermanas Mireya y Jheny con agradecimiento, pues este logro obtenido es uno más de orgullo y satisfacción para la familia Cruz Cerino.

En especial a Rodolfo, mil gracias, por tu apoyo incondicional y palabras de motivación, a pesar de la distancia has sabido estar presente en cada paso importante de mi vida.

A mis familiares, es especial a mis Tías Conchy y Charito, mi abuelita Guadalupe, por brindarme consejos de motivación que fueron importantes para concluir con éxito esta etapa de mi formación profesional.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	1
CAPÍTULO I.....	3
ANTECEDENTES.....	3
1. Chile habanero (<i>Capsicum chinense</i> Jacq.)	3
1.1. Clasificación taxonómica del chile habanero	3
1.2. Importancia económica del chile habanero	4
1.3. Enfermedades que afectan al cultivo de chile habanero.....	5
1.4. Hongos fitopatógenos estudiados	5
1.4.1. <i>Corynespora cassiicola</i> Berk & Curt.	6
1.4.1.1. Descripción microscópica y macroscópica	6
1.4.1.2. Enfermedad que ocasiona y cultivos que afecta <i>Corynespora cassiicola</i>	6
1.4.1.3. Control de <i>Corynespora cassiicola</i>	7
1.4.2. <i>Curvularia lunata</i> (Wakker) Boedijn	7
1.4.2.1. Descripción microscópica y macroscópica	7
1.4.2.2. Enfermedad que ocasiona y cultivos que afecta <i>Curvularia lunata</i>	7
1.4.2.3. Control de <i>Curvularia lunata</i>	8
1.4.3. <i>Fusarium equiseti</i> Corda Sacc.	8
1.4.3.1. Descripción microscópica y macroscópica	8
1.4.3.2. Enfermedad que ocasiona y cultivos que afecta <i>Fusarium equiseti</i>	9
1.4.3.3. Control de <i>Fusarium equiseti</i>	9
1.4.4. <i>Fusarium oxysporum</i> Sacc. W.C.	9
1.4.4.1. Descripción microscópica y macroscópica	9
1.4.4.2. Enfermedad que ocasiona y cultivos que afecta <i>F. oxysporum</i>	10
1.4.4.3. Control de <i>F. oxysporum</i>	10

1.5. Alternativas naturales para el control de fitopatógenos	10
1.6. Extractos vegetales como fuente de metabolitos.....	10
1.7. Estudios fitoquímicos y actividad biológica de las especies estudiadas	13
1.8. Bioensayos antifúngicos.....	23
1.8.1. Dilución en agar	23
1.8.2. Bioensayo por microdilución.....	23
1.8.3. Concentración Inhibitoria Media (CI ₅₀).....	24
1.8.4. Ensayo de detección de efecto fungicida o fungistático.....	24
1.8.5. Bioautografía.....	24
HIPÓTESIS.....	25
OBJETIVO GENERAL	25
OBJETIVO ESPECÍFICOS	25
ESTRATEGIA EXPERIMENTAL.....	26
 CAPÍTULO II. Extracts from Six Native Plants of the Yucatán Peninsula Hinder Mycelial Growth of <i>Fusarium equiseti</i> and <i>F. oxysporum</i> , Pathogens of <i>Capsicum chinense</i>	 28
.....	28
2.1. INTRODUCTION.....	28
2.2. Materials and Methods	30
2.2.1. Plant Materials	30
2.2.2. Preparation of plant extracts.....	33
2.2.2.1. Aqueous extracts	33
2.2.2.2. Ethanolic extracts	33
2.2.3. Fungal cultures.....	34
2.2.4. Antifungal microdilution assay of extracts.....	34
2.2.4.1. Preparation of conidial suspension.....	34

2.2.4.2. Bioassay with ethanolic extracts.....	35
2.2.5. Minimum inhibitory concentration of active EEs and fractions	35
2.2.6. Effect of ethanolic extracts on hyphal morphology of <i>Fusarium</i> strains.....	36
2.2.7. Chromatographic and spectrometric analyses.....	36
2.2.7.1. Thin Layer Chromatography (TLC).....	36
2.2.7.2. LC-UV-HRMS.....	37
2.2.8. Statistical analyses.....	37
2.3. Results.....	38
2.3.1. Antifungal activity of plant extracts against <i>Fusarium</i> spp.....	38
2.3.2. Minimum inhibitory concentration of ethanolic extracts, fractions and α -asarone.....	39
2.3.3. Inhibitory Concentration (IC ₅₀ and IC ₉₅)	40
2.3.4. Effect of active extracts from <i>Mosannonna depressa</i> on morphology of <i>Fusarium</i> strains.....	41
2.3.5. Identification of active components in extracts from <i>Mosannonna depressa</i> by LC-UV-HRMS	43
2.4 Discussion.....	46
CAPÍTULO III Control <i>in vitro</i> y en frutos postcosecha de <i>Capsicum chinense</i> de <i>Curvularia lunata</i> con extractos de plantas de la Península de Yucatán.....	
.....	51
3.1. INTRODUCCIÓN	51
3.2. MATERIALES Y MÉTODOS	52
3.2.1. Cepa estudiada.....	52
3.2.2. Material vegetal.....	52
3.2.3. Preparación de extractos vegetales	54
3.2.3.1. Extractos acuosos	54
3.2.3.2. Extractos etanólicos y sus fracciones	54
3.2.4. Ensayo antifúngico por microdilución contra <i>Curvularia lunata</i>	54

3.2.4.1. Preparación de la suspensión de esporas.....	54
3.2.4.2. Bioensayo antifúngico de los extractos acuosos (EA) y etanólicos (EE) contra <i>Curvularia lunata</i> (ITC26).....	54
3.2.4.3. Concentración mínima inhibitoria de extractos EEs y fracciones.....	55
3.2.5. Efecto de extractos activos sobre la morfología hifal de <i>Curvularia lunata</i>	55
3.2.6. Efecto <i>in vivo</i> de <i>M. depressa</i> , <i>P. neesianum</i> y α -asarona contra <i>Curvularia lunata</i> en frutos de chile habanero	55
3.2.8. Análisis estadístico.....	57
3.3. Resultados.....	58
3.3.1. Actividad antifúngica de extractos vegetales contra <i>Curvularia lunata</i>	58
3.3.2. Concentración inhibitoria mínima de extractos de EE y fracciones.....	58
3.3.3. Concentración inhibitoria (CI ₅₀ y CI ₉₅) de los extractos más activos, fracciones y α -asarona	59
3.3.4 Efecto de los extractos de <i>Mosannonna depressa</i> corteza del tallo y raíz sobre la morfología hifal de <i>Curvularia lunata</i>	60
3.3.5. Efecto <i>in vivo</i> de <i>M. depressa</i> , <i>P. neesianum</i> y α -asarona contra <i>Curvularia lunata</i> en frutos de chile habanero	61
3.4. DISCUSIÓN.....	64
CAPÍTULO IV Actividad antifúngica de los extractos de <i>Mosannonna depressa</i> y <i>Piper neesianum</i> contra <i>Corynespora cassiicola</i> , patógeno de chile habanero.....	67
.....	67
4.1. INTRODUCCIÓN.....	67
4.2. MATERIALES Y MÉTODOS.....	68
4.2.1. Preparación de extractos vegetales y α -asarona.....	68
4.2.2. Material fúngico.....	68
4.2.3. Bioensayos antifúngicos de extractos etanólicos contra <i>Corynespora cassiicola</i>	69
4.2.3.1. Bioensayo antifúngico por la técnica de minidisco.....	69

4.2.3.2. Bioensayo antifúngico de dilución en agar	69
4.2.3.3. Bioensayo antifúngico <i>in vitro</i> en discos de hoja	71
.....	72
4.2.4. Bioensayo de inocuidad en semillas de <i>Lactuca sativa</i>	72
.....	73
4.2.5. Bioensayo de inocuidad de extractos en <i>Eisenia fetida</i> (Savigny)	73
4.3. Resultados	75
4.3.1. Efecto antifúngico de los extractos etanólicos con la técnica de minidisco	75
4.3.2. Efectividad antifúngica de extractos etanólicos en el ensayo de dilución en agar.....	76
4.3.3. Efectividad <i>in vitro</i> de extractos activos en disco de hoja de chile habanero	77
4.3.4. Efecto de extractos activos en semillas de <i>Lactuca sativa</i>	78
4.3.5. Efecto de inocuidad de extractos activos en <i>Eisenia fetida</i>	80
4.4. DISCUSIÓN	83
5. CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS	86
5.1 CONCLUSIONES GENERALES	86
5.2 PERSPECTIVAS.....	87
REFERENCIAS	89
ANEXOS.....	118

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1.1 a) Mancha foliar por <i>Corynespora cassiicola</i> , b) necrosis de fruto por <i>Curvularia lunata</i> y c) marchitez de chile por patógenos del género <i>Fusarium</i> (<i>Fusarium equiseti</i> y <i>F. oxysporum</i>).	5
Figura 1.2. <i>Corynespora cassiicola</i> a) aspecto de la colonia en medio de cultivo PDA a los siete días y b) esporas de <i>C. cassiicola</i> visualizadas en aumento de 100x.	6
Figura 1.3 <i>Curvularia lunata</i> a) aspecto de la colonia en medio de cultivo PDA a los siete días y b) esporas de <i>C. lunata</i> visualizadas en aumento de 100x.	7
Figura 1.4 <i>Fusarium equiseti</i> a) aspecto de la colonia en medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA) a los 7 días y b) esporas de <i>F. equiseti</i> visualizadas en aumento de 100x.....	8
Figura 1.5 <i>Fusarium oxysporum</i> a) aspecto de la colonia en medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA) a los siete días y b) esporas de <i>F. oxysporum</i> visualizadas en aumento de 100x.	10
Figura 1.6. Estrategia experimental para la evaluación antifúngica de extractos orgánicos contra hongos fitopatógenos asociados al chile habanero. MEB: microscopio electrónico de barrido.	26
Figure 2.1 Plant material processing a) separation, b) drying and c) milling and d) storage..	31
Figure 2.2 Obtaining aqueous extracts from dry plants.....	33
Figure 2.3 Ethanolic extracts of plant species.....	34
Figure 2.4. <i>Fusarium equiseti</i> strain FCHE morphology (A) after 7 d on potato dextrose agar; (B) microconidia of <i>F. equiseti</i> 1000x and (C) typical untreated mycelium and microconidia (negative control); (D) apparently normal microconidium and (E) distorted mycelium and collapsed microconidia after 96 h treatment with ethanolic extract from <i>Mosannonna depressa</i> stem bark at 2000 µg/mL; (F) rough surface of a collapsed-looking microconidium after 96 h treatment with 2000 µg/mL ethanolic extract from <i>M. depressa</i> root bark.	42
Figure 2.5. <i>Fusarium oxysporum</i> strain FCHJ morphology (A) after 7 d on potato dextrose agar (PDA). (B) Microconidia 1000x and (C) typical mycelium and microconidia (negative control); (D) apparently normal microconidia, (E) misshapen and collapsed microconidium after 96 h treatment with ethanolic extract from <i>Mosannonna depressa</i> stem bark at 2000 µg/mL; (F) collapsed conidium after 96 h treatment with ethanolic extract from <i>M. depressa</i> root bark at 2000 µg/mL.	42

Figure 2.6. (A) Liquid chromatogram (UV 210 nm) of acetonitrile fraction from stem bark of *Mosannonna depressa* (MDT-b). **1:** Not identified (C₁₂H₁₆O₄), **2:** asaraldehyde, **3:** α-asarone, **4:** not identified, **5:** *trans*-isomyristicin. **(B)** UV spectrum of peak **3** and **(C)** high-resolution mass spectrum of peak **3**.44

Figure 2.7. (A) Liquid chromatogram (UV at 210 nm) of the acetonitrile fraction from *Mosannonna depressa* root bark (MDR-b); **1:** α-asarone **2:** 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl) benzene. **(B)** UV spectrum of peak 2 and **(C)** high-resolution mass spectra of peak **2**.45

Figura 3.1 Morfología de la cepa ITC26 *Curvularia lunata*. **(A)** Después de siete días en agar papa dextrosa; **(B)** conidióforo y conidios de *C. lunata* 1,000x; **(C)** micrografía de micelio bien formado y microconidios con crecimiento normal (control negativo); **(D)** conidio contorsionado por efecto del extracto etanólico de *M. depressa* (corteza de tallo) a 2,000 µg/mL; **(E)** conidio deshidratado por efecto del extracto etanólico de *M. depressa* (corteza de raíz) a 2,000 µg/mL; **(F)** conidios colapsados después de 96 h del tratamiento con el estándar comercial α-asarona a 500 µg/mL.....61

Figura 3.2. Efectividad *in vivo* de los EEs de la corteza del tallo de *M. depressa* (MDT), hojas de *P. neesianum* (PNH) a 750, 500 y 250 µg/mL, y la α-asarona a 500, 250 y 125 µg/mL en frutos de chile habanero contra *Curvularia lunata*. Control negativo: suspensión de conidios, positivo: procloraz a 450 µg/mL y Tween 80 al 1%.63

Figura 4.1. Efecto antifúngico de los extractos etanólicos (EE) a 2000 µg/mL. EE: disco de micelio+ 10 µL del EE y controles CN1: disco de micelio; CN2: DMSO+Tween 20 al 0.5%; en el crecimiento micelial de *Corynespora cassiicola*.69

Figura 4.2. Bioensayo de dilución en agar.....70

Figura 4.3. Efectividad *in vitro* de extractos etanólicos en hoja de chile habanero contra *Corynespora cassiicola*.....72

Figura 4.4 Bioensayo de inocuidad de extractos etanólicos activos en semillas de *Lactuca sativa*.73

Figura 4.5. Bioensayo de inocuidad de extractos etanólicos activos en *Eisenia fetida*. **a)** pesado de lombrices, **b)** aplicación de extractos EE y α-asarona en papel filtro, **c)** aplicación de 1 mL de agua destilada, **d)** y **e)** colocación de una lombriz por vial/20 repeticiones por tratamiento...74

Figura 4.6. Efecto antifúngico de EEs a 2,000 µg/mL en el crecimiento micelial de *C. cassiicola* (Técnica de minidisks). **AAH:** *A. amorphoides* (hojas), **CJC:** *C. jamaicensis* (completa), **HBH:** *H. baruensis* (hojas), **MDT:** *M. depressa* (corteza de tallo), **MDR:** *M. depressa* (corteza de raíz),

PNH: *P. neesianum* (hojas), **PNR:** *P. neesianum* (raíz), **PCR:** *P. cubana* (raíz). **CN1:** PDA+ disco de micelio, **CN2:** DMSO+Tween 20 al 0.5% **CP:** procloraz al 0.11%.76

Figura 4.7. Efecto de los extractos etanólicos sobre el crecimiento micelial de *Corynespora cassiicola* ITC7. **a)** MDT (1,000 µg/mL), **b)** MDT (500 µg/mL), **c)** MDT (250 µg/mL), **d)** MDR (1,000 µg/mL), **e)** PNH (1,000 µg/mL), **f)** α-asarona (500 µg/mL), **g)** α-asarona (250 µg/mL), **h)** α-asarona (125 µg/mL), **i)** control positivo (procloraz), **j)** control negativo (DMSO+ disco de micelio). ...77

Figura 4.8. Efectividad de los EEs promisorios sobre la inhibición de *Corynespora cassiicola* en el ensayo de disco foliar después de siete días de incubación. **a)** MDT: (corteza de tallo) 50 µg/cm², **b)** MDT: 25 µg/cm², **c)** PNH: (hojas) 50 µg/cm², **d)** PNH: 25 µg/cm², **e)** α-asarona: 25 µg/cm², **f)** α-asarona: 12.5 µg/cm². **Controles:** **g)** suspensión de fragmento de micelio, **h)** disolución al 1% de DMSO-Tween 20 al 0.5%, **i)** procloraz al 0.11%.78

Figura 4.9. Efecto de extractos etanólicos sobre el porcentaje de germinación en lechuga a los siete días de exposición a 125 µg/cm². **CN:** MeOH; **MDT:** *M. depressa* (corteza de tallo); **MDR:** *M. depressa* (corteza de raíz); **PNH:** *P. neesianum* (hojas); **α-asar:** α-asarona y **DCRM-5B:** control positivo natural a 62.5 µg/cm². Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey $p=0.05$).79

Figura 4.10. Efecto en el crecimiento radicular por la exposición de extractos etanólicos en semillas de lechuga. **a)** control negativo: MeOH; **b)** extracto MDT; **c)** MDR; **d)** PNH; **e)** α-asarona; **f)** control positivo natural: (DCRM-5B).79

Figura 4.11. Efecto de extractos etanólicos sobre el porcentaje de crecimiento radicular en semillas de lechuga: **a)** control negativo: MeOH; **b)** extracto MDT; **c)** MDR; **d)** PNH; **e)** α-asarona; **f)** control positivo natural: DCRM-5B. %ICR: Inhibición del crecimiento radicular.80

Figura 4.12. Bioensayo de inocuidad de extractos etanólicos contra *Eisenia fetida*: **a)** MDT; **b)** PNH, **c)** α-asarona, **d)** control negativo: MeOH; **e)** control positivo comercial: Vydate® (oxamil) y **f)** control positivo natural: DCRM-5B.81

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1.1. Clasificación taxonómica del chile habanero.....	4
Cuadro 1.2. Extractos vegetales con efecto antifúngico frente a las especies de hongos <i>Corynespora cassiicola</i> <i>Curvularia lunata</i> , <i>Fusarium equiseti</i> y <i>Fusarium oxysporum</i>	11
Cuadro 1.3. Estudios fitoquímicos y actividad biológica de las 40 especies de plantas estudiadas.	15
Table 2.1. Plants collected from the Yucatán Peninsula to screen for activity against <i>F. equiseti</i> strain FHCE and <i>F. oxysporum</i> strain FCHJ.	31
Table 2.2. Numerical scale for mycelial growth inhibition readings in the microdilution bioassay (CLSI, 2002).	35
Table 2.3 Inhibition of mycelial growth of <i>Fusarium equiseti</i> strain FCHE and <i>F. oxysporum</i> strain FCHJ by active plant extracts from native species of the Yucatán Peninsula in microdilution assay.	38
Table 2.4. Minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts and fractions from <i>Mosannonna depressa</i> (bark of stems and roots), <i>P. cubana</i> (roots), <i>P. neesianum</i> (leaves) and α -asarone against <i>Fusarium equiseti</i> strain FCHE and <i>F. oxysporum</i> strain FCHJ.	40
Table 2.5. IC ₅₀ and IC ₉₅ of active extracts and fractions from <i>Mosannonna depressa</i> , <i>Parathesis cubana</i> , <i>Piper neesianum</i> and of the commercial standard α -asarone against mycelial growth of <i>Fusarium equiseti</i> strain FCHE and <i>F. oxysporum</i> strain FCHJ.....	41
Table 2.6. Metabolites identified from acetonitrile fraction of <i>Mosannonna depressa</i> stem bark (MDT-b) by liquid chromatography–ultraviolet–high-resolution mass spectrometry (LC-UV-HRMS).....	43
Table 2.7. Compounds identified in the acetonitrile fraction of the ethanolic extract of <i>Mosannonna depressa</i> root bark (MDR-b) using LC-UV-HRMS.	45
Cuadro 3.1. Lista de plantas colectadas para el bioensayo de actividad antifúngica contra la cepa <i>C. lunata</i> ITC26.....	53

Cuadro 3.2. Escala para evaluar la severidad ocasionada por el fitopatógeno <i>Curvularia lunata</i> en frutos de <i>Capsicum chinense</i> (Sandoval <i>et al.</i> , 2011).....	56
Cuadro 3.3. Inhibición (%) del crecimiento micelial de los extractos acuosos (3%, p/v) y etanólicos (2,000 µg/mL) del fitopatógeno <i>Curvularia lunata</i> ITC26 en el bioensayo de microdilución. ...	58
Cuadro 3.4 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos activos y fracciones de <i>M. depressa</i> (corteza de tallo y raíces) y <i>P. neesianum</i> (hoja), contra <i>Curvularia lunata</i> en el ensayo de microdilución.	59
Cuadro 3.5. Concentraciones inhibitorias (CI ₅₀ y CI ₉₅) de extractos activos y fracciones de <i>Mosannonna depressa</i> , <i>Piper neesianum</i> y el estándar comercial α-asarona en el crecimiento micelial de <i>Curvularia lunata</i>	60
Cuadro 3.6. Efectividad de los extractos EEs de la corteza de <i>Mosannonna depressa</i> , hojas de <i>Piper neesianum</i> y α-asarona en el control de la infección de <i>Curvularia lunata</i> en frutos de chile habanero.....	62
Cuadro 4.1 Efecto antifúngico de los extractos etanólicos activos contra <i>C. cassiicola</i> con la técnica de minidiscos.	75
Cuadro 4.2 Efectividad de los extractos etanólicos contra <i>Corynespora cassiicola</i> (ITC7), mediante el bioensayo de dilución en agar.	77
Cuadro 4.3. Inocuidad de los extractos etanólicos a diferentes concentraciones contra <i>Eisenia fetida</i> y concentración letal (CL ₅₀ y CL ₉₀) de <i>M. depressa</i> y el estándar α-asarona en <i>Eisenia fetida</i> a las 72 h.....	81

ABREVIATURAS Y SIGLAS

CMI: Concentración mínima inhibitoria

CI₅₀: Concentración inhibitoria media

CL₅₀: Concentración letal media

CL₉₀: Concentración letal 90

DMSO: Dimetilsulfóxido

EA: Extracto acuoso

EE: Extracto etanólico

PDA: Agar papa y dextrosa

RPMI: Roswell Park Memorial Institute

µg: Microgramo

µL: Microlitro

LC-UV-HRMS: Cromatografía líquida-ultravioleta acoplado a espectrometría de masas de alta resolución, por sus siglas en inglés

RESUMEN

Las plantas regionales representan una valiosa fuente de metabolitos secundarios bioactivos para el control biorracional de las enfermedades de los cultivos en México, en particular del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). En el presente estudio el objetivo fue evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de extractos acuosos (EAs) y etanólicos (EEs) obtenidos de 40 plantas de la península de Yucatán contra cuatro hongos patógenos del chile habanero, así como la efectividad e inocuidad de los más promisorios *in vivo*.

Un total de 184 EAs y EEs obtenidos de hojas, tallos y raíces de 40 especies nativas de la península de Yucatán se evaluaron *in vitro* contra *Fusarium equiseti*, *F. oxysporum* y *Curvularia lunata* y ocho EEs activos contra *Corynespora cassiicola*, cepas patógenas aisladas de *C. chinense*. Los resultados de los ensayos *in vitro* mostraron a los EEs de la corteza de *Mosannonna depressa* y las hojas de *Piper neesianum* con el mayor efecto antifúngico contra los cuatro fitopatógenos. Entre los EAs, únicamente *Calea jamaicensis* afectó a *F. equiseti* (ICM=75%) al 3%. Posteriormente, los EEs activos se particionaron con disolventes de polaridad ascendente, detectando a las fracciones de mediana polaridad (MDT-b) de *M. depressa* con la más baja CI_{50} de 388-472 $\mu\text{g/mL}$ contra *C. lunata*, *F. equiseti* y *F. oxysporum*. El análisis de LC-HRMS reveló a la α -asarona como el componente mayoritario de la fracción MDT-b, cuyo estándar mostró una CI_{50} de 190, 236 y 488 $\mu\text{g/mL}$ contra *C. lunata*, *F. equiseti* y *F. oxysporum*, respectivamente. Las micrografías obtenidas con el microscopio electrónico de barrido mostraron hifas y conidios distorsionados y colapsados por el efecto de los EEs de *M. depressa* a 2,000 $\mu\text{g/mL}$, después de 96 h de tratamiento en *C. lunata*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*. *In vivo*, el EE de *M. depressa* y la α -asarona controlaron al 100% la severidad de *C. lunata* en frutos de *C. chinense* a 750 y 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. En cuanto a *C. cassiicola*, *in vitro* únicamente la α -asarona mostró una ICM del 91% a 500 $\mu\text{g/mL}$. En discos foliares de *C. chinense*, el crecimiento micelial de *C. cassiicola* se inhibió completamente con la aplicación del EE de *M. depressa* (50 $\mu\text{g/cm}^2$) y la α -asarona (25 $\mu\text{g/cm}^2$), a los siete días de exposición. Los resultados de los ensayos de inocuidad revelaron que el EE de *M. depressa* y la α -asarona son inocuos a la germinación de lechuga a la concentración de 125 y 62.5 $\mu\text{g/cm}^2$, respectivamente, aunque esta última afectó ligeramente a las lombrices con CL_{50} de 325 $\mu\text{g/mL}$, a las 72 horas de aplicación. En conclusión, la especie *M. depressa* es una candidata promisoriosa para continuar siendo investigada *in vivo* en condiciones protegidas como una alternativa para el control de hongos fitopatógenos.

ABSTRACT

Regional plants represent a valuable source of bioactive secondary metabolites for the biorational control crop diseases in Mexico, mainly habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.). In the present study, the objective was to evaluate *in vitro* the antifungal activity of aqueous extracts (EAs) and ethanolic extracts (EEs) obtained from 40 plants from the Yucatan Peninsula against four pathogenic fungi of habanero pepper, as well as the effectiveness and safety of the more promising ones *in vivo*.

A total of 184 EAs and EEs obtained from leaves, stems, and roots of 40 native plant species of the Yucatan Peninsula were evaluated *in vitro* against *Fusarium equiseti*, *F. oxysporum* and *Curvularia lunata* and eight active EEs against *Corynespora cassiicola*, pathogenic strains isolated from *C. chinense*. The *in vitro* tests showed the EEs from *Mosannonna depressa* bark and *Piper neesianum* leaves with the highest antifungal effect against the four phytopathogens. Among the AEs, only *Calea jamaicensis* affected *F. equiseti* (MIC=75%) at 3%. Subsequently, the active EEs were partitioned with solvents of ascending polarity, detecting the medium polarity fractions of *M. depressa* (MDT-b) with the lowest IC₅₀ of 388-472 µg/mL against *C. lunata*, *F. equiseti*, and *F. oxysporum*. LC-HRMS analysis revealed α-asarone as the major component of the MDT-b fraction, whose standard showed an IC₅₀ of 190, 236, and 488 µg/mL against *C. lunata*, *F. equiseti* and *F. oxysporum*, respectively. Micrographs obtained by scanning electron microscopy showed distorted and collapsed hyphae and conidia due to the effect of the EEs of *M. depressa* at 2,000 µg/mL, after 96 h of treatment in *C. lunata*, *F. equiseti*, *F. oxysporum*. *In vivo*, EEs of *M. depressa* and α-asarone 100% controlled the severity of *C. lunata* on *C. chinense* fruits at 750 and 500 µg/mL, respectively. As for *C. cassiicola*, *in vitro* only the α-asarone showed a MIC of 91% at 500 µg/mL. On foliar discs of *C. chinense*, the mycelial growth of *C. cassiicola* was inhibited by application of the EE from *M. depressa* (50 µg/cm²) and α-asarone (25 µg/cm²) after seven days of the exposition. The results of the safety tests revealed that EE from *M. depressa* and α-asarone were innocuous to lettuce seed germination at concentrations of 125 and 62.5 µg/cm², respectively. Although the latter slightly affected earthworms with LC₅₀ of 325 µg/mL, at 72 hours after application controlling the pathogen *F. oxysporum* with a 482 µg/mL of concentration. In conclusion, *M. depressa* species is a promising candidate for further *in vivo* research under protected conditions as an alternative for the control of phytopathogenic fungi.

INTRODUCCIÓN

El chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) es una especie hortícola de importancia económica en México, la de mayor producción se concentra en la península de Yucatán. El consumo del fruto es parte de la identidad culinaria de esta región (SIAP, 2017; Ruiz-Lau *et al.*, 2011) y aporta beneficios a la salud como antioxidante, antitumoral y antimicrobiano; por ser fuente potencial de metabolitos secundarios conocidos como capsaicinoides (Naves *et al.*, 2019; Wahyuni *et al.*, 2013; Srinivasan *et al.*, 2015).

Las enfermedades causadas por microorganismos patógenos producen pérdidas de producción en el cultivo de chile habanero que oscilan del 10 al 100%, esta es la segunda principal limitante de su producción, precedida por los insectos (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006). El chile habanero es atacado comúnmente por fitopatógenos como *Corynespora cassiicola* Berk & Curt., *Curvularia lunata* Wakker Boedijn, *Fusarium equiseti* Corda Sacc. y *Fusarium oxysporum* Sacc. W.C. (Mejía-Bautista *et al.*, 2016a; Cristóbal-Alejo *et al.*, 2013; Mis-Mut, 2015).

Actualmente, el manejo fitosanitario de estos patógenos es dependiente del uso de fungicidas sintéticos, con sus consecuentes efectos colaterales como la resistencia en las cepas fúngicas, acumulación de residuos tóxicos en los productos agrícolas, contaminación ambiental, daños en los microorganismos benéficos y salud humana (Carvalho, 2017; Gaherwal *et al.*, 2015). Por lo tanto, los productos naturales derivados de plantas, representan una alternativa de control biorracional para el manejo de estos patógenos por sus características biodegradables y de baja o nula toxicidad en organismos benéficos. Lo anterior implica reducción de riesgos para el hombre, animales y biodiversidad asociada al cultivo de chile habanero (Walia *et al.*, 2017; Ramírez-Mares y Hernández-Carlos, 2015).

El enorme interés por encontrar nuevos fungicidas naturales que sean amigables con el ambiente, para controlar enfermedades por hongos en cultivos de importancia agrícola, ha conducido al estudio de especies de plantas no consideradas previamente. Con este enfoque, el grupo de investigación en productos naturales bioplaguicidas del Centro de Investigación Científica de Yucatán A.C, ha realizado estudios con extractos vegetales para identificar especies regionales con potencial antifúngico. Entre éstas se han detectado a *Acalypha gaumeri*, *Croton chichenensis* y *Mosannonna depressa*, las cuales han revelado que tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de los hongos *Alternaria tagetica*, *Corynespora cassiicola*, *Fusarium oxysporum* y

Penicillium oxalicum, entre otros (Godoy-Rodríguez, 2019; Vargas-Díaz *et al.*, 2014; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008).

Por lo tanto, el propósito del presente estudio fue evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de 40 especies de plantas de la península de Yucatán contra cuatro fitopatógenos aislados de chile habanero; evaluar *in vivo* los más promisorios, estimando su inocuidad y perfil cromatográfico. Con esta investigación, se contribuye a reducir el deterioro de la calidad y producción de los cultivos, proponiendo una alternativa económica y ecológicamente rentable para contrarrestar el uso de fungicidas sintéticos en la agricultura, dándole un valor agregado a la diversidad regional.

CAPÍTULO I

ANTECEDENTES

1. Chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.)

El chile habanero es una planta de ciclo anual (hasta 12 meses de vida), que puede alcanzar una altura de 1.5 m (Carballo-Bautista *et al.*, 2010). El tallo es grueso, erecto, glabro, robusto y generalmente tiene tendencia a trifurcarse en la primera ramificación (Tun-Dzul, 2001). Presenta una raíz pivotante, un sistema radicular bien desarrollado, cuyo tamaño depende de la edad de la planta, las características del suelo y las prácticas de manejo que se le proporcionen; puede alcanzar longitudes mayores a los 2 m (Ruiz-Lau *et al.*, 2011). Sus hojas son simples, lisas, alternas y de forma lanceolada, de tamaño variable (hasta 15 cm de longitud y ancho).

El fruto del chile habanero es una baya hueca en forma de trompo, poco carnosa, con dos y hasta ocho hojas modificadas que constituyen el aparato reproductor femenino de la flor y se denominan carpelos. Las semillas son lisas, ovaladas y pequeñas con una longitud de 2.5 a 3.5 mm, de una tonalidad café claro o café oscuro, el tiempo de germinación varía entre ocho y quince días. Las semillas se alojan en placentas de color blanquecino las cuales no están envueltas en mucosa (Eshbaugh, 2012). Los frutos de esta especie varían mucho en forma y tamaño, pudiendo ser rugosos y alargados de aproximadamente 12.5 cm, los frutos son verdes en el estado inmaduro, pero usualmente maduran en color rojo, anaranjado, amarillo o inclusive blanco. Esporádicamente se han encontrado algunos frutos de color café. Los frutos de *C. chinense* tienen el mismo olor característico, independientemente del color de maduración.

1.1. Clasificación taxonómica del chile habanero

El chile habanero pertenece al género *Capsicum* cuyo significado deriva del griego kapsos (picar) y kapsakes (cápsula) (Nuez *et al.*, 2003). El Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS, 2015) clasificó al chile habanero como se muestra en el siguiente Cuadro 1.1.

Cuadro 1.1 Clasificación taxonómica del chile habanero.

CLASIFICACIÓN TAXONÓMICA	
Reino	Plantae
Subreino	Viridaeplantae
Infrareino	Streptophyta
División	Tracheophyta
Subdivisión	Spermatophyta
Infradivisión	Angiospermae
Clase	Magnoliopsida
Superorden	Asteranae
Orden	Solanales
Familia	Solanaceae
Género	<i>Capsicum</i>
Especie	<i>Capsicum chinense</i> Jacq.

1.2. Importancia económica del chile habanero

El chile habanero es un cultivo hortícola con gran demanda comercial en el sureste de México, ya que ocupa el segundo lugar en cuanto a superficie cultivada (Moreno, 2015). Del total de la producción anual, el 80% se comercializa como fruto fresco y el 20% restante se destina a la elaboración de salsas, pastas y deshidratados (SIAP, 2018).

Adicionalmente, el interés ha sido impulsado por su alto contenido de capsaicinoides acumulados en el fruto (Kehie *et al.*, 2013), otorgándole el picor o pungencia. Por ejemplo, la capsaicina es la más abundante, su contenido varía entre las 200,000 a 500,000 unidades “Scoville” (Tapia-Vargas *et al.*, 2016; Juárez *et al.*, 2014). La capsaicina recibe múltiples usos en farmacéutica, cosmética, pintura, entre otros (SIAP, 2018; Ruiz-Lau *et al.*, 2011; Borges-Gómez *et al.*, 2010a). En México, Yucatán es el principal productor de chile habanero, con una superficie sembrada de 708.4 ha (Aceves *et al.*, 2008) y una producción de 1,500 ton anuales, seguido de los estados de Campeche y Quintana Roo (SIAP, 2018; 2017; Macías *et al.*, 2013). La producción de chile habanero se comercializa desde nivel local hasta internacional procesado y fresco (Moreno, 2015).

El chile habanero es una hortaliza de clima cálido, los rangos de temperatura en que se desarrolla son mínima de 10 °C, 35 °C y óptima de 30 °C (Ramírez *et al.*, 2006). Esta especie requiere de

suelos bien drenados con buena retención de humedad (Aceves *et al.*, 2008), y se desarrolla adecuadamente en un pH de 4.3 a 8.3 (Borges-Gómez *et al.*, 2014b).

1.3. Enfermedades que afectan al cultivo de chile habanero

Diversas enfermedades fúngicas reconocidas afectan al cultivo de chile habanero en sus diferentes etapas fenológicas (Figura 1.1). Entre éstas se encuentran: a) la mancha foliar producida por *C. cassiicola* b) la necrosis de fruto ocasionada por *C. lunata* y c) la pudrición de raíces y la marchitez, ocasionado por *Fusarium* spp. Entre éstos, *Fusarium equiseti* y *F. oxysporum* aislados de las raíces de plántulas de chile habanero (Mis-Mut, 2015).

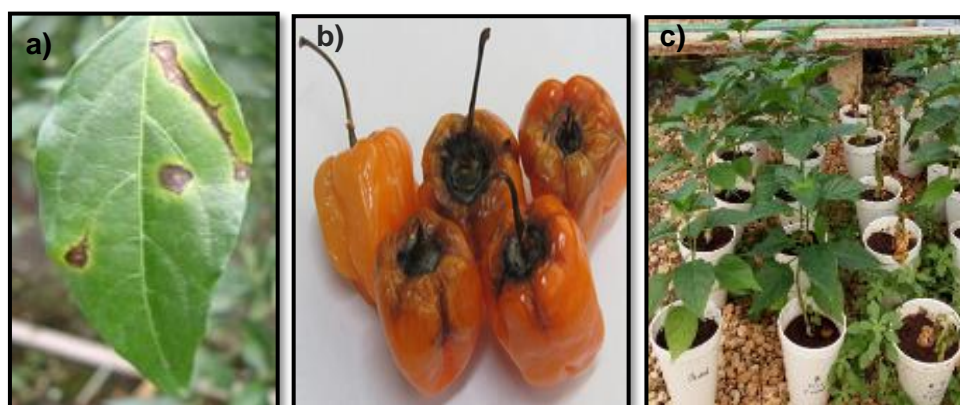


Figura 1.1 a) Mancha foliar por *Corynespora cassiicola*, b) necrosis de fruto por *Curvularia lunata* y c) marchitez de chile por patógenos del género *Fusarium* (*Fusarium equiseti* y *F. oxysporum*).

1.4. Hongos fitopatógenos estudiados

Los hongos fitopatógenos seleccionados para llevar a cabo los bioensayos antifúngicos se aislaron de lesiones de hojas, frutos y raíces de plántulas de chile habanero corresponden a las especies *C. cassiicola* (ITC7), *C. lunata* (ITC26), *Fusarium equiseti* (FCHE) y *F. oxysporum* (FCHJ) (Hoil-Cocom *et al.*, 2016; Moo-Koh *et al.*, 2014).

1.4.1. *Corynespora cassiicola* Berk & Curt.

1.4.1.1. Descripción microscópica y macroscópica

El crecimiento de *C. cassiicola* (Figura 1.2a) en medio PDA emite un color grisáceo o café-marrón, de aspecto aterciopelado y finamente vellososo. Presenta conidióforos de color marrón, derechos o curvos, de 110-850 μm de largo y de 4-11 μm de ancho. Las esporas se producen solitarias o en cadenas de 2 a 6, muy variables en forma y tamaño, cilíndricas, rectas o curvas, de color olivo o gris con 2 a 20 pseudoseptas con 30 a 500 μm de largo y 8 a 22 μm de ancho y 4-8 μm de ancho en la base (Suresh, 2017; Shimomoto *et al.*, 2008).

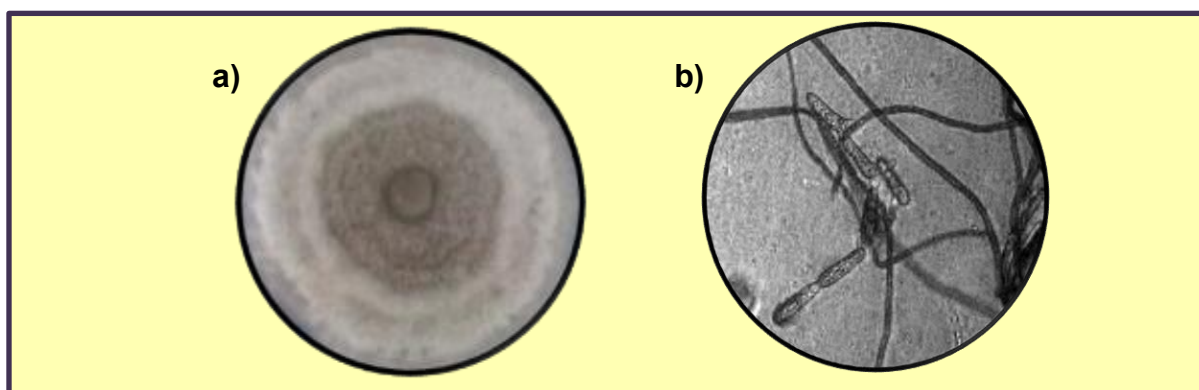


Figura 1.2. *Corynespora cassiicola* a) aspecto de la colonia en medio de cultivo PDA a los siete días y b) esporas de *C. cassiicola* visualizadas en aumento de 100x.

1.4.1.2. Enfermedad que ocasiona y cultivos que afecta *Corynespora cassiicola*

La especie *C. cassiicola* es considerada el agente causal de la mancha anillada y lesiones en tallos y podredumbre de semillas (Cabrera *et al.*, 2006). Los síntomas son lesiones pequeñas necróticas con centros café claro y márgenes oscuras rodeadas con un halo amarillo característico de la enfermedad, debido a la síntesis de una toxina específica de proteína llamada cassicolina (Ruiz-Hernández, 2016).

C. cassiicola puede afectar al menos 350 especies distribuidas alrededor de 50 países tropicales y subtropicales, como el algodón (*Gossypium hirsutum* L.), pepino (*Cucumis sativus* L.), tomate (*Solanum lycopersicum* L.), calabaza (*Curcubita pepo* L.), chícharo (*Vigna unguiculata* L.), jamaica (*Hibiscus sabdariffa* L.), y chile (*Capsicum* spp.) incluido chile habanero (Onofre *et al.*, 2019; Liu *et al.*, 2019; Butler *et al.*, 2016; Ortega *et al.*, 2015; Tun *et al.*, 2011).

1.4.1.3. Control de *Corynespora cassiicola*

Los fungicidas como el azoxistrobin, benomilo, clorotalonil, carbendazim, mancozeb, fumoxate, y la iminoctadina proporcionan un control excelente de *C. cassiicola* (Zhu *et al.*, 2019; Terramoto *et al.*, 2017; Tun *et al.*, 2011).

1.4.2. *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn

1.4.2.1. Descripción microscópica y macroscópica

El hongo *Curvularia lunata* en medio de cultivo PDA presentan un crecimiento rápido a los siete días, a 27°C en oscuridad, con el micelio de color marrón oscuro hasta gris-negruzco con textura algodonosa o aterciopelada, relieve liso y reverso de la colonia-marrón oscuro (Figura 1.3). Los conidióforos pardo oliváceos, frecuentemente se encuentran en forma curvada, claviforme, fusiforme u ovoide, 20-30 × 8-12 μm, con tres o más septos trasversales de color marrón oscuro (Hernández-Rodríguez, 2016; Laforet, 2015; Gené y Guarro, 2001).

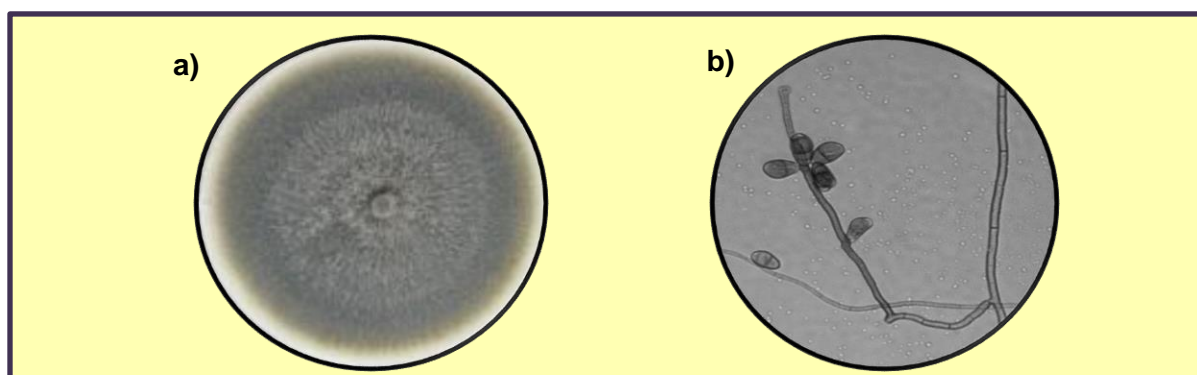


Figura 1.3 *Curvularia lunata* a) aspecto de la colonia en medio de cultivo PDA a los siete días y b) esporas de *C. lunata* visualizadas en aumento de 100x.

1.4.2.2. Enfermedad que ocasiona y cultivos que afecta *Curvularia lunata*

En hojas de maíz, *Curvularia lunata* produce pequeñas manchas cloróticas que conduce a una necrosis severa y causa una pérdida de rendimiento del 60%, principalmente debido a la reducción de la eficiencia fotosintética (Bisht *et al.*, 2018). *C. lunata* induce pérdidas de producción en cultivos de importancia económica como el arroz (*Oryza sativa* L.), sorgo (*Sorghum* spp.), maíz (*Zea mays* L.) y amaranto (*Amaranthus hypochondriacus* L.) (Akonda *et al.*, 2015).

1.4.2.3. Control de *Curvularia lunata*

El fungicida Imazalil® (800 ppm) mostró efectividad, al inhibir el crecimiento micelial del hongo *Curvularia* sp. al 100%. Mientras que los tratamientos con el fosetil-Al (500 ppm) y procloraz (750 ppm) inhibieron el crecimiento al 75% lo cual confirma la eficacia de estos fungicidas para el control de *Curvularia* (Poot, 2011).

Adicionalmente, Bisht *et al.* (2018) indicaron que *in vitro* el fungicida carboxin a 25 ppm inhibe completamente el crecimiento de *C. lunata*. También, el fungicida mancozeb mostró una inhibición del crecimiento del patógeno del 98% a 200 ppm.

1.4.3. *Fusarium equiseti* Corda Sacc.

1.4.3.1. Descripción microscópica y macroscópica

Las colonias en medio PDA se caracterizan por presentar micelio aéreo abundante, flocoso inicialmente de color blanco a rosado. Los microconidios son ovales de 53 a $80 \times 4.0-4.5 \mu\text{m}$, con una célula pedicelada, y clamidosporas de $7-9 \mu\text{m}$ en cadena y en conglomerados (Figura 1.4). Presenta formación de esporodoquios inicialmente de color naranja y posteriormente café oscuro. En los esporodoquios, se observan abundantes macroconidios desarrollados en monofiálides o en conidióforos ramificados dorsoventralmente curvos, usualmente con cinco a siete septos marcados, con una longitud de 25 a $120 \mu\text{m}$, con pared gruesa que en su parte ventral se arquea ligeramente y en la parte dorsal se arquea abruptamente, con una célula basal en forma de pie y la parte apical filamentosa (Herrera-Parra *et al.*, 2017; Martínez-Fernández *et al.*, 2015).

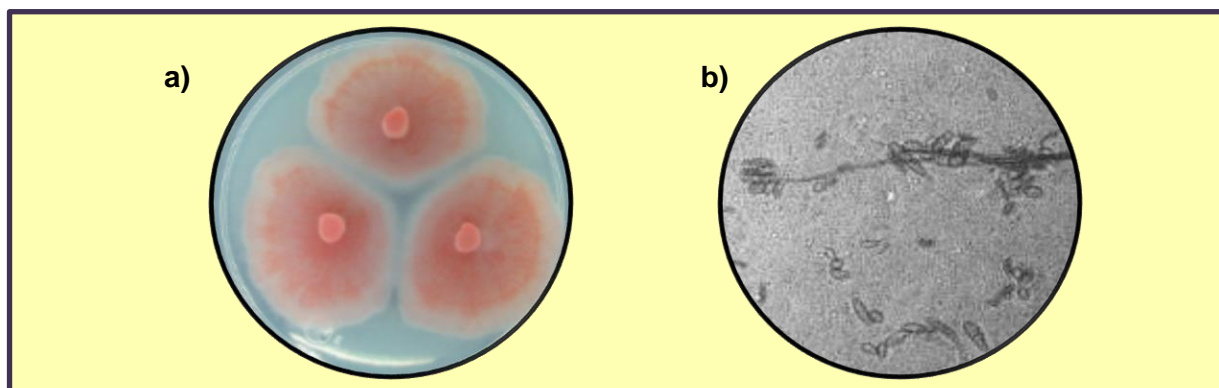


Figura 1.4 *Fusarium equiseti* a) aspecto de la colonia en medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA) a los 7 días y b) esporas de *F. equiseti* visualizadas en aumento de 100x.

1.4.3.2. Enfermedad que ocasiona y cultivos que afecta *Fusarium equiseti*

Fusarium equiseti ha sido identificado como el agente causal de la marchitez en *C. chinense* (Mejía-Bautista *et al.*, 2016a). También, se ha reportado que causa necrosamiento de tejido vascular y acortamiento de entrenudos en cultivos de importancia económica (Herrera-Parra *et al.*, 2017; Rodrigues, 2005; Chimbekujwo, 2000).

F. equiseti induce pérdidas de producción en cultivos de importancia económica como el piñón *Jatropha curcas* L. (Herrera-Parra *et al.*, 2017), el caupí *Vigna unguiculata* L. (Rodrigues y Menezes, 2005) y algodón *Gossypium hirsutum* L. (Chimbekujwo, 2000).

1.4.3.3. Control de *Fusarium equiseti*

Mejía-Bautista *et al.* (2016b) indicaron que las cepas *Bacillus subtilis* (CBMT51) y *Bacillus cereus* (BL18) mostraron propiedades en el biocontrol de la marchitez en *C. chinense* ocasionada por *Fusarium equiseti*, por lo que se sugieren que pueden ser utilizadas en la protección del cultivo de chile habanero. Del mismo modo, se ha reportado antagonismo *in vitro* contra *F. equiseti* ejercido por las cepas *Paenibacillus* sp. (CBRM17), *Bacillus subtilis* CBMT51 y CBRF8 con 71.55, 71.23 y 65.70%, respectivamente (Mejía-Bautista *et al.*, 2016a).

1.4.4. *Fusarium oxysporum* Sacc. W.C.

1.4.4.1. Descripción microscópica y macroscópica

Las colonias en medio PDA muestran rápido crecimiento, presentando micelio aéreo abundante, algodonoso, con coloración variable, de blanco a rosado, con una dimensión de 4 cm de diámetro en siete días (Figura 1.5). El dorso de la colonia presenta un color púrpura o violeta más intenso. Los microconidios son de 6.9-16.3 μm de largo y 2.3-4.6 de ancho, usualmente unicelulares o con un septo, de forma oval a elipsoidal, tipo amerospora sin tabiques, de pared lisa, algunos rectos o curvos, originados de fiálides cortas laterales y macroconidios con 3 a 5 septos transversales de forma falcada, clamidosporas globosas, solitarias o en pares, intercalares de 6.9-11.6 μm de largo y 2.4-4.7 de ancho (Salazar *et al.*, 2015).

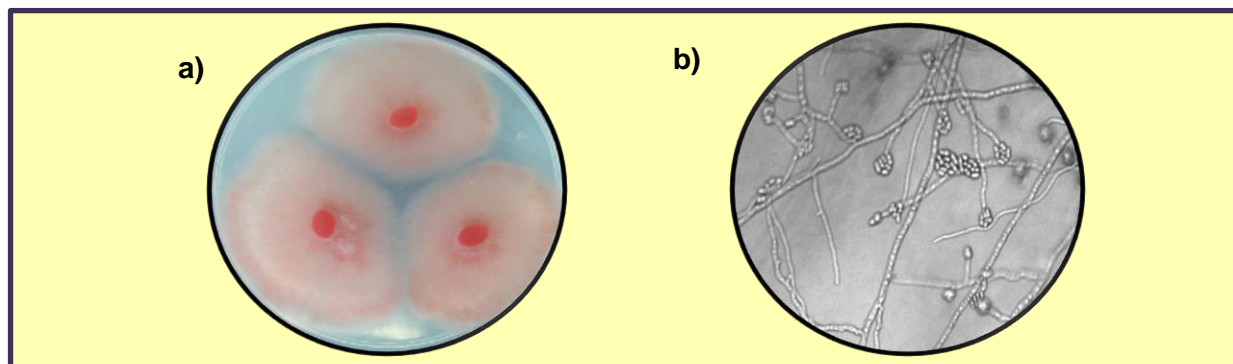


Figura 1.5 *Fusarium oxysporum* a) aspecto de la colonia en medio de cultivo de agar papa dextrosa (PDA) a los siete días y b) esporas de *F. oxysporum* visualizadas en aumento de 100x.

1.4.4.2. Enfermedad que ocasiona y cultivos que afecta *F. oxysporum*

Fusarium oxysporum es el causante de manchas en hojas, pudrición de raíces y de la base del tallo, pudrición de frutos y marchitamientos vasculares (Villa-Martínez *et al.*, 2014; Reyes-Ramírez, 2012b). El hongo *F. oxysporum*, afecta diferentes cultivos de importancia económica como son el chile habanero (*C. chinense* Jacq.), arveja dulce (*Pisum sativum* L.) y naranjilla (*Solanum quitoense* L.) (Reyes-Ramírez, 2012b).

1.4.4.3. Control de *F. oxysporum*

En el control de *F. oxysporum* se utilizan fungicidas sintéticos, tales como el azoxystrobin, benomilo, carbendazim, tiabendazol y tiofanato (Bashir *et al.*, 2018; Ragab *et al.*, 2012; Amini y Sidovich, 2010). Los efectos colaterales de estos productos han sido extensivamente reportados (Carvalho, 2017; Gaherwal *et al.*, 2015; Gu *et al.*, 2015).

1.5. Alternativas naturales para el control de fitopatógenos

Los productos naturales derivados de plantas representan una alternativa viable para el manejo de patógenos de importancia agronómica (Jiménez-Reyes *et al.*, 2018; Choudhury *et al.*, 2018). Diversos extractos vegetales son utilizados por su capacidad de inhibir el crecimiento micelial, esporulación y germinación de hongos fitopatógenos (Walia *et al.*, 2017; El-Mohamedy *et al.*, 2014).

1.6. Extractos vegetales como fuente de metabolitos

A nivel mundial, existe una gran diversidad de plantas que han sido sometidas a programas de búsqueda de alternativas naturales para el control de enfermedades fungosas (Ramírez-Mares

et al., 2015; Rongai *et al.*, 2015). El uso de extractos vegetales para el control de plagas, y enfermedades en la agricultura sostenible, constituye una alternativa promisorio, por ser biodegradables, de bajo costo y elevada efectividad (Walia *et al.*, 2017). En México se estima que existen 23,314 especies de plantas, de las cuales sólo una mínima cantidad ha sido explorada en relación con su potencial antifúngico (Ramírez-Morillo, 2019; Villaseñor, 2016). La península de Yucatán tiene una flora nativa característica debido a su particular ubicación geográfica y condiciones climáticas. Sin embargo, hasta la fecha, el número de estudios sobre plantas nativas de la región peninsular como posibles fuentes de metabolitos bioactivos con aplicaciones en agricultura ha sido limitado (Godoy-Rodríguez *et al.*, 2019; Vargas-Díaz *et al.*, 2014; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006).

Extractos de diversas plantas han sido evaluados *in vitro* e *in vivo* contra *Fusarium*, *Corynespora* y *Curvularia* (Cuadro 1.2).

Cuadro 1.2. Extractos vegetales con efecto antifúngico frente a las especies de hongos *Corynespora cassicola* *Curvularia lunata*, *Fusarium equiseti* y *Fusarium oxysporum*.

Especie/familia	Extracto	Parte vegetal	Patógeno	Concentración	%ICM	Referencias
<i>Acorus calamus</i> <u>Acoraceae</u>	EE	Rizoma	C.l y F.e	1 mg/mL	100	Begum <i>et al.</i> , 2007
<i>Azadirachta indica</i> <u>Meliaceae</u>	EA	Hojas	C.l	25%	99	Kuri <i>et al.</i> , 2010
<i>Azadirachta indica</i> <u>Meliaceae</u>	EE	Hojas	F.sp.	5, 10 y 20%	100	Shamsi <i>et al.</i> , 2016
<i>Allium sativum</i> <u>Liliaceae</u>	EA	Bulbo	C.c	10%	60	Manju <i>et al.</i> , 2014
<i>Acacia farnesiana</i> <u>Fabaceae</u>	EA	Hojas	F.o	100%	98	Pedroso <i>et al.</i> , 2012
<i>Acalypha gaumeri</i> <u>Euphorbiaceae</u>	EE	Raíz	C.c	1 mg/mL	97	Vargas-Díaz <i>et al.</i> , 2014
<i>Acalypha gaumeri</i> <u>Euphorbiaceae</u>	EE	Raíz	F.o	2 mg/mL	51	Gamboa <i>et al.</i> , 2008
<i>Bonellia flammea</i> <u>Primulaceae</u>	EA	Corteza	C.l y C.c	3%	20-100	Moo-Koh <i>et al.</i> , 2014
<i>Beta vulgaris</i> <u>Amaranthaceae</u>	EA	Completa	F.o	3%	38	Covarrubias <i>et al.</i> , 2013

<i>Cannabis sativa</i> <u>Cannabaceae</u>	EA	Hojas	F. o y C.l	5, 10, 20%	48-100	Tapwal <i>et al.</i> , 2011
<i>Calycopteris floribunda</i> <u>Combretaceae</u>	EE	Hojas	C.l y F.e	100 µg/mL	48-34	Saha y Rahman, 2008
<i>Cinnamomum zeylanicum</i> <u>Lauraceae</u>	EE	Corteza	C.l	500 -100 µg/mL	100	Mishra <i>et al.</i> , 2009
<i>Croton chichenensis</i> <u>Euphorbiaceae</u>	EE	Raíz	F.o	2 mg/mL	83	Gamboa <i>et al.</i> , 2008
<i>Cinnamomum zeylsnicum</i> <u>Lauraceae</u>	EA	Fruto	F.o	500 ppm	100	Cáceres-Rueda <i>et al.</i> , 2013
<i>Datura stramonikora</i> <u>Solanaceae</u>	EA	Hojas	C.c	10%	31	Manju <i>et al.</i> , 2014
<i>Eugenia caryophyllata</i> <u>Myrtaceae</u>	EA	Completa	F.o	800 ppm	100	Cáceres Rueda <i>et al.</i> , 2013
<i>Eucalyptus</i> <u>Myrtaceae</u>	EA	Hojas	C.c	2%	34	Paz <i>et al.</i> , 2018
<i>Flourensia retinophylla</i> <u>Asteraceae</u>	EE	Completa	F.o	1500 µl/L	100	Rodríguez <i>et al.</i> , 2007
<i>Flourensia cernua</i> <u>Asteraceae</u>	EE	Completa	F.o	1500 µl/L	100	Rodríguez <i>et al.</i> , 2007
<i>Flourensia microphylla</i> <u>Asteraceae</u>	EE	Completa	F.o	1500 µl/L	100	Rodríguez <i>et al.</i> , 2007
<i>Gliricidia sepium</i> <u>Fabaceae</u>	EA	Hojas	C.c	6, 10, 15, 25 %	91	Pérez <i>et al.</i> 2000
<i>Juniperus procera</i> <u>Cupressaceae</u>	MT	Hojas	C.l	3 mg/mL	88	Abdel <i>et al.</i> , 2015.
<i>Lantana sp.</i> <u>Verbenaceae</u>	EA	Hojas	C.l	15%	86	Bisht <i>et al.</i> , 2013
<i>Lippia berlandieri</i> <u>Verbenaceae</u>	EA	Hojas	F.o	200 ppm	100	Cáceres-Rueda <i>et al.</i> , 2013
<i>Myracrodruon urundeuva</i> <u>Anacardiaceae</u>	EA	Hojas	C.c	50%	100	Naruzawa y Papa, 2011
<i>Phyllanthus amarus</i> <u>Euphorbiaceae</u>	EA	Hojas	C.l	100%	100	Akinbode, 2010
<i>Ocimum basilicum</i> <u>Lamiaceae</u>	EA	Hojas	C.c	10%	100	Ogbebor y Adekunle, 2005

<i>Piper betle</i> <u>Piperaceae</u>	EE	Hojas	C.l	1 mg/mL	57	Begum <i>et al.</i> , 2007
<i>Piper betle</i> <u>Piperaceae</u>	CF	Hojas	C.l	-	100	Singha <i>et al.</i> , 2011
<i>Plumbago</i> <i>zeylanica</i> <u>Plumbaginaceae</u>	EE	Raíz	C.l y F.e	100 µg/mL	76-55	Rahman y Anwar, 2007
<i>Solanum</i> <i>erianthum</i> <u>Solanaceae</u>	MT	Tallo	C.l	170 µg/mL	77	Hernández- Rodríguez <i>et</i> <i>al.</i> , 2018
<i>Zingiber</i> <i>officinale</i> <u>Zingiberaceae</u>	EA	Rizoma	C.c	10%	44-50	Manju <i>et al.</i> , 2014

EE: extracto etanólico; EA: extracto acuoso; MT: metanólico; CF: clorofórmico; C.l: *Curvularia lunata*, C.c: *Corynespora cassiicola*, F.e: *Fusarium equiseti*; F.o: *F. oxysporum*, %ICM: Inhibición del crecimiento micelial.

1.7. Estudios fitoquímicos y actividad biológica de las especies estudiadas

En la literatura científica se investigó sobre la actividad biológica y los estudios fitoquímicos relacionados con las 40 especies de plantas evaluadas contra los hongos fitopatógenos del chile habanero. Para ello, se consultaron artículos de bases electrónicas disponibles en la institución, que incluyeron: Google Scholar, SciFinder, Redylac, Scopus y Science Direct, entre otras. En la búsqueda se emplearon como palabras claves: el sinónimo, basónimo, actividad biológica, actividad antifúngica, fitoquímica, extracto vegetal, hongos y chile habanero (Cuadro 1.3).

CAPÍTULO I

Cuadro 1.3. Estudios fitoquímicos y actividad biológica de las 40 especies de plantas estudiadas.

Especie/Familia	Basónimo/ sinónimo	Actividad biológica	Metabolitos	Referencias
<i>Alseis yucatanensis</i> Standl. Rubiaceae Endémica	NR	Antioxidante, nematocida, y vasoactiva	Glucosilngouniensina	Avilez-Gomez, 2020; Slis <i>et al.</i> , 2004;
<i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm. Simaroubaceae	NR	Anticancerígena, citotóxica, dermatomycosis, dolor de muelas, digestivo, infecciones, psoriasis, reumatismo y tos	Ácido crisofánico; crisofaneína; chaparrín; β -sitosterol; ácido atrárico; ácido 17-octadecen-6-inoico; ácido 6-eicosinoico	Quintal-Novelo <i>et al.</i> , 2015
<i>Annona primigenia</i> Standl. & Steyer Annonaceae	<i>A. reticulata</i> L. var primigenia	Astringente, antioxidante, anticancerígena, analgésica, anti-mutagénica, antiespasmolítica, antihelmíntica antidiarreica, citotóxica, insecticida, larvívica, hepatoprotectivo y vermífugo	Reticulacinona; 2-rolliniastatina; molvizarina; 14-hidroxi-25-desoxi-rollinicina; lirioidenina; kaureno; espatenolol; muuroleno; copaeno; eudesmol; ácido kaurenoico; β -sitosterol; ácido 16 α -hidro-19- <i>ent</i> -kauran-17-oico, 6 β -hidroxiestigmast-4-en-3-ona; ácido 7-acetoxi-16 β - <i>ent</i> -kauran-19-oico; ácido 16 α -hidro- <i>ent</i> -kauran-17,19-dioico; (2 <i>S</i>)-di- <i>O</i> -metilquiritigenina; ácido pentadecanoico; anonaína; roemerina; norcoridieno; coridina; norisocoridina; dienona isocoridina; norlaurelina; glaucina hiperósido; rutina; quercetina; <i>n</i> -hexacosanol; <i>n</i> -octacosanol; <i>n</i> -triacontanol; 16-hentriacontanona; campesterol; estigmasterol; β -sitosterol; carvona; linalool; (+)- <i>O</i> -metilarmepavina; annonaretina A, 9,10-dimetiltríciclo [4.2.1.1 (2,5)] decano-9,10-diol; 3,7-dimetil-6-nonen-1-ol acetato; 9 <i>Z</i> -octadecenamida; glicerina; 6-	Chel-Guerrero <i>et al.</i> , 2018; Subba y Aryal, 2016; Jamkhande y Wattamwar, 2015; Rout y Kar, 2014; Satyanarayana y Gangarao, 2013; Pathak y Zaman, 2013; Thang <i>et al.</i> , 2013; Savithramma <i>et al.</i> , 2011

CAPÍTULO I

				O-(±)-D-galactopiranosil-D-glucosa; dessulfosinigrina; Î(±)-metil-D-manopiranosido.	
<i>Bakeridesia notolophium</i> Gray) Hochr. Malvaceae	(A. <i>Abutilon notolophium</i> Gray	NR		NR	---
<i>Bravaisia berlandieriana</i> (Nees) T.F. Daniel Acanthaceae	<i>Onychacanthus berlandierianus</i> Nees <i>Bravaisia tubiflora</i> Hemsl.	Antioxidante, antihipertensivo, antihiperlipidémico, y antimicrobiano		NR	Rodríguez-García <i>et al.</i> , 2019
<i>Byrsonima bucidifolia</i> Standl. Malpighiaceae Endémica	NR	Antiasmático, fiebre, infecciones de la piel leishmanicida y tripanocidal		Galato de metilo y m-trigalato de metilo	López <i>et al.</i> , 2014; Polanco-Hernández <i>et al.</i> , 2012; Castillo-Avila <i>et al.</i> , 2009; Peraza-Sánchez <i>et al.</i> , 2007
<i>Cupania</i> sp. Sapindaceae	NR	NR		NR	---
<i>Coccoloba</i> sp. Polygonaceae	NR	NR		NR	---
<i>Croton</i> sp. Euphorbiaceae	NR	NR		NR	---
<i>Calea jamaicensis</i> (L.) L. Asteraceae	<i>Santolina jamaicensis</i> L.	Antiparásita, antifúngica, dolor de estómago, leishmanicida y resfriados		Jamaicólidos A-D; guaianolidos; heliangólido; 12,8α-germacranólida	Cruz-Cerino <i>et al.</i> , 2020; Pérez-Chablé, 2019; Calderón <i>et al.</i> , 2010; Mitchell <i>et al.</i> , 2006.

CAPÍTULO I

<i>Cameraria latifolia</i> L. Apocynaceae	<i>Cameria belizensis</i> Standl	Citotóxica	(+)-Pinoresinol; (+)-siringaresinol; decahidronaftalenilpropenol; (+)-camerarialdehído; tetrahidrofurano lignano; (□)-diepiolivil	Ren <i>et al.</i> , 2013
<i>Chrysophyllum mexicanum</i> Brandegge ex Standl. Sapotaceae	NR	Desordenes gastrointestinales y cáncer gástrico.	NR	Ankli <i>et al.</i> , 2002
<i>Croton arboreus</i> Millsp. Euphorbiaceae Endémica	<i>Croton glabellus</i> auct. non L. <i>Croton reflexifolius</i> auct. non Kunth	Antiinflamatoria, antiespasmódica, cardiovascular, insecticida y repelente y relajante	Ácido junceico; clerodano; ayanina (3', 5-dihidroxi-3,4;7-trimetoxiflavona); 5 α ,7 α ,10 β H-3-patchoulen-2-ona; 5 α ,7 α ,10 β H-4-(14)-patchoulen-2 α -ol; 9 α ,10 β -dihidroxi-2 β ; 4 β -peroxi-1 α -5 β ; 7 α H-guaiano.	Pérez-Verdugo <i>et al.</i> , 2019; Aguilar y Ríos, 2004; De García <i>et al.</i> , 1986
<i>Croton itzaeus</i> Lundell Euphorbiaceae Endémica	NR	Insecticida y repelente	NR	Pérez-Verdugo <i>et al.</i> , 2019
<i>Diospyros</i> sp. Ebenaceae	NR	NR	---	---
<i>Erythroxylum confusum</i> Britton Erythroxylaceae	NR	Antioxidante, hepatoprotectora, repelente, antiherpética, insecticida, y	Palmitato de β -amirina	Pérez-Verdugo <i>et al.</i> , 2019; Rodeiro <i>et al.</i> , 2008; Álvarez-Reyes <i>et al.</i> , 2008; González-Lavaut <i>et al.</i> , 2008.
<i>Erythroxylum rotundifolium</i> Lunan Erythroxylaceae	<i>E. brevipes</i> auct. non DC <i>E. sessiliflorum</i> O. E. Schulz.	Antibacterial, cardiotónica, convulsiva, diurética, neurotóxica	3 α ,6 α ,7 β -triol-tropano; 3 α ,7 β -dibenzoiloxi-6 β -hidroxi-tropano; 3 α -(3,4,5-trimetoxi-cinamoiloxi) - 7 β -(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-6 α -hidroxi-tropano 7 β -hidroxi; 6 β -(3,4,5-trimetoxibenzoiloxi)-3 α -(<i>E</i>)-(3,4,5-trimetoxicinamoiloxi) tropano; 6 β -benzoiloxi-3 α -(<i>Z</i>)-(3,4,5 trimetoxi-cinamoiloxi); (-)-6 β -benzoiloxi-3 α -hidroxitropano	Chávez <i>et al.</i> , 2002; Payo-Hill <i>et al.</i> , 2000

CAPÍTULO I

<i>Erythroxylum</i> sp. Erythroxylaceae	NR	NR	NR	---
<i>Eugenia</i> sp. Myrtaceae	NR	NR	NR	---
<i>Euphorbia armourii</i> Millsp. Euphorbiaceae	<i>Eumecanthus armourii</i> (Millsp.) Millsp.	Antidiabética	NR	Balick y Arvigo, 2015
<i>Guettarda combsii</i> Urb. Rubiaceae	<i>Guettarda scabra</i> (L.) Vent. Var seleriana Loes.	NR	NR	---
<i>Helicteres baruensis</i> Jacq. Malvaceae	NR	Analgésica, antiinflamatoria, antibacterial, antidiabética, resfriados y dislalia	Diisobutilftalato	Tarache <i>et al.</i> , 2007
<i>Heteropterys laurifolia</i> (L.) A. Juss. Malpighiaceae	<i>Banisteria laurifolia</i> L. <i>Heteropterys longifolia</i> Kunth.	NR	NR	---
<i>Hybanthus yucatanensis</i> Millsp. Violaceae	<i>Hybanthus cymosus</i> Bartlett.	NR	NR	---
<i>Ipomoea clavata</i> (G. Don) Ooststr. ex J.F. Macbr. Convolvulaceae	<i>Calonyction clavatum</i> G. Don	NR	NR	---
<i>Karwinskia humboldtiana</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) Zucc. Rhamnaceae	<i>Rhamnus humboldtiana</i> Willd. ex Roem. & Schult <i>Karwinskia glandulosa</i> Zucc., <i>Karwinskia affinis</i> Schltld.	Antiespasmódica, antimicrobiana, dolor de muelas, , fiebre, neurotóxica y vómito	7-Metoxieleuterina; 6-hidroxi-7-metoxieleuterina; 7-acetil-6,8-dimetoxi-3-metil-1-naftol.	Orozco-Martínez <i>et al.</i> , 2020; Waksman y Ramírez, 1992; Fernández, 1988; Mitscher <i>et al.</i> , 1985; Domínguez <i>et al.</i> , 1976
<i>Licaria</i> sp. Lauraceae	NR	NR	NR	-

CAPÍTULO I

<i>Macroscepis diademata</i> (Ker Gawl.) Stevens. Apocynaceae	<i>Gonolobus diadematus</i> Ker Gawl./ <i>M. obovata</i> Kunth, <i>M. rotata</i> Decne.	NR	NR	---	
<i>Malpighia glabra</i> L. Malpighiaceae	NR	Antioxidantes, antitumorales, antineoplásica y hepatoprotectiva	antifúngica, antihiperoglucémicas, antineoplásica y hepatoprotectiva	NR	El-Hawary <i>et al.</i> , 2021; Fekry <i>et al.</i> , 2021; Nascimento <i>et al.</i> , 2018; Belwal <i>et al.</i> , 2018; Da Silva Nunes <i>et al.</i> , 2013;
<i>Morella cerifera</i> (L.) Small. Myricaceae	<i>Myrica cerifera</i> L.	Antitrombina, astringente, citotóxica, estimulante, insecticida, repelente, tónica, hemorragias y congestión	Miricetina; miricitrina; (+) -a R; 11S-myricanol		Pérez-Verdugo <i>et al.</i> , 2019; Zhang <i>et al.</i> , 2016; Pandeya <i>et al.</i> , 2013; Jones <i>et al.</i> , 2011; Schmidt <i>et al.</i> , 2007; Chistokhodova <i>et al.</i> , 2002; Paul <i>et al.</i> , 1974
<i>Mosannonna depressa</i> (Ball.) Chatrou Annonaceae	<i>Annona depressa</i> Baill, <i>Malea depressa</i> Baill, <i>Guatteria gaumeri</i> Greenm. <i>Malmea gaumeri</i> (Greenm.) Lundell.	Analgésica, antifúngica, antiséptica, antidiabética, coleditiasis, hipolipemiente e hipercolesterolemia	antimicrobiana, antidiabética, hipoglucémica,	-5- 1,2,3,4-tetrametoxi (2-propenil) benceno, 2,3,4,5-tetrametoxicinamaldehído; <i>trans</i> -isomiristina; alcohol 2,3,4,5-tetrametoxicinámico 2-hidroxi-3,4,5-trimetoxi-1-(2,4-hidroxi-3-dihidroxi) butil-benceno; 2-hidroxi-3,4,5- trimetoxi-1-(2,3,4-hidroxi) butil-benceno; (α -asarona): 2,4,5-trimetoxipropenilbenceno; asaraldehído (2,4,5-trimetoxi benzaldehído); <i>trans</i> -isoelemicina [trimetoxi-1,2,3 (propenil-1)-5 benceno (E)]; <i>trans</i> -isomiristicina [tetrametoxi 1,2,3,4 (propenil-1)-5 benceno (E); guategaumerina; 2,3,4,5-tetrametoxibenzaldehído;	Cruz-Cerino <i>et al.</i> , 2020; Pérez-Chablé, 2019; Mejía, 2016c; Andrade-Cetto, 2011a, Andrade-Cetto <i>et al.</i> , 2008b; Andrade-Cetto y Heinrich 2005c; Jimenez-Arellanes <i>et al.</i> , 1996; Gutiérrez-Lugo <i>et al.</i> , 1996; Chamorro <i>et al.</i> , 1993; Enríques <i>et al.</i> , 1980

CAPÍTULO I

3- (3-hidroxi-2,4,5-trimetoxifenil)
propano-1,2 diol.

<i>Parathesis cubana</i> (A. DC.) Molinet & M. Gómez Primulaceae	<i>Ardisia cubana</i> A. DC., <i>Parathesis</i> <i>obovata</i> Standl. <i>Parathesis</i> <i>corymbosa</i> Hemsl. <i>Parathesis costata</i> Lundell <i>Tinus cubana</i> (A. DC.) Kuntze	Antifúngica	NR	Cruz-Cerino, 2020; Pérez-Chablé, 2019
<i>Paullinia</i> sp. Sapindaceae	NR	NR	NR	---
<i>Piper neesianum</i> C. DC. Piperaceae	<i>Piper</i> <i>sempervirens</i> (Trel.) Lundell- <i>Arctotonia</i> <i>sempervirens</i> Trel.	Antifúngica, heridas y mordeduras de serpientes	Piperina Biciclogermacreno D	Cruz-Cerino <i>et al.</i> , 2020; Cruz <i>et al.</i> , 2012; 2005
<i>Psychotria</i> sp. Rubiaceae	NR	NR	NR	---

CAPÍTULO I

<i>Randia aculeata</i> L. Rubiaceae	<i>Randia standleyana</i> auct. non L. Williams	antiinflamatoria, antioxidante	antibacteriana y	ácido vainillínico; ácido palmítico; β -sitosterol	Martínez-Ceja <i>et al.</i> , 2022; Soto-Sobenis <i>et al.</i> , 2001
<i>Serjania caracasana</i> (Jacq.) Willd Sapindaceae	<i>Paullinia caracasana</i> Jacq.	Antiespasmódica, antiprotozoaria, larvicida, gastroprotectiva y repelente	antioxidante, anticancerígena,	Stigmasterol; serjanosídeo A, B y C	Silva <i>et al.</i> , 2017; Quintanilla y Pinto, 2014
<i>Simarouba glauca</i> DC. Simaroubaceae	<i>Quassia simarouba</i> L. f., <i>Simarouba glauca</i> DC.	Antiprotozoaria, anticancerígena, antifúngica, antimicrobiana, antipalúdica, astringente, antipirética, citotóxica, hidratante de piel, hemostática, desordenes gastrointestinales	antibacteriana, antioxidante, antihelmíntica,	ácido hexadecanoico; 2-oxo-, metil éster, 2'-acetilglaucarubina (3a); glaucarubina (3b) ailanina; 2'-acetilglaucarubina; glaucarubina; holacantona; 3-oxatirucalla-7; 24-dien-23-ol; niloticina glaucarubolona; glaucarubina; ailanotinona; benzoquinona; melianona; simaroubidina; simarolida; simarubina; simarubolida; sistosterol chaparrina; picrasina B; paraina; neoquasina; cuasina; Dodecano 4, 9-dipropil	Balu <i>et al.</i> , 2020; Ramya <i>et al.</i> , 2019; Pawar <i>et al.</i> , 2019; Puranik <i>et al.</i> , 2017; Mikawlawng <i>et al.</i> , 2014; Manasi y Gaikwad, 2011; Grosvenor <i>et al.</i> , 2006; O'Neill <i>et al.</i> , 1988; Polonsky <i>et al.</i> , 1977a y 1978b
<i>Stemmadenia donnell-smithii</i> (Rose) Woodson Apocynaceae	<i>Tabernaemontana donnell-smithii</i> .	Leishmanicida y auxiliar para la artritis.		NR	Monzote <i>et al.</i> , 2014
<i>Turnera aromatica</i> Arbo Passifloraceae	NR	NR		NR	---

*NR: No registrada; ---: no localizada

1.8. Bioensayos antifúngicos

Los ensayos antifúngicos de extractos naturales o compuestos puros de plantas son herramientas *in vitro* esenciales para evaluar su potencial para inhibir el crecimiento de microorganismos. Esto se puede realizar con la ayuda de varios ensayos *in vitro* que incluyen los métodos de dilución en agar, microdilución y bioautografía, entre otros (Kurhekar *et al.*, 2019).

1.8.1. Dilución en agar

El método de dilución en agar es utilizado para determinar la capacidad inhibitoria de un agente fungicida o fungistático y simultáneamente la concentración mínima inhibitoria (CMI), la cual es definida como la concentración más baja de sustancia que puede inhibir el crecimiento visible de un microorganismo después de incubarlo por 24 h. El método de dilución en agar implica la incorporación de concentraciones variables deseadas del agente antimicrobiano en cajas de Petri con medio de agar fundido, aprox. a 50 °C y se depositan, utilizando diluciones dobles en serie, seguido de la inoculación del microorganismo en estudio definido en la superficie de la placa de agar y se incuba por 24 h, después se examina si el microorganismo crece o no en cada una de las cajas (Balouiri *et al.*, 2016; Ramirez y Castaño, 2009). La ventaja del método de difusión en agar radica en un aumento de la sensibilidad para cantidades pequeñas, lo cual es importante cuando se trabaja con productos naturales, además permite diferenciar entre un efecto fungicida o fungistático (Ramirez y Castaño, 2009).

1.8.2. Bioensayo por microdilución

El bioensayo en microdilución es un método cuantitativo usado para determinar la concentración mínima inhibitoria (CMI) de un agente fungicida. La CMI es definida como la cantidad mínima a la cual un extracto es capaz de inhibir de manera visible el crecimiento de un microorganismo después de un periodo de incubación (Kurhekar *et al.*, 2019; Balouiri *et al.*, 2016). En esta técnica se utilizan placas de 96 pozos con concentraciones crecientes del extracto a evaluar, y se mezcla con un medio de cultivo apropiado. Luego se inocula el microorganismo de interés a una concentración conocida y se verifica el crecimiento después de la incubación a las 96 h. Un control de crecimiento (control negativo), y un control de inhibición del crecimiento (control positivo) deben usarse en todas las determinaciones de la CMI (Kurhekar *et al.*, 2019). La microdilución es un método reproducible, preciso, de bajo costo y fácil de cuantificar (Balouiri *et al.*, 2016; Reller *et al.*, 2009). Posee las ventajas de utilizar menor cantidad de recursos, las

diluciones se hacen de manera automatizada, se pueden analizar un mayor número muestras en menor tiempo y las cantidades de muestra requeridas son en pequeños volúmenes finales de 100 o 200 μL (CLSI, 2002). Los efectos de respuesta-concentración pueden estudiarse fácilmente por análisis de regresión para obtener la CI_{50} y CI_{95} (CLSI, 2002; Hadacek y Greger, 2000).

1.8.3. Concentración Inhibitoria Media (CI_{50})

La concentración inhibitoria media (CI_{50}), es aquella concentración que se estima que ocasiona la muerte al 50% de la población de un ensayo. La CI_{50} y sus límites de confianza (95%) son usualmente derivados de análisis estadístico (Castillo, 2004).

1.8.4. Ensayo de detección de efecto fungicida o fungistático

Para detectar la acción fungicida o fungistática de un producto sintético o natural se utilizan diferentes técnicas. Entre ellas se pueden mencionar la de disco, difusión en agar, E-test, bioautografía y microdilución. El efecto fungicida es la capacidad de un agente sintético o natural para inhibir la viabilidad del patógeno y el efecto fungistático es la capacidad para inhibir la germinación de las esporas o el desarrollo inicial de un hongo, mientras permanezca en contacto continuo (Achicanoy, 1981).

1.8.5. Bioautografía

Esta técnica es usada para detectar la actividad antifúngica, en la cual se utilizan placas cromatográficas de gel de sílice donde el extracto a evaluar se aplica y se eluye con un sistema de disolventes. Las placas se observan bajo luz ultravioleta de onda corta y larga, y las bandas visibles son marcadas. Posteriormente, en la superficie de las placas de gel se vierte suavemente agar inoculado con el patógeno a una concentración conocida. Trascurrido el tiempo de incubación, el R_f de las zonas de inhibición se comparan con el R_f de las placas de referencia. Adicionalmente, esta técnica permite determinar si hay uno o varios metabolitos responsables de la actividad antifúngica (Dewanjee *et al.*, 2015). La bioautografía proporciona un análisis más rápido y directo del potencial antimicrobiano, incluso antes de que los componentes de la muestra estén aislados y purificados (Dewanjee *et al.*, 2015).

HIPÓTESIS

Algunos de los extractos de plantas nativas seleccionadas de la península de Yucatán tienen, *in vitro*, el potencial de inhibir el crecimiento micelial de hongos fitopatógenos asociados al chile habanero e *in vivo* son efectivos para su control.

OBJETIVO GENERAL

Evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de extractos acuosos y etanólicos obtenidos de plantas de la península de Yucatán contra hongos patógenos del chile habanero, y la efectividad e inocuidad de los más promisorios *in vivo*.

OBJETIVO ESPECÍFICOS

- 1) Detectar el efecto antifúngico *in vitro* de los extractos acuosos y etanólicos de 40 plantas de la Península de Yucatán contra cuatro hongos patógenos del chile habanero y determinar la concentración mínima inhibitoria y la concentración inhibitoria media de los extractos más activos.
- 2) Particionar los extractos etanólicos con mayor efecto antifúngico con disolventes de polaridad ascendente y determinar la CMI y CI_{50} de las fracciones.
- 3) Analizar el perfil cromatográfico de las fracciones con mayor efecto antifúngico mediante LC-HRMS.
- 4) Explorar el efecto de los extractos promisorios en la morfología hifal de los fitopatógenos *Fusarium equiseti*, *F. oxysporum* y *Curvularia lunata*.
- 5) Evaluar la efectividad de los extractos promisorios en frutos y en hojas de chile habanero contra los patógenos *Curvularia lunata* y *Corynespora cassiicola*.
- 6) Estimar la inocuidad de los extractos promisorios en semillas de lechuga (*Lactuca sativa*), y el organismo benéfico lombriz de tierra (*Eisenia fetida*).

ESTRATEGIA EXPERIMENTAL

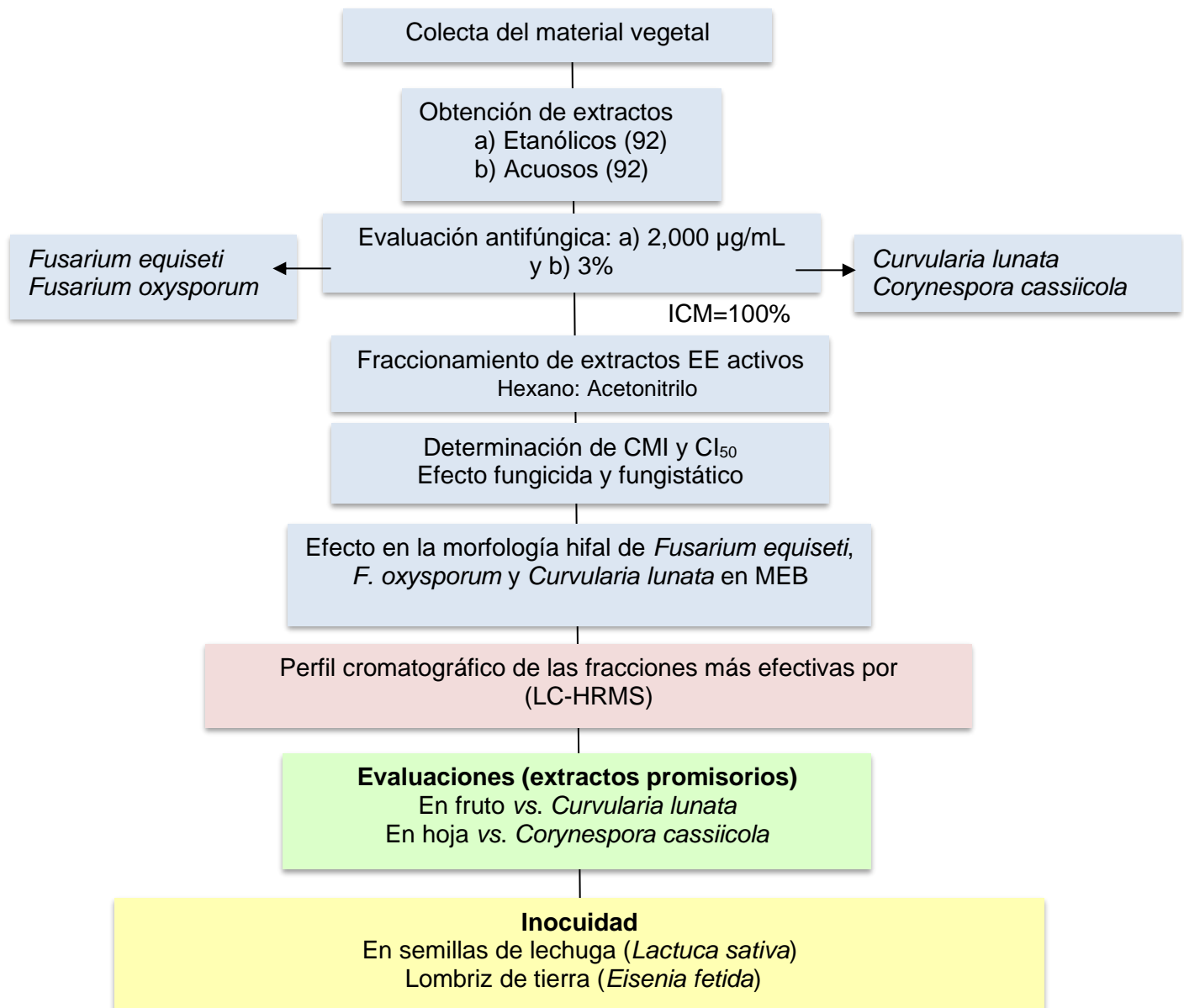


Figura 1.6. Estrategia experimental para la evaluación antifúngica de extractos orgánicos contra hongos fitopatógenos asociados al chile habanero. MEB: microscopio electrónico de barrido.

CAPÍTULO II

Extracts from Six Native Plants of the Yucatán Peninsula Hinder Mycelial Growth of *Fusarium equiseti* and *F. oxysporum*, Pathogens of *Capsicum chinense*

Resumen: Las cepas *Fusarium equiseti* FCHE y *Fusarium oxysporum* FCHJ fueron aisladas de las raíces de plántulas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) con marchitez y pudrición en la raíz. Con el fin de desarrollar un control biorracional de estas cepas fitopatógenas, se analizaron extractos etanólicos (EE) y acuosos (AE) de diferentes partes vegetativas de 40 plantas nativas tropicales de la península de Yucatán para detectar actividad antifúngica. Los extractos de seis de las 40 plantas analizadas fueron efectivos, y los extractos más inhibidores se estudiaron más a fondo. Los EE de *Mosannonna depressa* (corteza de tallos y raíces), *Parathesis cubana* (raíces) y *Piper neesianum* (hojas) inhibieron el crecimiento micelial de ambas cepas. Cada EE activo fue luego fraccionado entre hexano y acetonitrilo. La fracción de acetonitrilo de la corteza del tallo de *M. depressa* (MDT-b) tuvo la concentración inhibitoria mínima más baja de 1,000 µg/mL contra ambos patógenos y una concentración inhibitoria moderada (IC₅₀) de 462 contra *F. equiseti* y 472 µg/mL contra *F. oxysporum*. Después de 96 h de tratamiento con EE de la corteza del tallo de *M. depressa*, ambas cepas tenían hifas y conidios distorsionados y conidios colapsados en micrografías electrónicas de barrido. El análisis de cromatografía líquida, ultravioleta y espectrometría de masas de alta resolución reveló que el componente principal de la fracción fue α-asarona. Su efecto antifúngico se verificó con un estándar comercial, el cual tuvo una IC₅₀ de 236 µg/mL contra *F. equiseti* y >500 µg/mL contra *F. oxysporum*. Además, la fracción de hexano de *P. cubana* y la fracción de acetonitrilo de *P. neesianum* tuvieron actividad antifúngica contra ambos patógenos de *Fusarium*. Estos compuestos brindan nuevas opciones de productos biorracionales para el control de hongos fitopatógenos.

Palabras clave: antifúngico; α-asarona; chile habanero; fitopatógenos; *Mosannonna depressa*; extractos de plantas.

Cruz-Cerino, P., Cristóbal-Alejo, J., Ruiz-Carrera, V., Carnevali, G., Vera-Ku, M., Martín, J., Reyes, F., Gamboa-Angulo, M. (2020). Extracts from six native plants of the Yucatán peninsula hinder mycelial growth of *Fusarium equiseti* and *F. oxysporum*, pathogens of *Capsicum chinense*. *Pathogens*, 9, 827. Doi: 10.3390/pathogens9100827

2.1. INTRODUCTION

Approximately 200 species of *Fusarium* are recognized as pathogens of a broad range of plants, and *F. graminearum* and *F. oxysporum* were ranked in fourth and fifth place among the top 10 scientifically or economically most important fungal pathogens (Dean *et al.*, 2012). In pepper (*Capsicum* spp.) crops, serious post-harvest losses are caused by *F. oxysporum* (Velarde-Félix *et al.*, 2018). Peppers from about 35 *Capsicum* species are consumed, most widely from *C. annuum*, *C. baccatum*, *C. frutescens*, *C. pubescens* and *C. chinense*, which have been the most successfully domesticated and cultivated (Bosland y Votava, 2012). México reported an annual production of 3.2 million tons of pepper crops and average annual growth in production of 4.82% during 2003–2016 (Naves *et al.*, 2019). In particular, habanero peppers (*C. chinense*) are appreciated worldwide for their high content of capsaicin, the main alkaloid responsible for their hotness (https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/fileAgr_cola_Nacional_2017-2030_-_parte_tres). Capsaicin is also beneficial as a cardioprotective, anti-inflammatory, analgesic and a gastrointestinal aid and for its thermogenic properties (Srinivasan, 2015). In the chemical industry, it is useful in the production of paints and varnishes, tear gas and other compounds. In the Yucatán Peninsula, habanero peppers are part of the culinary identity as a condiment (Ruiz-Lau *et al.*, 2011). The habanero pepper from the Yucatán Peninsula Denomination of Origin (NOM-189-SCFI-2017) is presently cultivated on 1134 ha (<https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola>), and its production has been increasing steadily in recent years. However, *Fusarium* spp. cause production losses of at least 50% or even 100% when conditions are favorable (Mejía-Bautista *et al.*, 2016a). *F. equiseti* and *F. oxysporum*, which infect the roots of habanero pepper seedlings and cause root rot and wilting in the Yucatán Peninsula, México (Mis-Mut, 2015), also produce mycotoxins such as fumonisins and trichothecenes in crops and feed products and represent a risk to human health (Shi, 2017).

Currently, the management of *Fusarium* species depends on the intensive use of synthetic fungicides such as a benomyl, carbendazim, thiabendazole and alliete (Bashir *et al.*, 2018). However, such intensive use can induce resistance in the pathogen and negatively impact the environment, beneficial microorganisms and humans by acting as a skin irritant and carcinogen (Carvalho, 2017; Gaherwal *et al.*, 2015). To reduce dependence on synthetic pesticides, numerous strategies, such as the rotation of crops, use of resistant cultivars and biorational products and solarization of the soils, are thus integrated into a pest management program (Matyjaszczyk, 2018; Moya-Elizondo y Jacobsen, 2016). Natural products derived from plants are a highly viable option as biorational antifungal products that should leave less environmental

residue and be nontoxic to beneficial organisms and humans (Walia *et al.*, 2017; Ramírez-Mares y Hernández-Carlos, 2015). To discover and incorporate new antifungal agents in the control of diseases caused by *Fusarium* species, several groups have tested plant extracts *in vitro* and *in vivo* (Peñuelas-Rubio, *et al.*, 2017; Sesan *et al.*, 2017; De Rodríguez *et al.*, 2015). The high plant diversity in Mexico, with 23,314 reported species, 50% of which are endemic, has scarcely been explored for their biological and chemical properties. In the Yucatán Peninsula, the 2330 known species of vascular plants, belonging to 956 genera and 161 families, represent 6% of the Mexican flora (Ramírez-Morillo, 2019; Villaseñor, 2016). Previous bioprospecting of Yucatecan native plant extracts for activity against phytopathogenic fungi has revealed good fungicidal properties of extracts from plants such as *Acacia pennatula*, *Acalypha gaumeri* and *Croton chichenensis* (Vargas-Díaz *et al.*, 2014; Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Peraza-Sánchez *et al.*, 2005).

Because of the increasing demand for natural fungicides to control habanero pepper diseases, more bioprospecting programs have been needed. Therefore, here, we screened 184 extracts from 40 plant species native to the Yucatán Peninsula for activity against *F. equiseti* FCHE and *F. oxysporum* FCHJ strains from habanero pepper (Table1), examined hyphae using scanning electron microscopy (SEM) for any morphological effects of the active extracts and analyzed the chemical profile of the active fractions obtained from active extracts using liquid chromatography–ultraviolet–high-resolution mass spectrometry (LC-UV-HRMS).

2.2. Materials and Methods

2.2.1. Plant Materials

Plants were collected from six locations in the Yucatán Peninsula: (1) Jahuactal, Ejido Caobas, Othón Pompeyo Blanco (18°15'34" N, 88°57'14"W), (2) Kaxil Kiuic, Oxkutzcab (20°06'10.8" N; 89°33'43.2"W), (3) Punta Laguna, Valladolid (20°38'49.4"N, 87°38'02.2"W), (4) Xmaben, Hopelchén (19°15'42.92"N, 89°21'45.91"W), (5) Punta Pulticub, Othón P. Blanco (19°04'29.96"N, 87°33'17.15"W), and (6) Chacchoben Limones, Othón P. Blanco (19°01'44.31"N, 88°08'00.38"W) of Yucatán and Quintana Roo states (Table 1). Each plant was separated into leaves, stems and roots for separate extractions, and whole plants (WP) of some species were extracted. Plant materials were dried in a lamp stove at (55-60 °C, 5 d) and crushed in a mill (model 1520, Pagani, Azcapotzalco, Mex). with blades and no. 5 mm mesh (Figure 2.1). A voucher specimen for each plant species was deposited in the Roger Orellana Herbarium of

the Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán and identified by experts (Table 1).

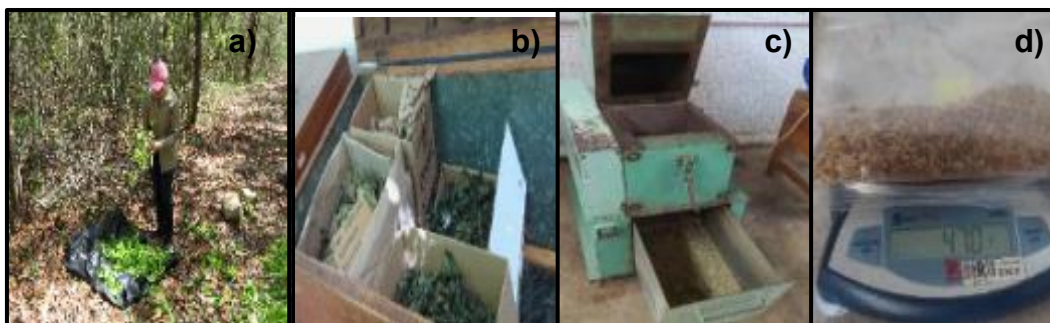


Figure 2.1 Plant material processing a) separation, b) drying and c) milling and d) storage.

Table 2.1. Plants collected from the Yucatán Peninsula to screen for activity against *F. equiseti* strain FHCE and *F. oxysporum* strain FCHJ.

Species	Local Name ^a	Family	Site	Voucher	Plant Parts Used
<i>Alseis yucatanensis</i> Standl.	<i>ja'as che'</i>	Rubiaceae	Kiuic	JLT-3179	L
<i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm.	<i>bel siinik che'</i>	Simaroubaceae	Jahuactal	GC-8236	L, S, R
<i>Annona primigenia</i> Standl. & Steyerm		Annonaceae	Jahuactal	GC-8057	L, SB
<i>Bakeridesia notolophium</i> (A. Gray) Hochr.		Malvaceae	Punta Pulticub	RD-s/n	L, S
<i>Bravaisia berlandieriana</i> (Nees) T.F.Daniel	<i>Juluub</i>	Acanthaceae	Punta Laguna	GC-8168	L, S, R
<i>Byrsonima bucidifolia</i> Standl.		Malpighiaceae	Jahuactal	GC-8087	L, S, R
<i>Calea jamaicensis</i> (L.) L.	<i>tu' xikin</i>	Asteraceae	Jahuactal	GC-8084	WP
<i>Cameraria latifolia</i> L.	<i>cheechen blanco</i>	Apocynaceae	Jahuactal	JLT-1165	L, SB, R
<i>Chrysophyllum mexicanum</i> Brandegees ex Standl.	<i>chi'kéej</i>	Sapotaceae	Jahuactal	GC-8082	L, S, R
<i>Coccoloba</i> sp.		Polygonaceae	Xmaben	GC-8258	L, S
<i>Croton arboreus</i> Millsp.	<i>pak che'</i>	Euphorbiaceae	Jahuactal	JLT-1132	L, S, R
<i>Croton itzaeus</i> Lundell		Euphorbiaceae	Jahuactal	JLT-1138	L, SB, RB
<i>Croton</i> sp.		Euphorbiaceae	Xmaben	GC-8262	WP
<i>Cupania</i> sp.		Sapindaceae	Chacchoben Limones	GC-8009	L, S
<i>Diospyros</i> sp.		Ebenaceae	Punta Laguna	GC-8147	L
<i>Erythroxylum confusum</i> Britton		Erythroxylaceae	Jahuactal	JLT-1143	L, S, R
<i>Erythroxylum rotundifolium</i> Lunan	<i>baak soots'</i>	Erythroxylaceae	Jahuactal	GC-8179	L, S
<i>Erythroxylum</i> sp.		Erythroxylaceae	Punta Laguna	GC-8137	L
<i>Eugenia</i> sp.		Myrtaceae	Punta Laguna	GC-8127	L, S, R
<i>Euphorbia armourii</i> Millsp.	<i>kabal chakaj</i>	Euphorbiaceae	Kaxil Kiuic	JLT-3182	WP
<i>Guettarda combsii</i> Urb.		Rubiaceae	Jahuactal	GC-8047	L, SB, RB
<i>Helicteres baruensis</i> Jacq.	<i>sutup</i>	Malvaceae	Kaxil Kiuic	GC-8127	L, S, R

<i>Heteropterys laurifolia</i> (L.) A. Juss.	<i>chillo aak'</i>	Malpighiaceae	Jahuactal	GC-8035	L, SB, R
<i>Hybanthus yucatanensis</i> Millsp.		Violaceae	Punta Laguna	GC-8158	L, S
<i>Ipomoea clavata</i> (G. Don) Ooststr. ex J.F. Macbr.	<i>ulu'um ja'</i>	Convolvulaceae	Kaxil Kiuic	JLT-3181	WP
<i>Karwinskia humboldtiana</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) Zucc.	<i>I u'um che'</i>	Rhamnaceae	Kaxil Kiuic	JLT-3188	L
<i>Licaria</i> sp.		Lauraceae	Jahuactal	GC-8037	L, SB, RB
<i>Macrocephala diademata</i> (Ker Gawl.) W.D. Stevens	<i>aak'tóom paap</i>	Apocynaceae	Kaxil Kiuic	JLT-3187	L, SB
<i>Malpighia glabra</i> L.		Malpighiaceae	Punta Laguna	GC-8144	L, S, R
<i>Morella cerifera</i> (L.) Small.		Myricaceae	Jahuactal	JLT-1137	L, S, RB
<i>Mosannonna depressa</i> (Ball.) Chatrou	<i>sak éelemuy</i>	Annonaceae	Jahuactal	GC-8085	L, SB, RB
<i>Parathesis cubana</i> (A. DC.) Molinet & M. Gómez		Primulaceae	Jahuactal	JLT-1133	L, SB, RB
<i>Paullinia</i> sp.		Sapindaceae	Punta Laguna	GC-8106	L, R
<i>Piper neesianum</i> C. DC.		Piperaceae	Jahuactal	GC-8080	L, S, R
<i>Psychotria</i> sp.		Rubiaceae	Jahuactal	GC-8086	WP
<i>Randia aculeata</i> L.	<i>kat ku'uk</i>	Rubiaceae	Punta Laguna	GC-8156	L, S, R
<i>Serjania caracasana</i> (Jacq.) Willd.		Sapindaceae	Punta Laguna	GC-8114	L, S, R
<i>Simarouba glauca</i> DC.		Simaroubaceae	Jahuactal	GC-8081	L, SB, RB
<i>Stemmadenia donnell-smithii</i> (Rose) Woodson		Apocynaceae	Jahuactal	GC-8056	L, SB
<i>Turnera aromatica</i> Arbo		Passifloraceae	Jahuactal	GC-8081	WP

a [http://www.cicy.mx/sitios/flora%20digital/ficha_virtual.php?especie=820 (21/May/2020)]; SB: stem bark; RB: root bark; L: leaves; S: stem; R: root; WP: whole plant.

2.2.2. Preparation of plant extracts

2.2.2.1. Aqueous extracts

The dried, ground plant material (1.5 g) was transferred to an Erlenmeyer flask, and 20 mL of boiling distilled water were added. After 15 min, the sample was filtered through filter paper (Whatman no. 1) and cotton to remove solid residues, then diluted with distilled water to 25 mL, to obtain an aqueous extract (AE) with a final concentration of 6% (w/v). Under aseptic conditions, the infusion was sterilized using a 0.22 μm Millipore filter (Merck-Millipore, Burlington, MA, USA), and frozen at -17.5 ± 0.5 °C until use (Cruz-Estrada *et al.*, 2019).

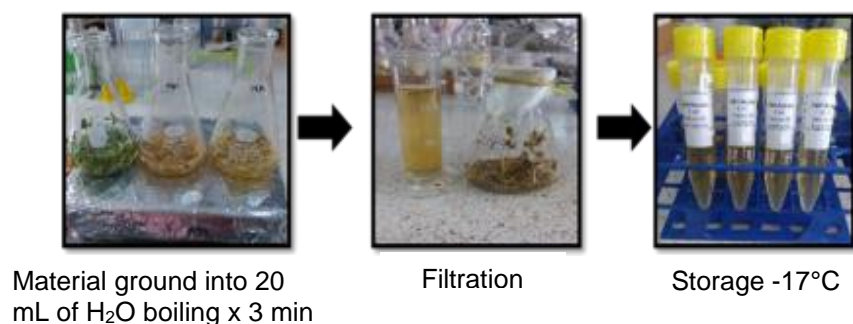


Figure 2.2 Obtaining aqueous extracts from dry plants.

2.2.2.2. Ethanolic extracts

The dried, ground plant material was immersed in ethanol (1.5% of the total volume) and extracted three times with ethanol by sonication at 20 kHz (Cole-Parmer, Chicago, IL, USA), at room temperature for 20 min each time. The solvent was filtered and eliminated under vacuum in a rotary evaporator (IKA model RV-10, Staufen, Germany) at 40 °C to obtain the ethanolic crude extract (Vargas-Díaz, *et al.*, 2014).

The EEs with the greatest activity in the antifungal assay described (Section 4.4) were partitioned with hexane–acetonitrile three times (2: 1, 1: 1, 1: 1 v/v) and solvents removed as described above. In this way, a hexane fraction (A), acetonitrile fraction (B) and methanol-soluble precipitate (C) of each EE were obtained.

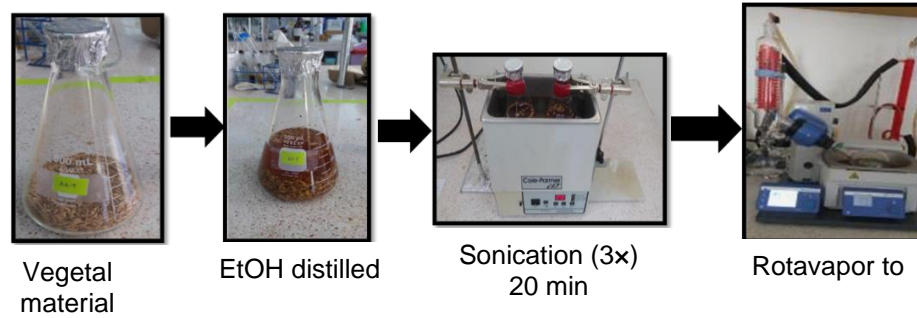


Figure 2.3 Ethanolic extracts of plant species.

2.2.3. Fungal cultures

Phytopathogenic strains of *Fusarium equiseti* (FCHE, GenBank acc. MG020433) and *F. oxysporum* (FCHJ, GenBank acc. MG020428) were obtained from the fungal collection of the Phytopathology Laboratory, Tecnológico Nacional de México, Instituto Tecnológico de Conkal. These strains were isolated from stem and root lesions of habanero pepper plants (Mis-Mut, *et al.*, 2015). The strains were maintained by transferring a mycelial disc (5 mm diameter) to (a) 20% glycerol (v/v) and frozen at $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$, (b) sterile distilled water and (c) commercial potato dextrose agar in slant tubes (PDA, BD, Bioxon, Edo. México) and stored at $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ in the dark.

2.2.4. Antifungal microdilution assay of extracts

2.2.4.1. Preparation of conidial suspension

F. equiseti and *F. oxysporum* strains were reactivated on PDA and incubated at $27 \pm 2\text{ }^{\circ}\text{C}$, with 16 h light/8 h dark in a humidity chamber to induce sporulation. After 7 days, the surface of the culture was flooded with a sterile saline solution (5 mL), then gently scraped with a sterile brush to release conidia into the saline. The resulting conidial suspension was filtered through a double layer of sterile cheesecloth and adjusted to a final concentration of 1×10^5 conidia/mL for both pathogens with sterile saline solution, using a hemocytometer (Abou-Jawdah *et al.*, 2002)

Table 2.2. Numerical scale for mycelial growth inhibition readings in the microdilution bioassay (CLSI, 2002).

Reading parameter	Class	ICM %
Normal growth of the pathogen, same with the negative control	4	0
Little growth or only 25% of growth compared to negative control	1	75
50% reduction in mycelial growth compared to negative control	2	50
Little inhibition or only 75% of the growth of the negative control	3	25
Total inhibition of mycelial growth	0	100

2.2.4.2. Bioassay with ethanolic extracts

Each EE was dissolved in a mixture of dimethylsulfoxide (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) with 0.5% Tween 20 to obtain a solution at 40 µg/µL EE. Then 10 µL of this EE solution were added to each microwell, containing 90 µL of RPMI liquid medium (Roswell Park Memorial Institute 1640). Mirage CE 45 (5 µL) was used as the positive control as described above; negative growth controls were RPMI (Merck Millipore Darmstadt, Germany), water (100 µL) and a blank (0.5% Tween 20 DMSO: RPMI 1:9, v/v). Each microwell then received 100 µL of the conidial suspension for a final EE concentration of 2000 µg/mL and 5% of DMSO with 0.5% Tween 20 (Merck Millipore Darmstadt, Germany) (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). All tests were done three times, and the plates were incubated and assessed as described above.

2.2.5. Minimum inhibitory concentration of active EEs and fractions

Serial dilutions of fractions A, B and C and active EE solutions (80 µg/µL), prepared as described above, were evaluated in a microdilution assay to determine the MIC (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). The EEs were tested at final concentrations of 2000, 1000, 500 and 250 µg/mL. The fractions were evaluated at 1000, 500 and 250 µg/mL. The commercial α -asarone standard (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was tested at 500, 250 and 125 µg/mL. The same controls and incubation conditions were used as described above. All determinations were made with four replicates, three times. After incubation at 96 h, the MIC was determined as the lowest concentration of the extract at which no mycelial growth was observed in the well.

After 96 h of incubation, 10 μ L from each well that had no growth were transferred to PDA and incubated at 27 ± 2 °C. After 72 h, the presence of growth was cataloged as fungicidal, the absence of growth as fungistatic (Irkin y Korukluoglu, 2007).

2.2.6. Effect of ethanolic extracts on hyphal morphology of *Fusarium* strains

The strains of *F. equiseti* and *F. oxysporum* were grown on PDA in Petri dishes for 7 d, then 5 mm disks were removed from the growing edge of the colony. The samples were fixed in 2.5% v/v glutaraldehyde (Merck Millipore Darmstadt, Germany) and 0.2 M sodium phosphate (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) pH 7.2 for 48 h at 4 °C and washed twice with the phosphate buffer (1 h each time). The samples were dehydrated in an ethanol series (1 h each: 30, 50, 70, 85, 96 and 100%, 2 \times absolute ethanol). The samples were dried with CO₂ in a Sandri-795 critical point dryer (Tousimis Research Corp., Rockville, MD, USA), then attached to a sample holder using double-sided adhesive carbon tape and coated with gold for 10 min in an ionizing chamber (Dentom Vacuum-Desk II, Moorestown, NJ, USA). The samples were observed in a JSM 6360 SEM (Jeol, Tokyo, Japan) at 20 kV.

After the fungus was exposed for 96 h to 200 μ L of EE from *M. depressa*, the mixture was filtered through a nylon membrane (nucleic acid blotting membrane Hybond N+ 0.45 μ m) (GE Healthcare Bioscience, Amersham PI, Little Chalfont, UK), and the fungal samples were fixed as described above.

2.2.7. Chromatographic and spectrometric analyses

2.2.7.1. Thin Layer Chromatography (TLC)

The active EEs and their fractions were analyzed by thin layer chromatography (TLC) using an aluminum support impregnated with 0.25 mm thick G-60 silica gel with fluorescent indicator F₂₅₄ (Merck Millipore, Burlington, MA, USA). In parallel, the commercial standard α -asarone (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) was applied to confirm its presence in *M. depressa* extracts. The plates were developed in three elution systems: hexane-acetone (8:2), CH₂Cl₂-AcOEt (9:1) and CH₂Cl₂-MeOH (85:15). After separation, the metabolites were visualized with ultraviolet light (UV₂₅₄ and UV₃₆₅) and phosphomolybdic acid (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

2.2.7.2. LC-UV-HRMS

The active fractions (2 μ L) from *M. depressa* stem bark (MDT-b) and root bark (MDR-b) were analyzed by liquid chromatography–ultraviolet–high-resolution mass spectrometry (LC-UV-HRMS) using a data-dependent acquisition protocol (Martín *et al.*, 2014). Chromatograms and mass spectra were obtained using an LC-MS (Agilent, Santa Clara, CA, USA) coupled to a Bruker Maxis HR-QTOF mass detector (Bruker Daltonics GmbH, Bremen, Germany) at 40 °C. A Zorbax SB-C8 column (Agilent, Santa Clara, CA, USA) was used (2.1 \times 30 mm) with a mobile phase of a mixture of solvent A (water–acetonitrile 90:10 with 0.01% v/v trifluoroacetic acid and 1.3 mM ammonium formate) and solvent B (water–acetonitrile 10:90 with 0.01% v/v trifluoroacetic acid and 1.3 mM ammonium formate) and a flow rate of 300 μ L/min. The gradient was set for a constant flow rate of 10% B to 100% B in 6 min, 100% B for 2 min, then 10% B for 2 min. Mass spectra (150 to 2000 *m/z*) were acquired in positive mode. The components detected were compared with the MEDINA database of microbial metabolites and the Chapman & Hall Dictionary of Natural Products (v25.1, CRC Press, Boca Raton, FL, USA).

2.2.8. Statistical analyses

For the % MGI data, a one-way analysis of variance was performed with prior transformation of the original data using the formula: $y = \arcsin [\sqrt{y/100}]$. The treatment means were compared using Tukey's multiple range test ($p = 0.05$). Variance analyses were performed using SAS ver. 9.4 for Windows (SAS Institute, Cary, NC, USA). IC₅₀ and IC₉₅ values with 95% confidence intervals were calculated for EEs and effective fractions using a probit analysis.

2.3. Results

2.3.1. Antifungal activity of plant extracts against *Fusarium* spp.

Table 2.3 shows the results of active plant extracts on mycelial growth of *F. equiseti* FCHE and *F. oxysporum* FCHJ. Ethanolic extracts (EEs) from *Mosannonna depressa* (bark of stem and root), *Parathesis cubana* (root) and *Piper neesianum* (leaves) at 2000 µg/mL and aqueous extracts (AE) from *Cameraria latifolia* (root), *Calea jamaicensis* (whole plant) and *Heteropterys laurifolia* (leaves) at 3% w/v were active against one or both *Fusarium* strains after 96 h. All these active extracts inhibited mycelial growth of *F. equiseti*, but only four EEs inhibited mycelial growth of *F. oxysporum*. No active AEs were detected against *F. oxysporum*.

Table 2.3 Inhibition of mycelial growth of *Fusarium equiseti* strain FCHE and *F. oxysporum* strain FCHJ by active plant extracts from native species of the Yucatán Peninsula in microdilution assay.

Extract Concentration	Plant Species	Mycelial Growth Inhibition (%)							
		<i>Fusarium equiseti</i>				<i>Fusarium oxysporum</i>			
		L	S	R	WP	L	S	R	WP
Ethanolic	<i>Mosannonna depressa</i>	0 ^c	100 ^a	100 ^a	ne	0 ^b	100 ^a	100 ^a	ne
2000 µg/mL	<i>Parathesis cubana</i>	0 ^c	0 ^b	100 ^a	ne	0 ^b	0 ^b	100 ^a	ne
	<i>Piper neesianum</i>	100 ^a	0 ^b	0 ^c	ne	75 ^a	0 ^b	0 ^b	ne
Aqueous 3% w/v	<i>Cameraria latifolia</i>	0 ^c	0 ^b	25 ^b	ne	0 ^b	0 ^b	0 ^b	ne
	<i>Calea jamaicensis</i>	ne	ne	ne	75	ne	ne	ne	0
	<i>Heteropterys laurifolia</i>	25 ^b	0 ^b	0	ne	0 ^b	0 ^b	0 ^b	ne
Negative C	RPMI					0 ^b			0 ^b
	blank					0 ^b			0 ^b
Positive C	Prochloraz 0.11%					100 ^a			100 ^a

C: control; L: leaves; S: stem, R: root; WP: whole plant; RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium; ne: not evaluated; blank: dimethyl sulfoxide with 0.5% Tween 20. ^{a,b,c}: means with different letters within columns differ significantly (Tukey's test, $p < 0.05$). Extracts from *M. depressa* were from bark of stems and roots.

Complete mycelial growth inhibition (MGI of 100%) for both phytopathogens was achieved with EEs from *M. depressa* bark of stems and *P. cubana* roots. The EE from leaves of *P. neesianum* was also effective (MGI of 100% against *F. equiseti* and 75% against *F. oxysporum*). The AE from *C. jamaicensis* also achieved 75% MGI against *F. equiseti*. The EAs from *C. latifolia* root and *H. laurifolia* leaves achieved MGI of only 25% against *F. equiseti* (Table 2.3). On the other hand, none of the EAs had any activity against *F. oxysporum*. The positive control, prochloraz (0.11%), completely inhibited the growth of the two phytopathogens, and typical mycelial growth

of both plant pathogens was observed for the negative controls. The other plant extracts did not cause significant mycelial growth inhibition with respect to the negative control (Table S1).

2.3.2. Minimum inhibitory concentration of ethanolic extracts, fractions and α -asarone

The minimum inhibitory concentration (MIC) of the four EEs that completely inhibited mycelial growth of both *Fusarium* strains was determined. *F. equiseti* was more sensitive to the extracts from *M. depressa* stem bark, *P. cubana* roots and *P. neesianum* leaves (MIC: 1000 $\mu\text{g/mL}$). All these active extracts were fungicidal, except for the extract from leaves of *P. neesianum*, which was fungistatic (Table 2.4). In contrast, *F. oxysporum* was less sensitive to the four EEs, which were fungistatic and had MICs of 2000 $\mu\text{g/mL}$. Therefore, the four EEs were partition-fractionated, and serial dilutions of each fraction (hexane, acetonitrile and a methanol-soluble precipitate) were tested for activity.

The most active fractions against *F. oxysporum* were the hexane (MDT-a) and acetonitrile (MDT-b) fractions from *M. depressa* stem bark, which were both fungistatic, and the hexane fraction from *P. cubana* roots (PCR-a), which was fungicidal; all had a MIC of 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Table 3). As expected, a fungicidal effect on *F. equiseti* was induced by half of the fractions, with a MIC of 1000 $\mu\text{g/mL}$. These fractions were the same as those that inhibited *F. oxysporum*: the acetonitrile fraction from *P. neesianum* leaves (PNH-b), precipitates of *P. cubana* roots (PCR-c) and *P. neesianum* leaves (PNH-c). The fractions obtained from the root bark and the precipitate of the stem bark of *M. depressa* were considered as inactive against the two pathogens because their MIC was greater than 1000 $\mu\text{g/mL}$ (Table 2.4).

The MIC of the commercial α -asarone standard, evaluated in parallel with the fractions, was 500 $\mu\text{g/mL}$ against *F. equiseti* with fungistatic effect, and >500 $\mu\text{g/mL}$ against *F. oxysporum* (Table 2.4).

Table 2.4. Minimum inhibitory concentration (MIC) of extracts and fractions from *Mosannonna depressa* (bark of stems and roots), *P. cubana* (roots), *P. neesianum* (leaves) and α -asarone against *Fusarium equiseti* strain FCHE and *F. oxysporum* strain FCHJ.

Extract/ Fraction	Solvent	<i>Fusarium equiseti</i>					<i>Fusarium oxysporum</i>				
		2000	1000	500	250	MIC	2000	1000	500	250	MIC
MDT	E	100 ^a	100 ^a	75 ^c	0 ^c	1000 ++	100 ^a	75 ^b	0 ^f	0 ^b	2000+
MDT-a	H	ne	100 ^a	0 ^e	0 ^c	1000++	ne	100 ^a	0 ^f	0 ^b	1000+
MDT-b	A	ne	100 ^a	83 ^b	0 ^c	1000++	ne	100 ^a	75 ^b	0 ^b	1000+
MDT-c	P	ne	75 ^c	50 ^d	0 ^c	>1000	ne	75 ^b	50 ^d	0 ^b	>1000
MDR	E	100 ^a	83 ^b	0 ^e	0 ^c	2000++	100 ^a	75 ^b	0 ^f	0 ^b	2000+
MDR-a	H	ne	0 ^d	0 ^e	0 ^c	>1000	ne	0 ^d	0 ^f	0 ^b	>1000
MDR-b	A	ne	75 ^c	0 ^e	0 ^c	>1000	ne	0 ^d	0 ^f	0 ^b	>1000
MDR-c	P	ne	83 ^b	50 ^d	0 ^c	>1000	ne	75 ^b	50 ^d	0 ^b	>1000
PCR	E	100 ^a	100 ^a	0 ^e	0 ^c	1000++	100 ^a	58 ^c	25 ^e	0 ^b	2000+
PCR-a	H	ne	100 ^a	0 ^e	0 ^c	1000++	ne	100 ^a	0 ^f	0 ^b	1000++
PCR-b	A	ne	100 ^a	0 ^e	0 ^c	1000++	ne	0 ^d	0 ^f	0 ^b	>1000
PCR-c	P	ne	0 ^d	0 ^e	0 ^c	>1000	ne	0 ^d	0 ^f	0 ^b	>1000
PNH	E	100 ^a	100 ^a	0 ^e	0 ^c	1000+	75 ^b	ne	ne	ne	2000+
PNH-a	H	ne	0 ^d	0 ^e	0 ^c	>1000	ne	ne	ne	ne	
PNH-b	A	ne	100 ^a	83 ^b	0 ^c	1000++	ne	ne	ne	ne	
PNH-c	P	ne	100 ^a	0 ^e	0 ^c	1000+	ne	ne	ne	ne	
α -asarone	CS		ne	100 ^a	75 ^b	500++	ne	ne	66 ^c	0 ^b	>500
NC		0 ^b	0 ^d	0 ^e	0 ^c		0 ^c	0 ^d	0 ^f	0 ^b	
PC		100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a		100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	

MDT: *Mosannonna depressa* (stem bark); MDR: *M. depressa* (root bark); PCR: *Parathesis cubana* (root); PNH: *Piper neesianum* (leaves); -a,-b,-c: nomenclature of fractions related with the solvent used; NC: negative control (conidial suspension/RPMI: Roswell Park Memorial Institute medium); PC: positive control (prochloraz 0.11%); E: ethanol; H: hexane; A: acetonitrile; P: precipitate; CS: commercial standard; ne: not evaluated; (++) : fungicidal; (+) : fungistatic. ^{a,b,c,d}: Means with different letters within columns differ significantly (Tukey's test, $p < 0.05$).

2.3.3. Inhibitory Concentration (IC₅₀ and IC₉₅)

The α -asarone standard had the lowest IC₅₀ and IC₉₅ against both species, followed by the MDT-b fraction from *M. depressa* stem bark (Table 2.5). Interestingly, the IC₅₀ and IC₉₅ for the MDT-b fraction and α -asarone were very similar against *F. oxysporum* (respectively, 472 and 539 $\mu\text{g/mL}$, MDT-b, 482 and 526 $\mu\text{g/mL}$, α -asarone). Against *F. equiseti*, the IC₅₀ and IC₉₅ for the MDT-b and PNH-b fractions were both 462 and 526 $\mu\text{g/mL}$, respectively, higher than for α -asarone and similar to those for the EE from *M. depressa* stem bark.

Table 2.5. IC₅₀ and IC₉₅ of active extracts and fractions from *Mosannonna depressa*, *Parathesis cubana*, *Piper neesianum* and of the commercial standard α -asarone against mycelial growth of *Fusarium equiseti* strain FCHE and *F. oxysporum* strain FCHJ.

Source	Extract/ Fraction	<i>Fusarium equiseti</i>		<i>Fusarium oxysporum</i>	
		IC ₅₀ (CI)	IC ₉₅ (CI)	IC ₅₀ (CI)	IC ₉₅ (CI)
<i>M. depressa</i>	MDT	468 (455–477)	545 (534–561)	944 (889–965)	1079 (1051–1156)
	MDT-b	462 (412–476)	526 (515–562)	472 (432–483)	539 (524–596)
α -asarone	CS	236 (216–244)	269 (259–289)	482 (459–494)	526 (521–582)
					1494 (1407–1602)
<i>P. cubana</i>	PCR	788 (545–984)	866 (638–1063)	876 (836–920)	
<i>P. neesianum</i>	PNH	788 (545–984)	866 (638–1063)	ne	ne
	PNH-b	462 (412–476)	526 (515–562)	ne	ne

CI: confidence interval; CS: commercial standard; MDT: *Mosannonna depressa* (stem bark); PCR: *Parathesis cubana* (root); PNH: *Piper neesianum* (leaves); b: acetonitrile fraction; ne: not evaluated.

2.3.4. Effect of active extracts from *Mosannonna depressa* on morphology of *Fusarium* strains

The SEM of the untreated strains (negative control) showed typical well-formed hyphae and microconidia (Figures 1A–D and 2A–D). After 96 h of exposure to 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EE from *M. depressa* stem bark, *F. equiseti* had distorted hyphae, globular structures along the surface of the mycelium and contorted and dehydrated conidia (Figure 1E). Conidia of the same strain were similarly affected by 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ EE from *M. depressa* root bark (Figure 1F).

Exposure of *F. oxysporum* to EE from *M. depressa* stem bark at 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ also led to malformed hyphae and contorted, dehydrated microconidia (Figure 2E), while EE from *M. depressa* root bark at 2000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ induced dehydration and distortion of hyphae and dehydration of microconidia (Figure 2F).

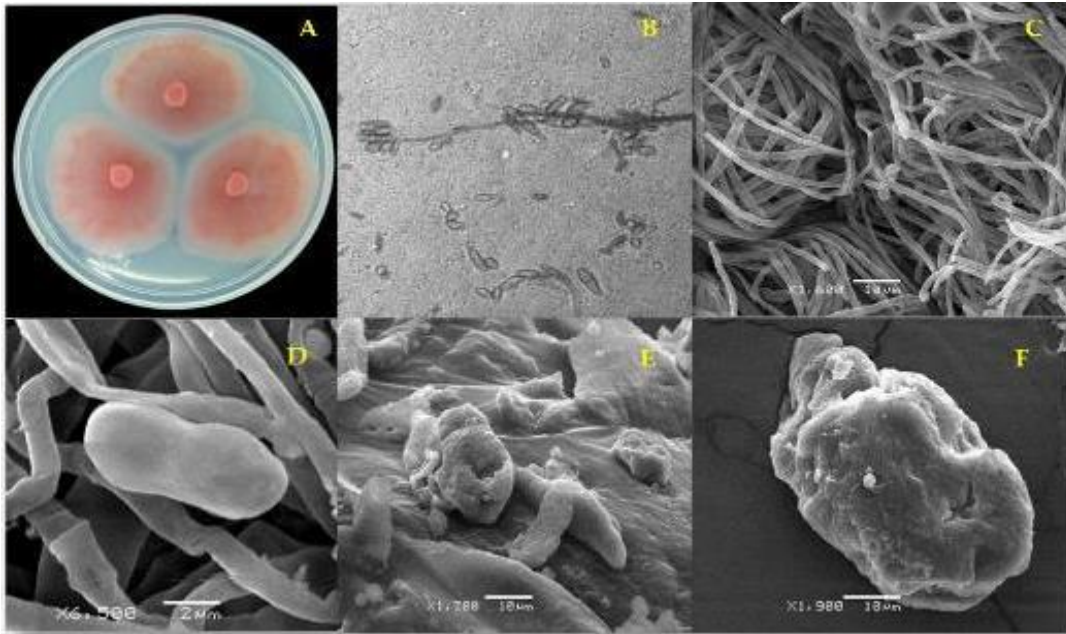


Figure 2.4. *Fusarium equiseti* strain FCHE morphology (A) after 7 d on potato dextrose agar; (B) microconidia of *F. equiseti* 1000x and (C) typical untreated mycelium and microconidia (negative control); (D) apparently normal microconidium and (E) distorted mycelium and collapsed microconidia after 96 h treatment with ethanolic extract from *Mosannonna depressa* stem bark at 2000 µg/mL; (F) rough surface of a collapsed-looking microconidium after 96 h treatment with 2000 µg/mL ethanolic extract from *M. depressa* root bark.

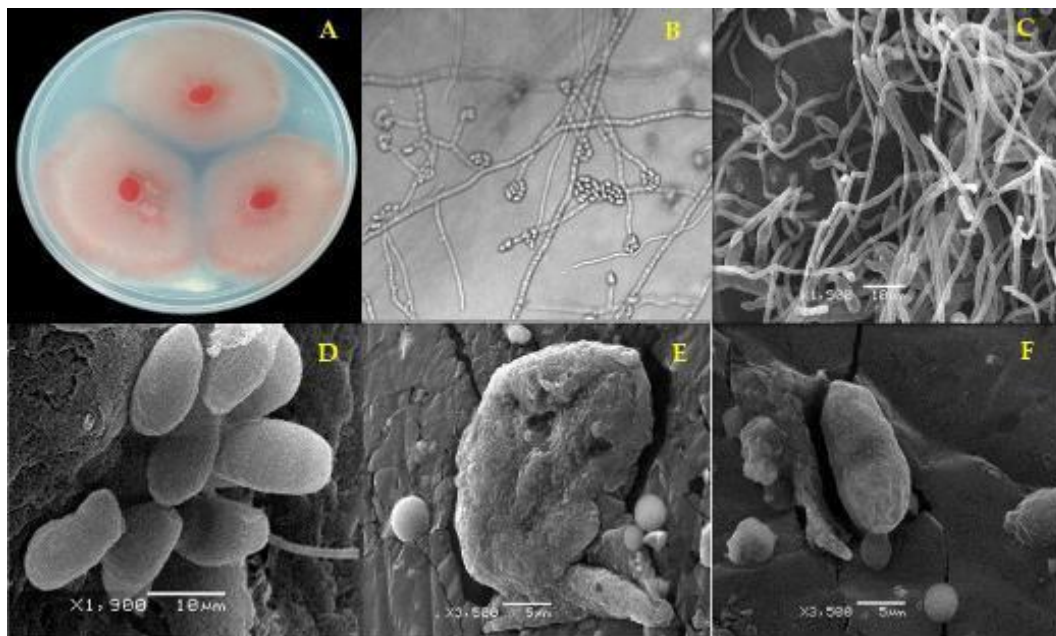


Figure 2.5. *Fusarium oxysporum* strain FCHJ morphology (A) after 7 d on potato dextrose agar (PDA). (B) Microconidia 1000x and (C) typical mycelium and microconidia (negative control); (D) apparently normal microconidia, (E) misshapen and collapsed microconidium after 96 h treatment with ethanolic extract from *Mosannonna depressa* stem bark at 2000

µg/mL; (F) collapsed conidium after 96 h treatment with ethanolic extract from *M. depressa* root bark at 2000 µg/mL.

2.3.5. Identification of active components in extracts from *Mosannonna depressa* by LC-UV-HRMS

The MDT-b and MDR-b fractions from *M. depressa* bark from the stem and roots were analyzed by LC-UV-HRMS (Table 2.6 and 2.7). The chromatogram of the MDT-b fraction showed five components, with the most abundant eluted at a retention time of 4.27 min (peak 3, Figure 2.6). The HRMS of peak 3 presented a protonated molecular ion at m/z 209.1172, indicative of a molecular formula of $C_{12}H_{16}O_3$ (calc. for $C_{12}H_{17}O_3^+$, 209.1173), and its UV spectrum exhibited maxima at 220, 260 and 320 nm. This component was identified as α -asarone based on the reference spectrum in the equipment databases and confirmed using a commercial standard (Figure 2.6, Table 2.6). The minor components at retention times of 2.33, 2.55, 4.8 and 4.89 min had structural characteristics similar to those of α -asarone, and their UV and HRMS data were compared with databases in the literature and Chapman & Hall Dictionary of Natural Products (CHDNP). The HRMS of peak 1 showed UV maxima at 230 and 290 nm, and a protonated ion at m/z 225.1120, suggesting a molecular formula of $C_{12}H_{16}O_4$ (calc. for $C_{12}H_{17}O_4^+$, 225.1121), which was not assigned to any previously reported compound after comparison of the UV and HRMS data with databases in the literature and CHDNP. The analysis of peak 2 showed a protonated ion at m/z of 197.0808, with a molecular formula of $C_{10}H_{12}O_4$ (calc. for $C_{10}H_{13}O_4^+$, 197.0808) and UV maxima at 238, 270 and 345 nm; thus, the compound was tentatively identified as asaraldehyde. Components 4 and 5 had the same UV maxima at 220, 240 and 290 nm and protonated ions at m/z 221.1170 and 193.0857, respectively, accounting for molecular formulae of $C_{13}H_{16}O_3$ (calc. for $C_{13}H_{17}O_3^+$, 221.1172) for component 4 and $C_{11}H_{12}O_3$ (calc. for $C_{11}H_{13}O_3^+$, 193.0859) for component 5. After an exhaustive comparison of their spectral data with CHDNP and databases in the literature, compound 5 was tentatively identified as isomyristicin, but compound 4 was not identified (Table 2.6).

Table 2.6. Metabolites identified from acetonitrile fraction of *Mosannonna depressa* stem bark (MDT-b) by liquid chromatography–ultraviolet–high-resolution mass spectrometry (LC-UV-HRMS).

Peak	Retention Time (min)	[M + H] ⁺	MW	Molecular Formula	Compound
1	2.23	225.1120	224.1120	$C_{12}H_{16}O_4$	Not identified
2	2.55	197.0808	196.0735	$C_{10}H_{12}O_4$	Asaraldehyde
3	4.27	209.1172	208.1099	$C_{12}H_{16}O_3$	α -Asarone
4	4.81	221.1170	220.1097	$C_{13}H_{16}O_3$	Not identified
5	4.89	193.0857	192.0784	$C_{11}H_{12}O_3$	Isomyristicin

MW: molecular weight.

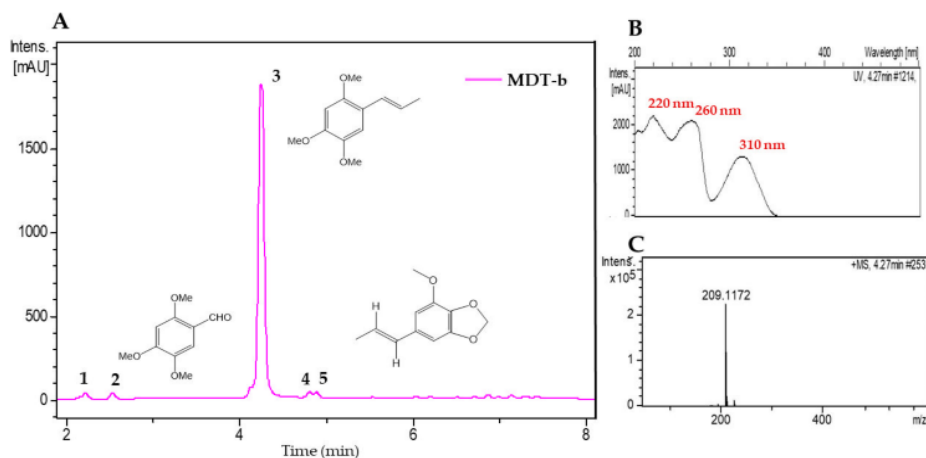


Figure 2.6. (A) Liquid chromatogram (UV 210 nm) of acetonitrile fraction from stem bark of *Mosannona depressa* (MDT-b). **1:** Not identified ($C_{12}H_{16}O_4$), **2:** asaraldehyde, **3:** α -asarone, **4:** not identified, **5:** *trans*-isomyristicin. (B) UV spectrum of peak **3** and (C) high-resolution mass spectrum of peak **3**.

Two components were detected in the medium polarity fraction (MDR-b) from *M. depressa* root bark (Figure 2.7). The most abundant was peak 2, with a retention time of 4.37 min, showing a protonated ion at m/z 239.1278, with a molecular formula of $C_{13}H_{18}O_4$ (calc. for $C_{13}H_{19}O_4^+$, 239.1278); its UV spectrum presented maxima at 205, 215 and 280 nm. Comparison of these data with the databases led us to tentatively identify peak 2 as 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl) benzene (Table 2.7). Data for peak 1 at a retention time of 4.25 min corresponded to α -asarone (Table 2.7).

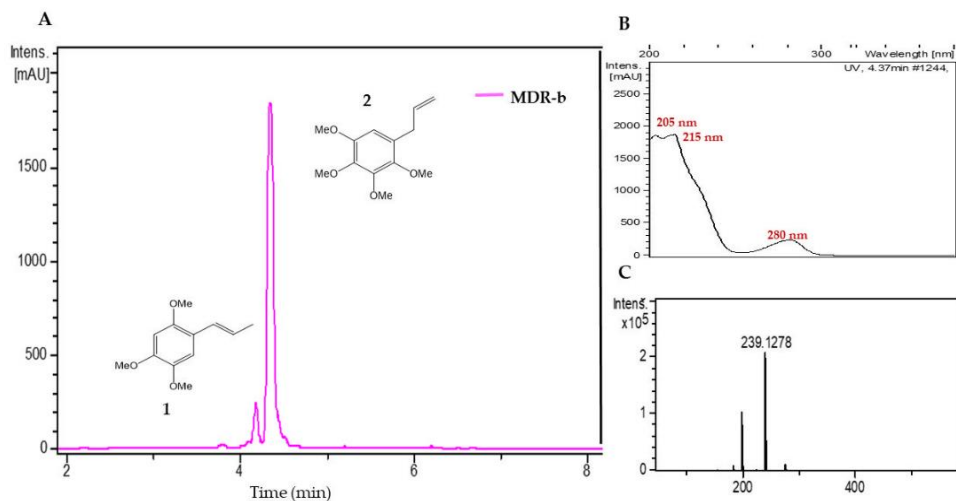


Figure 2.7. (A) Liquid chromatogram (UV at 210 nm) of the acetonitrile fraction from *Mosannona depressa* root bark (MDR-b); **1**: α -asarone **2**: 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl) benzene. (B) UV spectrum of peak 2 and (C) high-resolution mass spectra of peak 2.

Table 2.7. Compounds identified in the acetonitrile fraction of the ethanolic extract of *Mosannona depressa* root bark (MDR-b) using LC-UV-HRMS.

Peak	Retention Time (min)	[M + H] ⁺	MW	Molecular Formula	Compound
1	4.25	209.1172	208.1094	C ₁₂ H ₁₆ O ₃	α -Asarone
2	4.37	239.1278	238.1205	C ₁₃ H ₁₈ O ₄	1,2,3,4-Tetramethoxy-5-(2-propenyl) benzene

MW: molecular weight

2.4 Discussion

This first bioprospecting report on plant extracts with activity against fungal pathogens of habanero pepper is part of continuing efforts to discover potential bioactive compounds in the diverse flora of southeastern México. From sites not previously explored, we collected 40 plant species that our exhaustive search of the literature showed had not been tested against fungal phytopathogens, with the exception of *Annona primigenia* (Mogle, 2013; Baños *et al.*, 2002) and *Mosannonna depressa* (Jimenez-Arellanes, 1996; Enríques, 1980). Antifungal screening of EEs and AEs from different vegetative parts of the 40 plant species led to the detection of six (15% of the total) species with activity against the *Fusarium* strains tested. These active extracts were from *Calea jamaicensis*, *Cameraria latifolia*, *Heteropterys laurifolia*, *Mosannonna depressa*, *Parathesis cubana* and *Piper neesianum*. Interestingly, these plant species belong to different families and were collected at the same site, Jahuactal, a tropical evergreen rainforest with trees exceeding 20 m in height.

Fusarium equiseti was more sensitive than *F. oxysporum* to the plant extracts tested. Mycelial growth of *F. oxysporum* was inhibited by only four EEs, representing 4.3% of the plant extracts tested, and totally insensitive to AEs at the tested concentration (3% w/v). Several studies have indicated that AEs, even at higher concentrations, have limited effect on *F. oxysporum*. For example, the mycelial growth of *F. oxysporum* was inhibited 10–55% by extracts from leaves at 10% w/v of *Ocimum sanctum* (Sharma *et al.*, 2019) and stems, root and fruits of *Momordica charantia* (Gupta *et al.*, 2016), among others.

In contrast, in our study, four EEs completely inhibited the mycelial growth of both plant pathogens; the EEs from the bark of stems and roots of *M. depressa* were especially effective. Native to Mexico and Central America, this medicinal tree (syn. *Annona depressa*, *Guatteria gaumeri*, *Malmea depressa* and *M. gaumeri*) has a wide range of biological activities in humans, e.g., antifungal, antiproliferative, antiprotozoal, cytotoxic, hypoglycemic and hypocholesterolemic (Fort *et al.*, 2018; Husain *et al.*, 2017; Mejía, 2016). For agriculture applications, however, a chloroform extract from the stem bark of *M. depressa* was reported only as a growth inhibitor of *Amaranthus hypochondriacus* (IC₅₀ = 134 µg/mL) and *Echinochloa crusgalli* (IC₅₀ = 457 µg/mL), and as a fungicide against *F. oxysporum* (MIC = 400 µg/mL) [31]; EEs from *M. depressa* stem and root bark had antifungal activity against *Penicillium oxalicum* (MIC = 250 µg/mL) (Godoy-Rodríguez, 2019).

The present report is also the first on the fungicidal effect of the EEs from *M. depressa* against *F. equiseti*. The MIC of 1000 µg/mL for EEs from the bark of stems and roots of *M. depressa* is comparable to the effect against *F. equiseti* reported for ethanolic extracts of leaves from *Calycopteris floribunda* (MIC: 500 µg/mL) (Saha y Rahman, 2008) and rhizomes from *Acorus calamus* (MIC: 1000 µg/mL) (Begum *et al.*, 2007). In the case of *F. oxysporum*, here, both EEs from the bark of stems and roots of *M. depressa* were fungistatic with a higher MIC of 2000 µg/mL. In a previous study, a chloroform extract of the stem bark of *M. depressa* was antifungal against *F. oxysporum* (MIC: 400 µg/mL) and *Trichophyton mentagrophytes* (MIC: 500 µg/mL) (Jimenez-Arellanes *et al.*, 1996). The lower MIC may be attributed to the polarity of the solvent used and the susceptibility and forma specialis of the pathogenic strain tested (Rinez *et al.*, 2013). Matos *et al.*, (1999) found variation in the sensitivity to *Chelidonium majus* extracts among six *F. oxysporum* isolates, with f. sp. *cubense* the most sensitive.

The guided fractionation with the antifungal assay of the EEs from the bark of stems and roots of *M. depressa* showed that *F. equiseti* and *F. oxysporum* were more sensitive to the MDT-b fraction. LC-UV-HRMS analyses revealed a mixture of phenylpropanoids in the MDT-b fraction; the major component was α-asarone, with minor components asaraldehyde and isomyristicin, tentatively identified based on their UV and HRMS data. In the literature, we found only two phytochemical studies of an organic extract from *M. depressa* stem bark, which had a different metabolic profile (Jimenez-Arellanes *et al.*, 1996; Enríques *et al.*, 1980). Our results agree with the report by Enríques *et al.*, (1980) who identified α-asarone as the most abundant component in a hexane extract, which also included asaraldehyde, *trans*-isoelemicin and *trans*-isomyristicin. In the study by Jimenez-Arellanes *et al.*, [31], a chloroform extract contained four tetramethoxy derivatives [1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)-benzene, 2,3,4,5-tetramethoxybenzaldehyde, 2,3,4,5-tetramethoxycinnamaldehyde, 2,3,4,5-tetramethoxycinnamyl alcohol] and *trans*-isomyristicin. Such differences in composition could be attributed to season, phenological stage and geographical region where plants were collected, which can greatly influence chemical biosynthesis and bioactivity. For example, essential oils from *Perilla frutescens* collected from 11 areas in China differed in yields and chemical composition, which were associated with antioxidant and antifungal activities (Tian *et al.*, 2014). When total alkaloids and the annomontine and oxopurpureine content from roots and leaves of *Annona purpurea* were monitored over time, the alkaloid was high during the dry season and during flowering; the strongest antifungal activity was obtained from the root extracts during the last month of the dry season (De-la-Cruz-Chacón *et al.*, 2019).

In our investigation, α -asarone (syn. *trans*-asarone) was identified as the principal compound responsible for the antifungal effect on *F. equiseti* and *F. oxysporum*. Its IC₅₀ (236 and 482 $\mu\text{g/mL}$, respectively) and IC₉₅ (269 and 526 $\mu\text{g/mL}$, respectively) were lower than those of the EE from *M. depressa* stem bark. An antifungal effect of α -asarone at 1000 mg/L has been reported for the phytopathogens *Phytophthora infestans* and *Pyricularia grisea* with growth inhibition (GI) of 85 and 53%, respectively (Lee, 2007), for *Botrytis cinerea*, *F. oxysporum* and *Phomopsis obscurans* (GI = 57.7, 43.6 and 41.5%, respectively) at 300 μM (Chen *et al.*, 2016) and slight activity against the yeasts *Candida albicans*, *C. kruseii* and *C. parapsilasis* at 100 $\mu\text{g/mL}$ (Momin y Nair, 2002). It also has pesticidal properties as an antifeedant against *Helicoverpa zea*, *Helionthis virescens* and *Manduca sexta*; it is insecticidal against *Aedes aegypti* and *Lucila sericata*, and nematocidal against *Caenorhabditis elegans*, *Panagrellus redivivus* and *Nyppostrongylus brasiliensis* (Momin y Nair, 2002; Perrett y Whitfield, 1995). Interestingly, Jimenez-Arellanes *et al.*, (1996) reported that 1,2,3,4-tetramethoxy-5-(2-propenyl)-benzene was the most abundant component in the chloroform extract (0.71% from dried stem bark) and the major phyto-growth inhibitory compound in *Amaranthus hychondriacus* (IC₅₀ = 43 $\mu\text{g/mL}$) and *E. crusgalli* (IC₅₀ = 43 $\mu\text{g/mL}$), and it had an antifungal effect on an undocumented strain of *F. oxysporum* (MIC: 250 $\mu\text{g/mL}$). In the present study, this compound was not detected from the stem extracts. However, it was abundant in the MDR-b fraction from *M. depressa* root bark, but it had no effect on the mycelial growth of *F. oxysporum* strain FCHJ, and *F. equiseti* strain FCHE was only moderately sensitive (75% MGI at 1000 $\mu\text{g/mL}$). Based on these results, the antifungal activity of *M. depressa* collected in Jahuactal is considered to be primarily due to the presence of α -asarone in the extract.

As shown by SEM, EE from *M. depressa* stem bark at 2000 $\mu\text{g/mL}$ caused prominent morphological alterations of *F. oxysporum* and *F. equiseti*. Hyphae were malformed and contorted, and microconidia had collapsed. This effect is similar to the morphological changes in conidia and hyphae of the filamentous zoopathogenic fungus *Microsporium gyseum* after 4 d exposure to 100 mg/mL of the β -asarone fraction (Phongpaichit *et al.*, 2005); further cell death of *F. oxysporum* induced by a mixture of asarones (α , β , γ , 3.4:94.3:1%) at 500 $\mu\text{g/mL}$ was observed using epifluorescence microscopy; the rapid cell death is correlated with greater production of reactive oxygen species (Dissanayake *et al.*, 2015). Studies on the mechanism of action of β -asarone showed that it interferes with ergosterol synthesis, thus the ergosterol content is lowered in the plasma membrane of *Aspergillus niger* ATCC 16888 (Venkatesan *et al.*, 2019), confirming that the effect against *F. oxysporum* might be related to the inhibition of ergosterol biosynthesis, as it is in *C. albicans* (Rajput y Karuppaiyl, 2013). Hence, similar to its isomer β -asarone, α -

asarone in the EE from *M. depressa* stem bark might inhibit the mycelial growth of *F. oxysporum* and *F. equiseti* by damaging the plasma membrane and causing cell death. More studies are needed to verify the site of action of asarones and other metabolites of *M. depressa* on fungal pathogens.

Another promising plant species for antifungal compounds in our study was *P. neesianum* (Piperaceae, syn. *Piper sempervirens*, *Arctotonia sempervirens*), a tree used in traditional medicine to treat snake bites and wounds (Giovannini y Howes, 2017; Cruz *et al.*, 2012). The EE from *P. neesianum* leaves and its PNH-b fraction completely inhibited the growth of *F. equiseti* (MIC: 1000 µg/mL) and had the same IC₅₀ and IC₉₅ (462 and 866 µg/mL, respectively) as the MDT-b fraction. This report is the first of an antifungal effect of *P. neesianum* against *F. equiseti* and *F. oxysporum*. The dichloromethane extract from leaves of *P. neesianum* has been reported to have various biological activities as an antioxidant (IC₅₀ = DPPH 0.071 mg/mL) (Cáceres *et al.*, 2012) anti-tyrosinase (IC₅₀= 6.6 µg/mL (Almeda *et al.*, 2015) and anti-urease (IC₅₀ = 12.9 µg/mL) (Cáceres *et al.*, 2018). Essential oil from *P. neesianum* leaves collected in the northern region of Guatemala contained bicyclogermacrene (28%), germacrene D (11.7%) and β-caryophyllene (7.5%) as major compounds among 19 detected in a gas chromatography with flame ionization detection- mass spectrometry analysis (Cruz *et al.*, 2012).

The EE from *P. cubana* (Primulaceae; syn. *Ardisia cubana*) roots was also active against both *Fusarium* pathogens, and the low polarity PCR-a fraction was fungicidal (MIC: 1000 µg/mL). These findings are the first report of a biological activity for extracts from *P. cubana*.

The EA from *C. jamaicensis* (Asteraceae) was the only EA that moderately inhibited the growth of *F. equiseti*, suggesting that it produces a highly polar antifungal metabolite(s). This species was documented to have leishmanicidal activity and to be useful for treating colds and stomach pain (Calderón *et al.*, 2010; Ober *et al.*, 1986), but the present report is the first on its antifungal activity. Among 125 *Calea* species, only *C. urticifolia* has been tested against fungal pathogens, but it had no activity against *F. oxysporum* (Gamboa-Angulo *et al.*, 2008; Lima *et al.*, 2018). Acacetin, O-methylacacetin, jamaicolides A–D and prumichromene B have been identified in aerial parts of *C. jamaicensis* (Ober *et al.*, 1986).

In summary, the present investigation revealed that *F. equiseti* FCHE and *F. oxysporum* FCHJ strains isolated from habanero pepper plants were sensitive to extracts from six native plant species, and the most effective were the EEs from *M. depressa*, *P. cubana* and *P. neesianum*,

and advanced our knowledge about the phytochemicals in the roots of *M. depressa* from the Yucatán Peninsula. α -Asarone was identified as the principal antifungal component in the stem bark of *M. depressa*. Now, we need to determine the persistence of its antifungal effect and any toxicity to the environment and beneficial macro- and microorganisms in the soil as a pure compound and in the complex ethanolic extract mixture.

Our knowledge on the pesticidal potential of the native Mexican flora has also been enriched, and on the basis of our broad screening, we will isolate and identify the compounds in the active EEs from *P. cubana* and *P. neesianum* and the AE from *C. jamaicensis* that contribute to the antifungal activity. Subsequently, we expect to propagate the promising species to provide material for greenhouse and field experiments. Of course, the mechanism and sites of action of the identified metabolites in the fungus need to be determined, and the metabolites tested for safety against nontarget organisms. This research also opens opportunities for future studies on the conservation and sustainable use of our regional flora in the development of biorational products for the integrated management of *C. chinense* and other species of *Capsicum*.

CAPÍTULO III

CONTROL *IN VITRO* Y EN FRUTOS POSTCOSECHA DE *CAPSICUM CHINENSE* DE *CURVULARIA LUNATA* CON EXTRACTOS DE PLANTAS DE LA PENÍNSULA DE YUCATÁN

3.1. INTRODUCCIÓN

En la península de Yucatán la producción hortícola de frutos del chile (*Capsicum* spp.) es limitada por la presencia de enfermedades como manchas foliares y necrosis de frutos (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2013; Tun *et al.*, 2011). En 2018, el estado de Yucatán tuvo una producción de frutos de 1,633 ton y una superficie sembrada de 156 ha (SAGARPA, 2018). Comúnmente, los hongos asociados al deterioro postcosecha del cultivo de chile habanero son las especies *Alternaria alternata*, *A. brassicicola*, *A. solani*, *Curvularia lunata*, *Colletotrichum capsici*, *C. truncatum* y *Penicillium oxalicum* (Godoy-Rodríguez *et al.*, 2019; Hoil-Cocom, 2016; Tun *et al.*, 2011). En chile habanero, la cepa identificada como *C. lunata* (ITC26) se aisló a partir de lesiones en frutos postcosecha (Hoil-Cocom, 2016).

El control de la enfermedad postcosecha se lleva a cabo mediante el uso intensivo de fungicidas sintéticos, tales como el benomilo, carbendazim, clorotalonil, mancozeb, oxiclورو de cobre y la iminoctadina (Zhu *et al.*, 2019; Terramoto *et al.*, 2017; Tun *et al.*, 2011). La mayor parte de estos productos fungicidas inducen resistencia en las cepas fúngicas, y los efectos adversos en los ecosistemas y la salud humana son ampliamente reportados (Carvalho *et al.*, 2017; Gaherwal *et al.*, 2015). En cuanto a la exportación de alimentos, las nuevas reglamentaciones establecidas por la EPA establecen 0% de residualidad de productos biocidas en los alimentos, como es el caso del fruto de chile habanero (Belson, 2000; <https://www.epa.gov/laws-regulations/summary-federal-food-drug-and-cosmetic-act>). Diferentes métodos de control que involucran tratamientos biológicos y físicos se recomiendan para complementar el uso de varios fungicidas naturales (Moya-Elizondo *et al.*, 2016). En un esfuerzo por encontrar nuevos productos antifúngicos naturales para el control de enfermedades postcosecha ocasionadas por el patógeno *C. lunata*, algunos estudios han reportado el efecto antifúngico de extractos de plantas *in vitro* (Majumdar *et al.*, 2019; Moo-Koh *et al.*, 2014; Mishra *et al.*, 2009; Begum *et al.*, 2007). Investigaciones previas, han reportado el potencial antifúngico de extractos obtenidos de la flora regional de la península de Yucatán (México), en diferentes hongos fitopatógenos, incluido el género

Curvularia. El extracto etanólico de las raíces de *Acalypha gaumeri* se ha evaluado contra *Curvularia* sp. (ITC10) inhibiendo en un 83% su crecimiento micelial (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). Estudios previos, *in vitro* han reportado que el extracto acuoso de la corteza de *Bonellia flammea* mostró 100% de inhibición del crecimiento micelial de *Curvularia lunata*, hongo aislado de *C. chinense* (Hoil-Cocom, 2016) y un 87% en *Curvularia lunata* (ITC4) aislada de *Thrinax radiata* (Moo-Koh *et al.*, 2014). A nivel *in vivo*, el extracto acuoso de la corteza de *B. flammea* mostró un control efectivo de la enfermedad postcosecha causada por *C. lunata* y *P. oxalicum* en frutos de *C. chinense* (Hoil-Cocom, 2016). En este sentido, los estudios relacionados con el control de enfermedades postcosecha ocasionados por *C. lunata*, son limitados. Por ello, es urgente ampliar los programas de bioprospección de las plantas regionales, para contribuir en la generación de fungicidas naturales que vayan desplazando a los sintéticos. Por lo anterior, con la finalidad de buscar alternativas biotecnológicas útiles para el control biorracional de patógenos, en el presente capítulo se evaluó *in vitro* la actividad antifúngica de extractos acuosos (EA) y etanólicos (EE) obtenidos de 40 plantas de la península de Yucatán contra el fitopatógeno *C. lunata* y mediante microscopía electrónica de barrido (MEB) se estimó el efecto que ocasionan los extractos activos en la morfología hifal y su control en frutos postcosecha de chile habanero.

3.2. MATERIALES Y MÉTODOS

3.2.1. Cepa estudiada

La cepa de *C. lunata* ITC26 (GenBank No. Acc. Pendiente) se obtuvo de la colección de hongos del Laboratorio de Fitopatología, del Tecnológico Nacional de México, I.T. Conkal. Esta cepa se aisló de frutos postcosecha de chile habanero (Hoil-Cocom, 2016).

3.2.2. Material vegetal

Las 40 plantas seleccionadas se colectaron en seis sitios en la península de Yucatán, México y se procesaron como se describe previamente en el capítulo II, sección 2.2.1 (Figura 2.1). Brevemente, las plantas separadas en hojas, tallo, raíz y algunas en plantas completas (PC) se secaron y se trituraron en un molino. Un espécimen de cada especie de planta se depositó en el herbario *U Najil Tikin Xiw* (la casa de la hierba seca, en maya) de la Unidad de Recursos Naturales del Centro de Investigación Científica de Yucatán, A.C (CICY), con número de colecta asignado en Cuadro 3.1.

Cuadro 3.1. Lista de plantas colectadas para el bioensayo de actividad antifúngica contra la cepa *C. lunata* ITC26.

Especie	No. colecta	Parte usada
<i>Alseis yucatanensis</i> Standl.	JLT-3179	H
<i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm.	GC-8236	H, T, R
<i>Annona primigenia</i> Standl. & Steyerm	GC-8057	H, CT
<i>Bakeridesia notolophium</i> (A. Gray) Hochr.	RD-s/n	H, T
<i>Bravaisia berlandieriana</i> (Nees) T.F.Daniel	GC-8168	H, T, R
<i>Byrsonima bucidifolia</i> Standl.	GC-8087	H, T, R
<i>Calea jamaicensis</i> (L.) L.	GC-8084	PC
<i>Cameraria latifolia</i> L.	JLT-1165	H, CT, R
<i>Chrysophyllum mexicanum</i> Brandegees ex Standl.	GC-8082	H, T, R
<i>Coccoloba</i> sp.	GC-8258	H, T
<i>Croton arboreus</i> Millsp.	JLT-1132	H, T, R
<i>Croton itzaeus</i> Lundell	JLT-1138	H, CT, CR
<i>Croton</i> sp.	GC-8262	PC
<i>Cupania</i> sp.	GC-8009	H, T
<i>Diospyros</i> sp.	GC-8147	H
<i>Erythroxylum confusum</i> Britton	JLT-1143	H, T, R
<i>Erythroxylum rotundifolium</i> Lunan	GC-8179	H, T
<i>Erythroxylum</i> sp.	GC-8137	H
<i>Eugenia</i> sp.	GC-8127	H, T, R
<i>Euphorbia armourii</i> Millsp.	JLT-3182	PC
<i>Guettarda combsii</i> Urb.	GC-8047	L, CT, CR
<i>Helicteres baruensis</i> Jacq.	GC-8127	H, T, R
<i>Heteropterys laurifolia</i> (L.) A. Juss.	GC-8035	H, CT, R
<i>Hybanthus yucatanensis</i> Millsp.	GC-8158	H, T
<i>Ipomoea clavata</i> (G. Don) Ooststr. ex J.F.Macbr.	JLT-3181	PC
<i>Karwinskia humboldtiana</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) Zucc.	JLT-3188	H
<i>Licaria</i> sp.	GC-8037	H, CT, CR
<i>Macroscopis diademata</i> (Ker Gawl.) W.D. Stevens	JLT-3187	H, CT
<i>Malpighia glabra</i> L.	GC-8144	H, T, R
<i>Morella cerifera</i> (L.) Small.	JLT-1137	H, T, CR
<i>Mosannonna depressa</i> (Ball.) Chatrou	GC-8085	H, CT, CR
<i>Parathesis cubana</i> (A. DC.) Molinet & M. Gómez	JLT-1133	H, CT, CR
<i>Paullinia</i> sp.	GC-8106	H, R
<i>Piper neesianum</i> C.DC.	GC-8080	H, T, R
<i>Psychotria</i> sp.	GC-8086	PC
<i>Randia aculeata</i> L.	GC-8156	H, T, R
<i>Serjania caracasana</i> (Jacq.) Willd	GC-8114	H, T, R
<i>Simarouba glauca</i> DC.	GC-8081	H, CT, CR
<i>Stemmadenia donnell-smithii</i> (Rose) Woodson	GC-8056	H, CR
<i>Turnera aromatica</i> Arbo	GC-8081	PC

CT: corteza de tallo; CR: corteza de raíz; H: hojas; T: tallo; R: raíz; PC: planta completa

3.2.3. Preparación de extractos vegetales

3.2.3.1. Extractos acuosos

Los extractos acuosos (EAs) se prepararon por infusión como describe previamente Cruz-Cerino *et al.* (2020). El material vegetal seco y molido (1.5 g) se adicionó a 20 mL de agua destilada en ebullición, a los 15 min se filtró y se aforó a una concentración final del 6% (p/v). Finalmente, bajo condiciones asépticas, la infusión se esterilizó a través de un filtro Millipore (0.22 μm), y se congeló a -17.5 ± 0.5 °C hasta su uso (Cruz-Estrada *et al.*, 2019).

3.2.3.2. Extractos etanólicos y sus fracciones

Los extractos etanólicos (EEs) se prepararon siguiendo lo reportado por Cruz-Cerino *et al.* (2020). Los EE que presentaron la mayor actividad se particionaron con hexano-acetonitrilo tres veces (2:1, 1:1, 1:1, v/v) y se obtuvieron tres fracciones de cada EE, hexano (A), acetonitrilo (B) y un precipitado (C).

3.2.4. Ensayo antifúngico por microdilución contra *Curvularia lunata*

3.2.4.1. Preparación de la suspensión de esporas

La cepa de *C. lunata* se reactivó en agar-avena y se incubó a 27 ± 2 °C durante 11 días en una cámara húmeda para inducir la esporulación. Después, se añadió 5 mL de una disolución salina al 0.85% estéril en la superficie del micelio y se raspó suavemente con la ayuda de un pincel estéril para liberar las esporas. La mezcla de esporas resultante se filtró a través de una gasa estéril y se ajustó a una concentración final de 1×10^5 esporas/mL, respectivamente con la ayuda de un hemocitómetro (Abou *et al.*, 2002).

3.2.4.2. Bioensayo antifúngico de los extractos acuosos (EA) y etanólicos (EE) contra *Curvularia lunata* (ITC26)

La evaluación antifúngica de los EAs y EEs contra *C. lunata* se realizó con el bioensayo en microdilución (Cruz-Cerino *et al.*, 2020). Cada EEs se disolvió en una mezcla de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EE. UU.) con Tween 20 al 0.5% para obtener una disolución de 40 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ de EE. Posteriormente, 10 μL del EE se mezclaron con 90 μL de medio RPMI (Roswell Park Memorial Institute 1640). Luego, en cada micropocillo se añadió 100 μL de

la suspensión de conidios 1×10^5 esporas/mL para una concentración final de 2,000 $\mu\text{g/mL}$. Para evaluar los EAs, 100 μL de cada extracto EAs al 6% se transfirió directamente al medio RPMI 1640 (100 μL). Finalmente, se agregaron 100 μL de la suspensión de conidios para alcanzar una concentración final del 3% p/v. Las pruebas se llevaron a cabo por triplicado y las placas se incubaron a 27°C por cuatro días y se evaluaron a las 96 h como se describe en el capítulo II. El fungicida procloraz (5 μL) al 0.11% (p/v), se usó como control positivo y los controles negativos fueron medio RMPI (Merck Millipore Darmstadt, Alemania), agua (100 μL) y como blanco se usó DMSO-Tween 20 al 0.5%:RPMI (1:9, v/v).

3.2.4.3. Concentración mínima inhibitoria de extractos EEs y fracciones

Las fracciones A, B y C, junto con los EEs activos (80 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) se evaluaron en diluciones seriadas para determinar su concentración mínima inhibitoria (CMI), mediante un ensayo de dilución en una placa de 96 micropozos (Vargas-Díaz *et al.*, 2014). Los EE se evaluaron a concentraciones de 2,000, 1,000, 500, 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$. A la par, las fracciones a partir de 1,000, 500, 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$. Las determinaciones se hicieron por triplicado. Además, el estándar comercial α -asarona se evaluó a 500, 250 y 125 $\mu\text{g/mL}$. Después de 96 h de incubación, se determinó la CMI como la concentración más baja del extracto (100% de inhibición del crecimiento micelial). Posteriormente, una alícuota (10 μL) de cada pocillo sin crecimiento micelial, se transfirió a una caja de Petri con agar PDA y se incubó a 27 ± 2 ° C. A las 72 h, la ausencia del crecimiento del patógeno se catalogó como un efecto fungicida y la presencia como fungistático (Irkin y Korukluoglu, 2007).

3.2.5. Efecto de extractos activos sobre la morfología hifal de *Curvularia lunata*

El efecto de EEs de la corteza del tallo y raíces de *M. depressa* (2,000 $\mu\text{g/mL}$) y el estándar comercial α -asarona (500 $\mu\text{g/mL}$) sobre la morfología hifal de *C. lunata* se observó en el microscopio electrónico de barrido (MEB) (JSM 6360, Jeol®, Japón), a 20 Kv, de acuerdo a la metodología descrita por Cruz-Cerino *et al.* (2020).

3.2.6. Efecto *in vivo* de *M. depressa*, *P. neesianum* y α -asarona contra *Curvularia lunata* en frutos de chile habanero

Los frutos de chile habanero utilizados en el bioensayo fueron del cv. Jaguar de color naranja al madurar (Seminis®). Con el propósito de tener una mayor uniformidad en los frutos, se realizó una selección por color y tamaño descartando aquellos frutos arrugados y dañados. Éstos se

lavaron con agua de la llave y se desinfectaron superficialmente por inmersión en una disolución de alcohol al 70% (1 min), hipoclorito de sodio al 2% (1 min) y luego se enjuagaron doblemente en agua destilada estéril (2 min). Enseguida, se realizaron pequeñas lesiones sobre la superficie de los frutos con la ayuda de una aguja estéril, con la finalidad de favorecer la infección. Todos los extractos etanólicos se diluyeron en tween 80 al 1% (Sigma-Aldrich). Los tratamientos (T) evaluados correspondieron a la corteza del tallo de *M. depressa* a las concentraciones de 750 (T1), 500 (T2) y 250 (T3) µg/mL; las hojas de *P. neesianum* a 750 (T4), 500 (T5) y 250 (T6) µg/mL; el estándar de α-asarona a 500 (T7), 250 (T8) y 125 (T9) µg/mL; el fungicida Mirage® CE45 procloraz (T10) a 450 µg/mL de concentración, como control positivo; frutos tratados con agua (T11) y con Tween 80 al 1% (T12) como controles negativos. Para cada tratamiento, los frutos de chile habanero se sumergieron individualmente por 5 min en los EEs a las concentraciones indicadas. Estos se dejaron secar en la campana de flujo laminar por 40 min y se inocularon por aspersión con una suspensión de esporas de *C. lunata* (1×10^5 esporas/mL). A las 48 h se inoculó por segunda vez (Hoil-Cocom, 2016). Cada tratamiento se realizó con cinco réplicas y se incubaron en charolas de plástico a una temperatura de $27 \pm 2^\circ\text{C}$, hasta que los controles negativos mostraron síntomas de enfermedad. A los 11 días de la inoculación se estimó la severidad del daño en los frutos, y el porcentaje de efectividad de los extractos evaluados, con el uso de una escala de cuatro clases (Sandoval *et al.*, 2011) ajustada para su implementación (Cuadro 3.2). El experimento se repitió en tres diferentes eventos, con un total de 15 réplicas por tratamiento (n=15).

Cuadro 3.2. Escala para evaluar la severidad ocasionada por el fitopatógeno *Curvularia lunata* en frutos de *Capsicum chinense* (Sandoval *et al.*, 2011).

Clases	0	1	2	3
Valores	0	3.68	16.34	50
medios %				
Nivel de severidad (Evidencia visual)	Sin daño visible	Severidad baja	Severidad media	Daño severo
				

3.2.8. Análisis estadístico

Con los datos de inhibición del crecimiento micelial (%ICM), se realizó un análisis de varianza de una vía con los crudos datos transformados con la fórmula: $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$. Las medias de tratamiento se compararon con la prueba de rango múltiple de Tukey ($p = 0.05$). Para el análisis estadístico se utilizó la paquetería SAS versión 9.1 para Windows®. Las inhibiciones del crecimiento 50 (IC₅₀) y 95 (IC₉₅) se calcularon para los EEs y las fracciones efectivas utilizando un análisis Probit con el Statgraphics Centurion v2020.

3.3. Resultados

3.3.1. Actividad antifúngica de extractos vegetales contra *Curvularia lunata*

Los resultados de la exploración de especies efectivas contra *Curvularia lunata* se presentan en el Cuadro 3.3. En total, se detectaron siete EEs con inhibición total del crecimiento micelial a 2,000 µg/mL. Éstos correspondieron a los EEs de corteza del tallo, la raíz de *M. depressa* y las hojas de *P. neesianum*. Mientras, que los extractos de *Alvaradoa amorphoides* (hoja), *Licaria* sp. (raíz), *Helicteres baruensis* (hoja) y *Piper neesianum* (raíz) afectaron moderadamente (ICM =75%) el crecimiento micelial de este patógeno. Por otra parte, cinco EAs mostraron baja capacidad de inhibir el crecimiento (ICM= 25%) de *C. lunata* a la concentración del 3% (p/v). Estos incluyeron a los EAs de *Byrsonima bucidifolia* (hoja, tallo y raíz) y *Morella cerifera* (hoja y raíz).

Cuadro 3.3. Inhibición (%) del crecimiento micelial de los extractos acuosos (3%, p/v) y etanólicos (2,000 µg/mL) del fitopatógeno *Curvularia lunata* ITC26 en el bioensayo de microdilución.

Muestra	Especie vegetal/ órgano	<i>Curvularia lunata</i>		
		Inhibición de crecimiento micelial %		
		H	T	R
Acuosa	<i>Byrsonima bucidifolia</i>	25	25	25
3% p/v	<i>Morella cerifera</i>	25	0	25
Etanólico	<i>Alvaradoa amorphoides</i>	75	0	0
2,000 µg/mL	<i>Helicteres baruensis</i>	75	0	25
	<i>Licaria</i> sp.	0	0	75
	<i>Mosannonna depressa</i>	0	100	100
	<i>Piper neesianum</i>	100	0	75
Control negativo	RPMI+ susp. de esporas			0
Control positivo	procloraz 0.11%			100

H: hoja, T: tallo, R: raíz. Los extractos de *M. depressa* procedían de la corteza de los tallos y las raíces.

3.3.2. Concentración inhibitoria mínima de extractos de EE y fracciones

La CMI más baja fue de 250 µg/mL contra *C. lunata* ocasionada por los EEs de corteza de tallo y raíces de *M. depressa*. Con mayor CMI (500 µg/mL) se detectó al estándar comercial α -asarona, el precipitado MDR-c de la raíz de *M. depressa*, el EE de las hojas de *P. neesianum* y su fracción de acetonitrilo PNH-b. La actividad detectada es fungistática en todos los casos. Las fracciones hexánicas de los tres EEs activos resultaron inactivas contra este patógeno (Cuadro 3.4).

Cuadro 3.4 Concentración mínima inhibitoria (CMI) de extractos activos y fracciones de *M. depressa* (corteza de tallo y raíces) y *P. neesianum* (hoja), contra *Curvularia lunata* en el ensayo de microdilución.

Extracto/Fracción	Disolvente	<i>Curvularia lunata</i>					
		Concentración de extractos (µg/mL)					
		2000	1000	500	250	125	CMI
MDT	Etanol	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	0 ^c	250+
MDT-a	Hexánica	ne	50 ^b	0 ^e	0 ^g	0 ^c	>1000
MDT-b	Acetonitrilo	ne	100 ^a	75 ^c	25 ^f	0 ^c	1000+
MDT-c	Precipitado	ne	100 ^a	75 ^c	25 ^f	0 ^c	1000+
MDR	Etanol	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	0 ^c	250+
MDR-a	Hexánica	ne	50 ^b	25 ^d	0 ^g	0 ^c	>1000
MDR-b	Acetonitrilo	ne	100 ^a	83 ^b	50 ^e	0 ^c	1000+
MDR-c	Precipitado	ne	100 ^a	100 ^a	83 ^c	0 ^c	500+
α-asarona			ne	100 ^a	75 ^d	25 ^b	500+
PNH	Etanol	100 ^a	100 ^a	100 ^a	0 ^g	0 ^c	500+
PNH-a	Hexánica	ne	25 ^c	25 ^d	0 ^g	0 ^c	>1000
PNH-b	Acetonitrilo	ne	100 ^a	100 ^a	91 ^b	0 ^c	500+
PNH-c	Precipitado	ne	100 ^a	0 ^e	0 ^g	0 ^c	1,000+
Control negativo		0 ^b	0 ^d	0 ^e	0 ^g	0 ^c	
Control positivo		100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	100 ^a	

MDT: *Mosannonna depressa* (corteza del tallo); MDR: *M. depressa* (corteza de raíz); PNH: *Piper neesianum* (hojas); control negativo (suspensión conidial/RPMI: medio del Roswell Park Memorial Institute); control positivo: (procloraz 0.11%); α-asarona: estándar; ne: no evaluado; +: efecto fungistático. ^{a,b,c} las medias con letras diferentes dentro de las columnas difieren significativamente (prueba de Tukey, $p < 0,05$).

3.3.3. Concentración inhibitoria (CI₅₀ y CI₉₅) de los extractos más activos, fracciones y α-asarona

Los extractos etanólicos MDT y MDR de *M. depressa* mostraron la CI₅₀ (188 µg/mL) y CI₉₅ (218 µg/mL) más bajas contra *C. lunata* (Cuadro 3.5). Aunque el estándar comercial α-asarona mostró una CI₅₀ (190 µg/mL) equivalente a los dos EE, su CI₉₅ de 325 µg/mL fue mayor.

La CI₅₀ y la CI₉₅ para la fracción PNH-b y MDR-c fueron similares contra *C. lunata* (222 y 256 µg/mL, 229 y 265 µg/mL, respectivamente) (Cuadro 3.5). En contraposición, los valores de la CI₅₀ y la CI₉₅ del extracto PNH de *P. neesianum* (hoja) fueron de 378 y 428 µg/mL, respectivamente.

Cuadro 3.5. Concentraciones inhibitorias (CI_{50} y CI_{95}) de extractos activos y fracciones de *Mosannonna depressa*, *Piper neesianum* y el estándar comercial α -asarona en el crecimiento micelial de *Curvularia lunata*.

Fitopatógeno		<i>Curvularia lunata</i>	
		Concentración de extractos $\mu\text{g/mL}$	
Especie/ estándar	Claves	CI_{50} (IC)	CI_{95} (IC)
<i>M. depressa</i>	MDT	188 (42-308)	218 (81-342)
	MDT-b	388 (298-528)	627 (499-1,022)
	MDT-c	388 (298-528)	627 (499-1,022)
	MDR	188 (42-308)	218 (81-342)
	MDR-c	229 (Nc-250)	265 (Nc-241)
Estándar	α -asarona	190 (130-271)	325 (253-631)
<i>P. neesianum</i>	PNH	378 (-933)	428 (-1,032)
	PNH-b	222 (246)	256 (-)

3.3.4 Efecto de los extractos de *Mosannonna depressa* corteza del tallo y raíz sobre la morfología hifal de *Curvularia lunata*

En el control negativo, la cepa *C. lunata* se observan hifas bien formadas y conidios con forma ovoide (Figura 3.1 A-C). Después de las 96 h de exposición con el extracto EE de *M. depressa* corteza del tallo a 2000 $\mu\text{g/mL}$, *C. lunata* mostró conidios contorsionados y deshidratados (Figura 3.1D). Los conidios de la misma cepa fueron igualmente afectados por el EE de la corteza de raíz de *M. depressa* (Figura 3.1E). La exposición de *C. lunata* al estándar comercial α -asarona a 500 $\mu\text{g/mL}$ ocasionó la deshidratación y el colapso de los conidios. (Figura 3.1F).

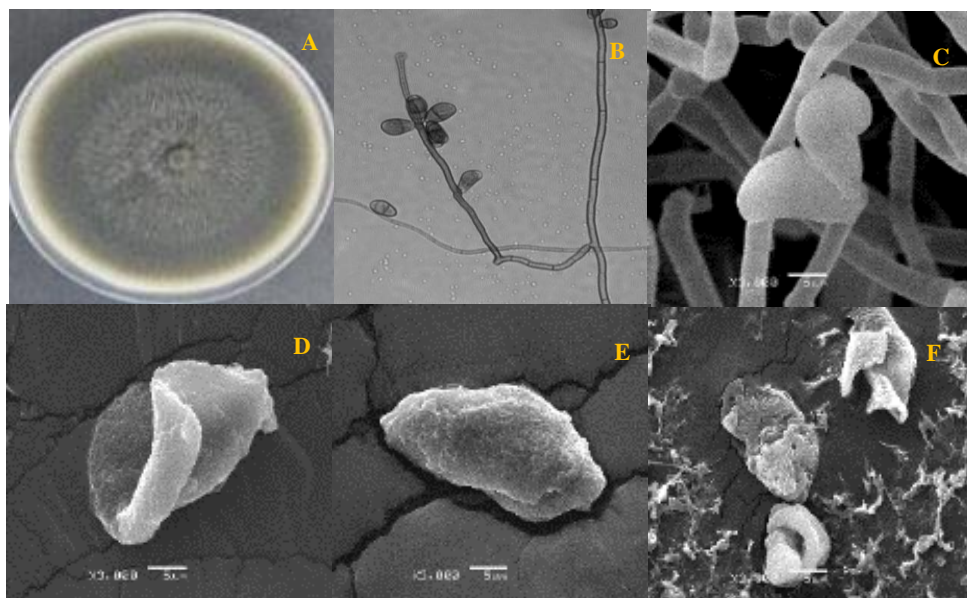


Figura 3.1 Morfología de la cepa ITC26 *Curvularia lunata*. (A) Después de siete días en agar papa dextrosa; (B) conidióforo y conidios de *C. lunata* 1,000x; (C) micrografía de micelio bien formado y microconidios con crecimiento normal (control negativo); (D) conidio contorsionado por efecto del extracto etanólico de *M. depressa* (corteza de tallo) a 2,000 µg/mL; (E) conidio deshidratado por efecto del extracto etanólico de *M. depressa* (corteza de raíz) a 2,000 µg/mL; (F) conidios colapsados después de 96 h del tratamiento con el estándar comercial α-asarona a 500 µg/mL.

3.3.5. Efecto *in vivo* de *M. depressa*, *P. neesianum* y α-asarona contra *Curvularia lunata* en frutos de chile habanero

El análisis de varianza para estimar el efecto de los tratamientos en la disminución de la severidad o control de *C. lunata* aislado de frutos postcosecha mostró diferencias estadísticas significativas ($p \leq 0.01$) entre tratamientos (Cuadro 3.6, Figura 3.2). Los tratamientos con efectividad (IC = 100%) en *C. lunata* en frutos de *C. chinense*, a los 11 días de inoculación correspondieron a los T1, T2, T4, T7 y T10. Los tratamientos más efectivos correspondieron al EE de la corteza del tallo de *M. depressa* y el estándar comercial α-asarona a 500 µg/mL (Cuadro 3.6). Los resultados revelaron que al bajar la concentración de 250 µg/mL en T3 y T6 la severidad se redujo en T3, T6 y T9, estadísticamente iguales ambos extractos, y la α-asarona. Sin embargo, en algunas réplicas se observó un ligero crecimiento micelial en la parte del pedúnculo de los frutos y presencia de necrosamiento en el pedúnculo y crecimiento micelial del patógeno en esta área (Figura 3.2). En el control negativo (T11) a los 11 días después de la inoculación se observó

necrosamiento en los frutos de chile habanero. La mezcla de disolventes Tween 80 al 1% (T12) no mostro toxicidad en los frutos.

Cuadro 3.6. Efectividad de los extractos EEs de la corteza de *Mosannonna depressa*, hojas de *Piper neesianum* y α -asarona en el control de la infección de *Curvularia lunata* en frutos de chile habanero.

Tratamiento	Clave	Concentración $\mu\text{g/mL}$	Severidad (%)	Efectividad (%)
Corteza de tallo de <i>Mosannonna depressa</i>	T1	750	0 ^e	100 ^a
	T2	500	0 ^e	100 ^a
	T3	250	3.4 ^{cd}	93.2 ^{bcd}
Hoja de <i>Piper neesianum</i>	T4	750	0 ^e	100 ^a
	T5	500	1.5 ^d	97 ^{bc}
	T6	250	8 ^{cb}	84 ^c
α -asarona	T7	500	0 ^e	100 ^a
	T8	250	2.9 ^d	94.2 ^{bc}
	T9	125	8 ^{cb}	84 ^c
Procloraz	T10	450	0 ^e	100 ^a
Suspensión de conidios	T11	-	100 ^a	0 ^e
Tween 80 al 1% sin inocular	T12	-	0 ^e	0 ^e

% de efectividad: promedio de cinco réplicas. ^{a,b,c}: Medias con letras diferentes dentro de las columnas difieren significativamente (prueba de Tukey, $p < 0.05$).

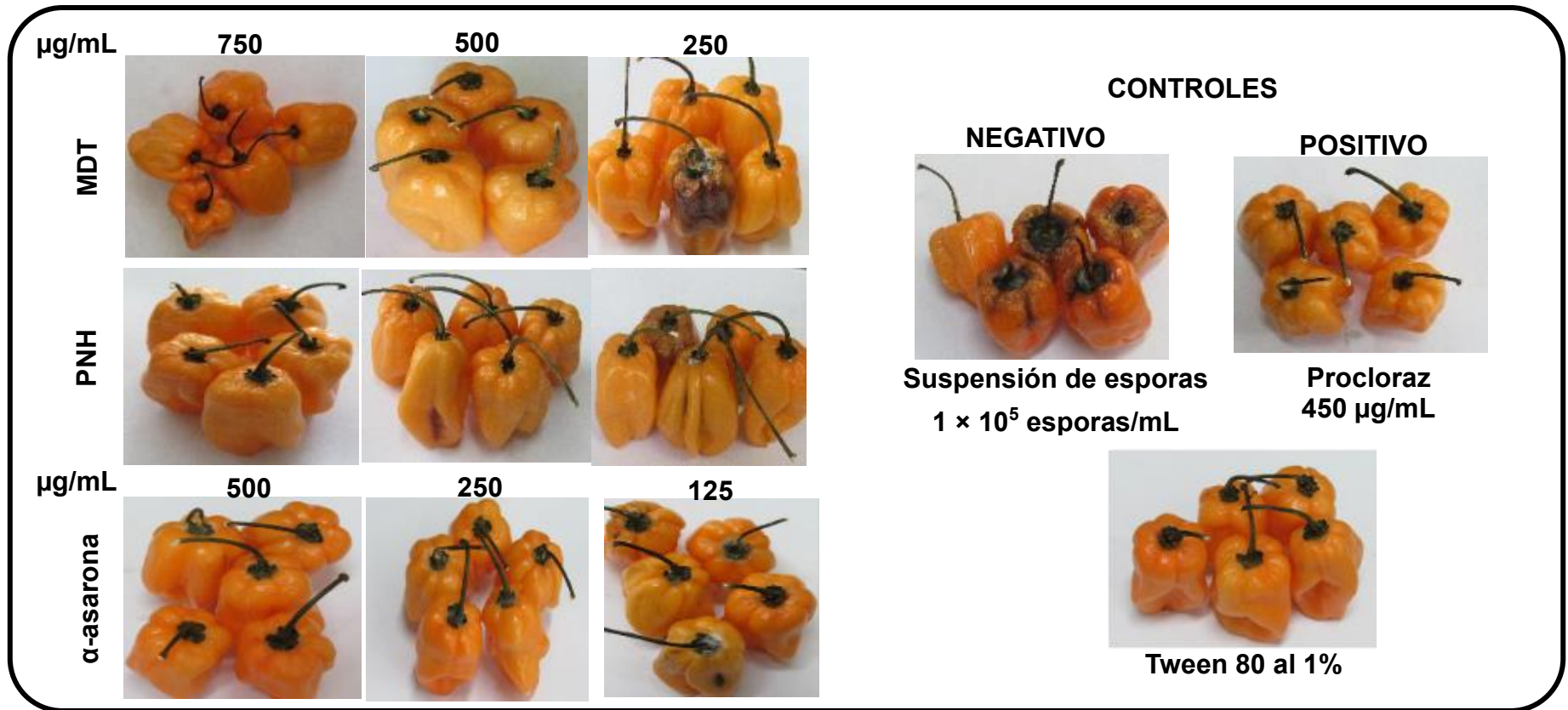


Figura 3.2. Efectividad *in vivo* de los EEs de la corteza del tallo de *M. depressa* (MDT), hojas de *P. neesianum* (PNH) a 750, 500 y 250 µg/mL, y la α-asarona a 500, 250 y 125 µg/mL en frutos de chile habanero contra *Curvularia lunata*. Control negativo: suspensión de conidios, positivo: procloraz a 450 µg/mL y Tween 80 al 1%.

3.4. DISCUSIÓN

En continuidad con la búsqueda de alternativas ecoamigables para controlar las enfermedades ocasionadas por hongos patógenos en el cultivo de chile habanero, se llevó a cabo la evaluación *in vitro* e *in vivo* de extractos orgánicos contra el patógeno *C. lunata*. De estos, algunos han dado resultados promisorios, pudiendo en un futuro aislarse de estos extractos pertenecientes a la flora del sureste de México compuestos bioactivos potenciales.

El ensayo antifúngico *in vitro* condujo a la detección de 13 extractos con actividad antifúngica (18%) contra el fitopatógeno *Curvularia lunata*. Éstos correspondieron a la hoja de *A. amorphoides*, *B. bucidifolia* (hoja, tallo y raíz), *H. baruensis* (hoja, y raíz), *Licaria* sp. (raíz), *M. depressa* (tallo y raíz), *M. cerifera* (hoja y raíz) y *P. neesianum* (hoja y raíz). Estos datos muestran que *C. lunata* es más sensible a los extractos de las especies en estudio, los EEs más efectivos fueron MDT, MDR y PNH. En particular, la corteza del tallo de *M. depressa* mostro las CI_{50} más bajas contra *Fusarium equiseti*, *F. oxysporum* y *Penicillium oxalicum* a 468, 944 y 479 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Cruz-Cerino *et al.*, 2020; Godoy-Rodríguez, 2019). Asimismo, Jimenez-Arellanes *et al.* (1996), indicaron que un extracto clorofórmico de la corteza del tallo de *M. depressa* inhibió el crecimiento de *F. oxysporum* y *Trichophyton mentagrophytes* mostrando CMI de 400 y 500 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Otros EE que son capaces de inhibir totalmente el crecimiento de *C. lunata* incluyen al rizoma de *A. calamus*, las hojas de *Calycopteris floribunda* y la raíz de *Plumbago zeylanica* a las concentraciones de 1,000, 250 y 150 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Saha y Rahman, 2008; Begum *et al.*, 2007; Rahman y Anwar, 2007), y el extracto metanólico de la corteza de *Solanum erianthum* a la concentración de 170 $\mu\text{g/mL}$ controló sólo en 77% el crecimiento micelial de *C. lunata* mostrando una CMI= 112.5 $\mu\text{g/mL}$.

En cuanto, a la fracción de acetonitrilo (MDT-b) de *M. depressa*, se observó que fue menos efectiva contra *C. lunata* que el EE, lo cual sugiere la presencia de cierto efecto sinergista entre los componentes al ser fraccionados. Recientemente se reveló que la fracción MDT-b una mezcla de fenilpropanoides, donde el componente mayoritario fue el compuesto α -asarona (Cruz-Cerino *et al.*, 2020). La α -asarona ha sido previamente reportada con actividad antifúngica contra otras cepas las cuales incluyen a *Alternaria alternata*, *C. lunata* y *Macrophomina phaseolina* (Begum *et al.*, 2004), con ICM del 100% a 400 $\mu\text{g/mL}$, así como contra *F. equiseti* (CI_{50} de 236 $\mu\text{g/mL}$) y *F. oxysporum* (482 $\mu\text{g/mL}$), observando que la cepa ITC26 es más sensible a este compuesto.

Al analizar el micelio y conidios de *C. lunata* en el MEB, expuestos a los EEs de la corteza del tallo y raíces de *M. depressa* a 2,000 µg/mL y al compuesto α-asarona a 500 µg/mL se observaron alteraciones morfológicas, y conidios contorsionados y deshidratados. Estos resultados son similares a lo reportado por Cruz-Cerino *et al.* (2000) contra *F. oxysporum* y *F. equiseti*, sugiriendo la alteración de la permeabilidad de la membrana plasmática, que impide la síntesis de componentes esenciales como el ergosterol. Asimismo, se reporta por primera vez el efecto del compuesto α-asarona al evaluarse a 500 µg/mL sobre la morfología hifal de *C. lunata*, tal exposición ocasionó la deshidratación y el colapso de los conidios.

El EE de las hojas de *P. neesianum* y su fracción de PNH-b inhibieron completamente el crecimiento de *C. lunata* (CMI: 500 µg/mL). En este trabajo se da conocer el primer reporte del EE de hojas de esta especie con actividad antifúngica. Estudios previos, han documentado el efecto antifúngico de otras especies del género *Piper*. Por ejemplo, el EE de las hojas de *Piper betle* inhibió un 57% el crecimiento de *C. lunata* a la concentración de 1,000 µg/mL (Begum *et al.*, 2007) y su extracto clorofórmico presentó una CMI de 560 µg/mL contra *C. lunata* (MTCC 8463) con efecto fungicida (Singha *et al.*, 2011).

Los EEs de las hojas y raíces de *H. baruensis* (Malvaceae) también fueron activos contra *C. lunata*. Este es el primer informe de actividad biológica para extractos de *H. baruensis*. En la literatura se ha dado a conocer que los extractos de éter de petróleo y cloroformo de *H. baruensis* tienen actividad contra *Salmonella enteritidis* y *Bacillus cereus*, esta actividad se le atribuye a esteroides y alcaloides (Tarache, 2007). Con respecto a otras especies del género, se reportó que el extracto metanólico de hojas de *Helicteres guazumifolia* inhibió (ICM=100%) a *Curvularia lunata* (D'Armas *et al.*, 2018).

La especie *Licaria* sp. se reporta por primera vez con actividad antifúngica contra *C. lunata*. A la fecha, no se encontraron reportes de actividad antifúngica de otras especies pertenecientes al género *Licaria*.

El EE de las hojas de *Alvaradoa amorphoides* (Simaroubaceae) inhibió moderadamente el crecimiento de *C. lunata*. En la literatura, la especie *A. amorphoides* se ha reportado con actividad anticancerígena, citotóxica, y antibacteriana, pero no antifúngica (Quintal-Novelo *et al.*, 2015). De las hojas de *A. amorphoides*, se han aislado el ácido crisofánico, crisofanina y chaparrina (De Villatoro *et al.*, 1974).

En cuanto a los extractos EAs, únicamente el 5.4% mostraron capacidad antifúngica con muy baja intensidad (ICM=25%) a la concentración del 3%, p/v. Otros reportes sobre *C. lunata* incluyen los EAs de las hojas de *Ocimum sanctum* (10% p/v) y *Lawsonia Inermis* L. (hoja al 2%, p/v) con inhibición letal de *C. lunata* (Barupal y Sharma, 2017; Gupta *et al.*, 2014) y de la corteza de *Bonellia flammea* (3%, p/v) en un 87% el crecimiento de *C. lunata* (ITC4) aislado de *Thrinax radiata* (Moo-Koh *et al.*, 2014).

Con base en los resultados en los bioensayos antifúngicos *in vitro* contra *C. lunata* de este estudio, y la parte vegetal más efectiva y renovable, se seleccionaron los EEs de la corteza del tallo de *M. depressa* y las hojas de *P. neesianum* y el estándar comercial α -asarona para ser evaluadas en frutos postcosecha de *C. chinense*. Los resultados indicaron que el EE de la corteza del tallo de *M. depressa* controló *in vivo* eficazmente la severidad ocasionada por *C. lunata* en frutos de *C. chinense*, seguido del EE de la hoja de *P. neesianum* y el estándar comercial α -asarona. Este es el primer reporte, obtenido *in vivo* del potencial antifúngico de las especies de *M. depressa*, *P. neesianum* y el estándar α -asarona para controlar el necrosamiento ocasionado por *C. lunata* en frutos postcosecha de *C. chinense*. La presente contribución se suma a los pocos trabajos realizados *in vivo* que reportan la actividad de extractos vegetales contra la especie en estudio, *C. lunata*. Entre estos trabajos se encuentran los realizados por Hoil-Cocom (2016), quienes informaron que el extracto acuoso de la corteza de *Bonellia flammea* (3%, p/v) mostró un control eficiente del patógeno *C. lunata* en frutos postcosecha de *C. chinense*. También, se reportó el efecto del aceite de *Azadirachta indica* (1%, p/v) el cual redujo un 50% el necrosamiento causado por *C. lunata* en frutos de *Capsicum annuum* (Deepika *et al.*, 2012).

CAPÍTULO IV

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS DE *MOSANNONA DEPRESSA* Y *PIPER NEESIANUM* CONTRA *CORYNESPORA CASSIICOLA*, PATÓGENO DE CHILE HABANERO

4.1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de chile (*Capsicum* spp.) en Yucatán presenta enfermedades foliares y de frutos durante la época de lluvias, causadas principalmente por los hongos *Cercospora capsici*, *Alternaria solani* y *Corynespora cassiicola*, entre otros (Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006). Estos fitopatógenos generan disminución en la producción de fotoasimilados importantes en la formación y desarrollo del fruto (Tun *et al.*, 2011; Cristóbal-Alejo *et al.*, 2006). En chile habanero (*C. chinense*), la cepa identificada como *C. cassiicola* (ITC7) se aisló e identificó a partir de lesiones en hojas, uno de los principales inductores de la mancha foliar en el cultivo (Moo-Koh *et al.*, 2014; Tun *et al.*, 2011). Además del chile habanero, *C. cassiicola* causa enfermedades severas en diversos cultivos como el algodón (*Gossypium hirsutum*), chile (*Capsicum annum* L.), jamaica (*Hibiscus safdariffa* L.), papaya (*Carica papaya* L.) y tomate (*Solanum lycopersicum* L. Mill.) (Patricio-Hernández *et al.*, 2020; Tun *et al.*, 2011) entre otros, y a nivel mundial se ha reportado su presencia en más de 530 especies de plantas hospederas (Fortunato *et al.*, 2015; Dixon *et al.*, 2009; Nghia *et al.*, 2008).

El control de *C. cassiicola* ha sido tradicionalmente con fungicidas sintéticos como el benomilo, mancozeb y oxiclورو de cobre (Tun *et al.*, 2011). A pesar de su eficacia en controlar los fitopatógenos, el amplio uso de estos fungicidas provoca efectos nocivos en la salud de los mamíferos, los organismos benéficos y el ambiente (Carvalho, 2017; Gaherwal *et al.*, 2015). Con el fin de disminuir el uso de fungicidas sintéticos, es primordial encontrar nuevos productos antifúngicos naturales para el control de *C. cassiicola*. En este sentido, se han reportado diversos métodos de control de enfermedades foliares, destacando el uso de diferentes extractos de plantas (Manju *et al.*, 2014; Naruzawa y Papa, 2011; Ogbebor y Adekunle, 2005; Pérez *et al.*, 2000). Los productos naturales derivados de plantas son una alternativa para controlar de manera sustentable las enfermedades foliares en los cultivos, debido a su baja residualidad en

el ambiente, y deben presentar baja toxicidad en los organismos benéficos y el ser humano (Walia *et al.*, 2017; Ramírez-Mares y Hernández-Carlos, 2015).

Las investigaciones en el control de enfermedades foliares ocasionados por *C. cassiicola* (ITC7), en *Capsicum* spp. en México son limitadas. En el grupo de trabajo, estudios previos, indicaron el efecto antifúngico de extractos obtenidos de la flora regional de la península de Yucatán en el patógeno *C. cassiicola*. Por ejemplo, el extracto etanólico de las raíces de *Acalypha gaumeri* inhibió en un 97% el crecimiento micelial de *C. cassiicola* (ITC03) aislado de *Capsicum annum* L. (Vargas-Díaz *et al.*, 2014), el extracto acuoso de *Bonellia flammea* tuvo un efecto inhibitor sobre *C. cassiicola* cepa ITC7 aislada de *C. chinense* en un 50% (Moo-Koh *et al.*, 2014). No obstante, con la finalidad de encontrar suficientes alternativas ecológicas para el control de la mancha foliar causada por *Corynespora* en plantas de chile habanero, en el presente estudio se evaluaron a) *in vitro* la actividad antifúngica de ocho extractos obtenidos de las especies nativas *A. amorphoides* (hojas), *C. jamaicensis* (completa), *H. baruensis* (hojas), *M. depressa* (corteza de tallo y raíces), *P. neesianum* (hojas y raíces), y *P. cubana* (raíz) contra *C. cassiicola*; b) la efectividad *in vitro* de los extractos EE más activos en disco de hoja de chile habanero; y c) la inocuidad de los extractos promisorios en la germinación de semillas de *Lactuca sativa* y el organismo benéfico *Eisenia fetida*.

4.2. MATERIALES Y MÉTODOS

4.2.1. Preparación de extractos vegetales y α -asarona

La preparación de los extractos etanólicos de la corteza y raíz de *M. depressa* y las hojas *P. neesianum* se describen previamente en el capítulo II. (Cruz-Cerino *et al.*, 2020). La α -asarona se obtuvo como estándar comercial de (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA).

4.2.2. Material fúngico

La cepa de *Corynespora cassiicola* (ITC7) se obtuvo de lesiones de hojas de *Capsicum chinense* y donada por el Tecnológico Nacional de México campus Conkal. Réplicas de esta cepa se encuentran resguardadas en el cepario institucional en glicerol al 10% a 4 °C en la oscuridad. La cepa de *C. cassiicola* se reactivó en agar PDA y se incubó a 27 ± 2 °C durante nueve días, y se mantuvieron en tubos inclinados conteniendo PDA, por un período de 8 meses en oscuridad a 4 ± 1 °C, hasta su uso.

4.2.3. Bioensayos antifúngicos de extractos etanólicos contra *Corynespora cassiicola*

4.2.3.1. Bioensayo antifúngico por la técnica de minidisco

Para este ensayo se preparó una mezcla de PDA con una suspensión con fragmentos de hifas/esporas (propágulos) de *C. cassiicola* cultivada en PDA. Para esto, en la superficie de la caja Petri con el fitopatógeno se le adicionaron 8 mL de agua destilada estéril. Inmediatamente, con un pincel estéril se raspó toda la superficie de la caja para desprender las hifas y se transfirieron a un tubo Falcón (disolución madre). La mezcla homogeneizada del medio PDA con fragmentos de micelio se diluyó al 25%, con un volumen final de 30 mL. Esta mezcla se vació en una caja Petri y se dejó gelificar, permaneciendo en prueba de esterilidad, 24 h. Posteriormente, con un sacabocado estéril se obtuvieron discos (0.6 mm de diámetro) del micelio de *C. cassiicola* cultivado en medio PDA a los siete días de crecimiento, los cuales se transfirieron a cajas Petri de tres divisiones. En cada división se colocaron cuatro discos y a cada uno se le agregaron 10 μ L del extracto a evaluar a la concentración de 2,000 μ g/mL. Como controles negativos se usaron a) el disco del medio PDA+ hifas y b) el disco de PDA con DMSO+Tween 20 al 0.5%. Como control positivo se utilizó el disco de PDA con procloraz al 0.11%. Las cajas se incubaron a 27°C y al séptimo día se evaluó el crecimiento visual del patógeno y se registró como no activo (—) con la presencia de crecimiento micelial y activos (++) con la ausencia de crecimiento (Figura 4.1).

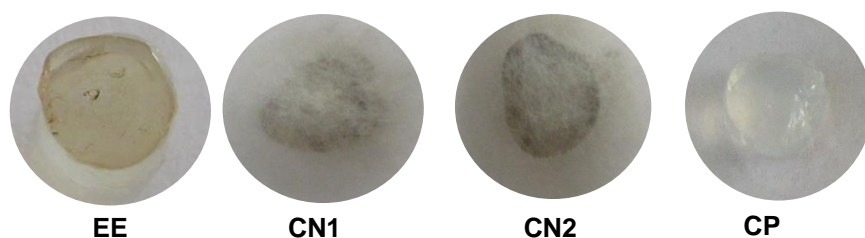


Figura 4.1. Efecto antifúngico de los extractos etanólicos (EE) a 2000 μ g/mL. EE: disco de micelio+ 10 μ L del EE y controles CN1: disco de micelio; CN2: DMSO+Tween 20 al 0.5%; en el crecimiento micelial de *Corynespora cassiicola*.

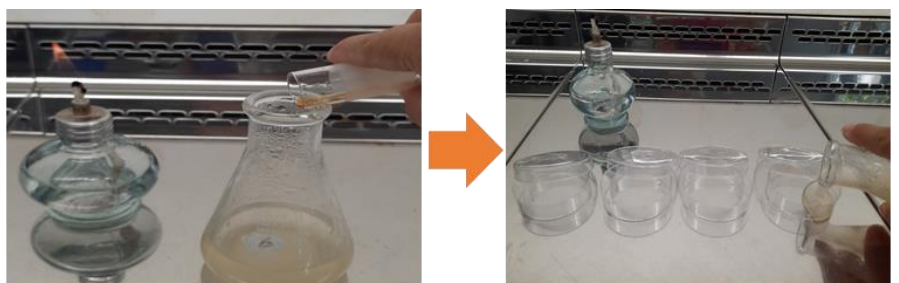
4.2.3.2. Bioensayo antifúngico de dilución en agar

Cada EE (40 mg) se disolvió en 200 μ L de DMSO-Tween 20 al 0.5% y se mezclaron homogéneamente en 40 mL de medio PDA (marca BD Bioxon) estéril mantenido a aproximadamente 50 °C. Un volumen de 10 mL de la mezcla se transfirió a cajas Petri de 6 cm de diámetro y se dejaron gelificar. Después de 24 h a 27 \pm 2°C, se verificó su esterilidad para ser

utilizados en el ensayo. Este proceso se realizó para los EEs de MDT, MDR, PNH y α -asarona. De cada extracto se hicieron tres concentraciones a 1000, 500 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$ y el estándar α -asarona se evaluó a 500, 250 y 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Posteriormente, las cajas se inocularon con un disco de micelio invertido (0.6 mm de diámetro) del fitopatógeno en agar y se incubaron a 27 ± 2 °C. El diámetro del crecimiento micelial (CM) se midió diariamente en direcciones perpendiculares (Wenqiang *et al.*, 2006), hasta que el control negativo (fitopatógeno en la mezcla de DMSO-Tween 20 al 0.5% / medio PDA) cubrió toda la superficie de la caja Petri. Cada tratamiento se realizó por cuadruplicado. Como control positivo de inhibición de crecimiento micelial se utilizó el fungicida Mirage® 45 CE (procloraz) a 1 $\mu\text{L}/\text{mL}$. Los resultados se reportaron como porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM). Para obtenerlo, al diámetro total de crecimiento de cada muestra se restó el diámetro del disco de inoculación inicial (0.6 mm) (Figura 4.2). Posteriormente, al diámetro de crecimiento del control negativo (considerado como un 100%) se le restó el diámetro de la muestra y se aplicó la fórmula de Abbott (Saetae y Suntornsuk, 2010):

$$\% \text{ ICM} = \frac{\text{Control negativo} - \text{crecimiento de la muestra}}{\text{Control negativo}} \times 100$$

Control negativo = Crecimiento micelial total del patógeno en medio PDA/DMSO (0.5%) menos el diámetro del disco inicial (0.6 mm).



40 mg del EE en 200 μL de DMSO-Tween 20 al 0.5%/ 40 mL de PDA

Cuatro réplicas/tratamiento (10 mL)

EEs: MDT:1,000, 500 y 250 $\mu\text{g}/\text{mL}$; **MDR y PNH:**1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$;
 α -asarona: 500, 250 y 125 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



Disco de micelio en el centro de caja de Petri con PDA

Evaluación: 24h/ nueva días

Figura 4.2. Bioensayo de dilución en agar.

4.2.3.3. Bioensayo antifúngico *in vitro* en discos de hoja

Las hojas de chile habanero se lavaron con agua corriente, después se cortaron discos de 2 cm² de diámetro. Éstos se desinfectaron con etanol al 70% en inmersión 1 min y en NaClO al 1% por 1 min y se lavaron dos veces en agua destilada estéril (cuatro discos/tratamientos). Los discos foliares se depositaron al azar en placas con 12 pozos, a los cuales previamente se les transfirió 1.5 mL de agar bacteriológico al 2% en cada uno de los pozos (Figura 4.3). Los extractos EEs de la corteza del tallo de *M. depressa* y las hojas de *P. neesianum* se disolvieron en DMSO+Tween 20 al 0.5% a la concentración de 5 y 2.5 µg/µL (50 y 25 µg/cm², respectivamente). El estándar α -asarona se evaluó a 2.5 y 1.25 µg/µL (25 y 12.5 µg/cm², respectivamente). Los discos foliares fueron impregnados con 20 µL del extracto de cada concentración; evaporado el disolvente, los discos de hoja se impregnaron con 20 µL de la suspensión de propágulos del fitopatógeno *C. cassiicola* y se incubó a 27°C por siete días (Varga *et al.*, 2014). Como control negativo se utilizó la suspensión de propágulos del patógeno y en el positivo el fungicida procloraz al 0.11%. Adicionalmente, se evaluó la inocuidad de la disolución al 1% de DMSO-Tween 20 al 0.5% en los discos de hoja (cuatro discos/EEs, asarona y controles). Para evaluar la actividad antifúngica se siguió la escala propuesta por Boehlendorf *et al.* (2004). La escala consta de cuatro clases como se muestra en el Cuadro 3.2. Estos se reportan como porcentaje de inhibición del crecimiento (IC) de acuerdo al crecimiento (0 = 100, 1 = 75, 2 = 50, 3 = 25, 4 = 0% de IC).

Cuadro 3.2. Escala Boehlendorf *et al.* (2004).

Clases	% IC	Parámetro de Lectura
0	100	No se observó IC
3	75	Ligera IC
7	50	Buena, pero incompleta IC
10	25	Micelio completo en disco

IC=Inhibición de crecimiento micelial



Figura 4.3. Efectividad *in vitro* de extractos etanólicos en hoja de chile habanero contra *Corynespora cassiicola*.

4.2.4. Bioensayo de inocuidad en semillas de *Lactuca sativa*

Los extractos etanólicos de *M. depressa* (corteza de tallo y raíz), *P. neesianum* (hojas) y el estándar comercial α -asarona se evaluaron en el bioensayo de fitotoxicidad. Para las evaluaciones se utilizó como modelo semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) var. Black Seeded Simpson. Las semillas se hidrataron 12 h antes del ensayo. En discos de papel filtro de 2.5 cm² de diámetro, se impregnaron 25 μ L del extracto a evaluar diluido con metanol (MeOH), a una concentración de 10 μ g/ μ L (125 μ g/cm²) en el caso de los extractos y 5 μ g/ μ L (62.5 μ g/cm²) para el estándar comercial. Evaporado el disolvente, los discos se colocaron en las placas (Orange Scientific) y se depositaron 10 semillas por pozo (40/tratamiento) y se hidrataron con 500 μ L de agua destilada, se realizaron cuatro réplicas por muestra. Las cajas se sellaron con plástico autoadherente (Kleenpack) y se depositaron en cajas de plásticos con papel húmedo y se incubaron a 27°C por siete días (Figura 4.4). Como control positivo natural se utilizó la mezcla de los compuestos bergapteno y xantotoxina a 5 μ g/ μ L (62.5 μ g/cm²) purificados (Díaz-Braga, 2012) y como control negativo el disolvente utilizado en las diluciones. La lectura del bioensayo se realizó cada 24 h durante siete días y se registró por día el número de semillas germinadas por réplica. Una vez finalizado el bioensayo, se eligieron al azar 20 raíces por tratamiento y se fijaron en una hoja para medir la reducción del crecimiento de las raíces (séptimo día) (Burgueño-Tapia *et al.*, 2008).



Figura 4.4 Bioensayo de inocuidad de extractos etanólicos activos en semillas de *Lactuca sativa*.

4.2.5. Bioensayo de inocuidad de extractos en *Eisenia fetida* (Savigny)

La inocuidad de los EE más activos y α -asarona se evaluaron contra lombriz de tierra (*Eisenia fetida* Savigny) con el ensayo de contacto en papel filtro. Los extractos EE de corteza del tallo de *Mosannonna depressa* (MDT) y las hojas de *Piper neesianum* (PNH) se disolvieron con metanol a una concentración inicial de $5,000 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). En la superficie de papel filtro Whatman No. 1 (6.4 cm de ancho \times 7.8 cm de largo = 49.92 cm^2) se aplicó un mL de la solución a una concentración final de $100 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ y permanecieron en una campana extractora hasta sequedad total. Cuando el extracto inicial ocasionó el 100% de mortalidad de las lombrices, se realizaron las diluciones seriadas (50 , 25 , $12.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$) para determinar la concentración letal media (CL_{50}) y 90 (CL_{90}). A la par, se evaluó el estándar comercial α -asarona, a las concentraciones de $1,000$, 500 , 250 y $125 \mu\text{g}/\text{mL}$ para obtener una concentración final de 20 , 10 , 5 y $2.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. Posteriormente, cada papel filtro con la muestra impregnada se introdujo en un vial de vidrio con fondo plano (8 cm de longitud \times 3 cm de diámetro). Al control negativo se adicionó un 1 mL de metanol y al control positivo un 1 mL de Vydate® (oxamil, 24% p/v) a una concentración de $1 \mu\text{L}/\text{mL}$ ($4.7 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), y como control positivo natural se aplicó un 1 mL de la mezcla de los compuestos de bergapteno y xantotoxina (DCRM-5B) a la concentración de $1,000 \mu\text{g}/\text{mL}$ ($20 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). Paralelamente, las lombrices adultas, con un peso entre 300 - 600 mg cada una, antes lavadas en un recipiente con agua destilada, se mantuvieron en oscuridad en papel filtro húmedo, por un lapso de tres horas para asegurar el vaciado de su contenido intestinal y

estuvieran limpias. Posteriormente, a cada vial se le agregó 1 mL de agua destilada para rehidratar el papel filtro y se depositó una lombriz. Los viales se sellaron con tela tipo Magitel® y ligas para asegurar a las lombrices en el frasco y garantizar la ventilación. Por cada tratamiento se hicieron 20 réplicas (Figura 4.5). Durante la evaluación, los viales se depositaron ligeramente inclinados en cajas de plástico conteniendo agua, para garantizar la humedad de la cámara, y permanecieron a una temperatura de 27 ± 2 °C en oscuridad. Las lombrices se monitorearon cada 24 h por tres días y se consideraron muertas cuando no respondieron a pequeños estímulos en la región anterior y reporta comportamientos o síntomas patológicos (OECD, 1984).

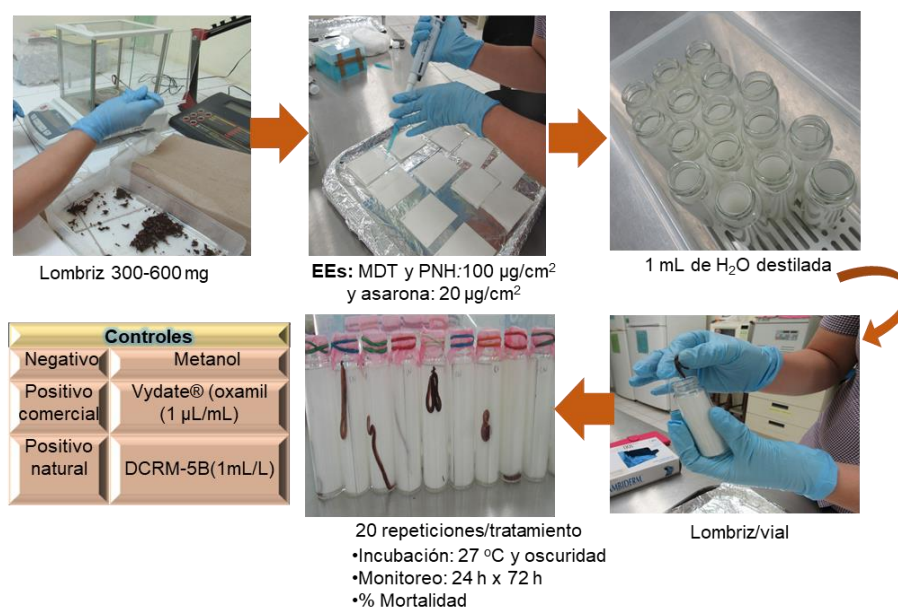


Figura 4.5. Bioensayo de inocuidad de extractos etanólicos activos en *Eisenia fetida*. **a)** pesado de lombrices, **b)** aplicación de extractos EE y α -asarona en papel filtro, **c)** aplicación de 1 mL de agua destilada, **d)** y **e)** colocación de una lombriz por vial/20 repeticiones por tratamiento.

4.3. Resultados

4.3.1. Efecto antifúngico de los extractos etanólicos con la técnica de minidisco

En el cuadro 4.1 se presentan los resultados obtenidos de los extractos etanólicos evaluados a 2,000 µg/mL contra *Corynespora cassiicola* cepa ITC7, con la técnica de minidiscos. Los resultados permitieron observar que únicamente los EEs de *M. depressa* (MDT) y *P. neesianum* (PNH), inhibieron completamente el crecimiento de este patógeno. En contraposición, los EEs de *C. jamaicensis* (CJC), *H. baruensis* (HBH), *M. depressa* (MDR), *P. neesianum* (PNR) y *P. cubana* (PCR) afectaron ligeramente el crecimiento del patógeno, considerados no activos. En cuanto a los controles, el control positivo procloraz (0.11%) inhibió al fitopatógeno, contrario a lo que sucedió con la mezcla de disolvente DMSO+Tween 20 (0.5%) y el PDA inoculado con el patógeno (Figura 4.6).

Cuadro 4.1 Efecto antifúngico de los extractos etanólicos activos contra *C. cassiicola* con la técnica de minidiscos.

Muestras	CLAVE	ICM
<i>A. amorphoides</i>	AAH	-
<i>C. jamaicensis</i>	CJC	-
<i>H. baruensis</i>	HBH	-
<i>M. depressa</i>	MDT	++
	MDR	-
<i>P. neesianum</i>	PNH	++
	PNR	-
<i>P. cubana</i>	PCR	-
CONTROLES		
Negativo	PDA inoculado con disco de micelio	-
	PDA+ DMSO+Tween 20 al (0.5%)	-
Positivo	PDA+ procloraz 0.11%	++

ICM: Inhibición de crecimiento micelial: (-) = no activo y (++) = activos.

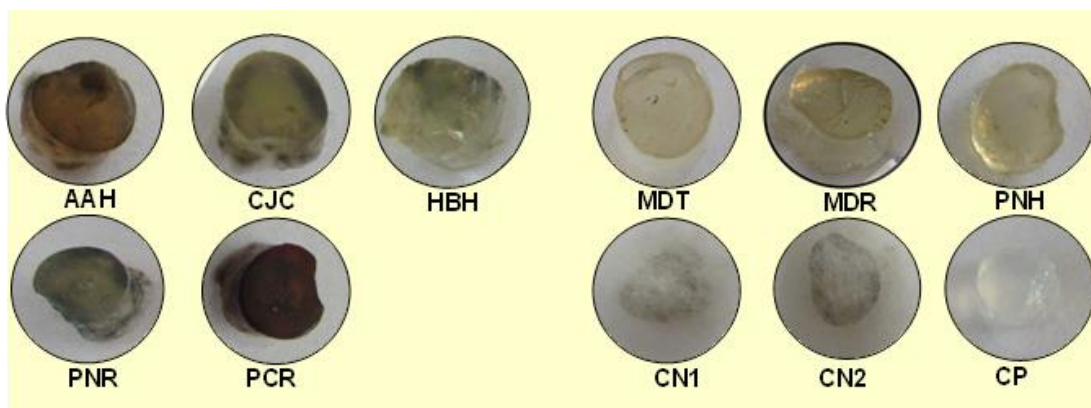


Figura 4.6. Efecto antifúngico de EEs a 2,000 µg/mL en el crecimiento micelial de *C. cassiicola* (Técnica de minidiscos). **AAH:** *A. amorphoides* (hojas), **CJC:** *C. jamaicensis* (completa), **HBH:** *H. baruensis* (hojas), **MDT:** *M. depressa* (corteza de tallo), **MDR:** *M. depressa* (corteza de raíz), **PNH:** *P. neesianum* (hojas), **PNR:** *P. neesianum* (raíz), **PCR:** *P. cubana* (raíz). **CN1:** PDA+ disco de micelio, **CN2:** DMSO+Tween 20 al 0.5% **CP:** procloraz al 0.11%.

4.3.2. Efectividad antifúngica de extractos etanólicos en el ensayo de dilución en agar

Los EEs de la corteza de tallo y la raíz de *M. depressa*, hojas de *P. neesianum* y el estándar de α -asarona se evaluaron contra *C. cassiicola* mediante el ensayo de dilución en agar, mostrando diferencias con los controles (Cuadro 4.2). El EE de *M. depressa* corteza de tallo es capaz de afectar ligeramente el crecimiento micelial de *C. cassiicola* con una ICM del 52% a la concentración de 1,000 a 250 µg/mL, después de los nueve días. Mientras que el estándar comercial α -asarona mostró mayor efectividad para inhibir el crecimiento micelial de *C. cassiicola* con un ICM del 91% a la concentración de 500 µg/mL. El control positivo Mirage® 45 CE (procloraz) mostró un 100% de efectividad (Figura 4.7).

Cuadro 4.2 Efectividad de los extractos etanólicos contra *Corynespora cassiicola* (ITC7), mediante el bioensayo de dilución en agar.

Muestras	Clave	Concentración µg/mL	ICM (%)	
<i>M. depressa</i>	MDT	1,000	52 ± 0.2 ^d	
		500	26 ± 0.2 ^g	
		250	15 ± 0.2 ⁱ	
<i>P. neesianum</i>	MDR	1,000	27 ± 0.3 ^f	
		PNH	1,000	23 ± 0.2 ^h
			α-asarona	-
α-asarona	-	500	80 ± 0.3 ^c	
		250	43 ± 0.2 ^e	
		125	100 ± 0.0 ^a	
Controles	Control positivo		0.00 ± 0.0 ^j	
	Control negativo			

MDT: (corteza de tallo); **MDR:** (corteza de raíz); **PNH:** (hojas); **control positivo:** Mirage® 45 CE (procloraz) y **control negativo:** DMSO+ disco de micelio; (±DS).
^{a,b,c} Medias con letras diferentes dentro de las columnas difieren significativamente (prueba de Tukey, $p < 0.05$).

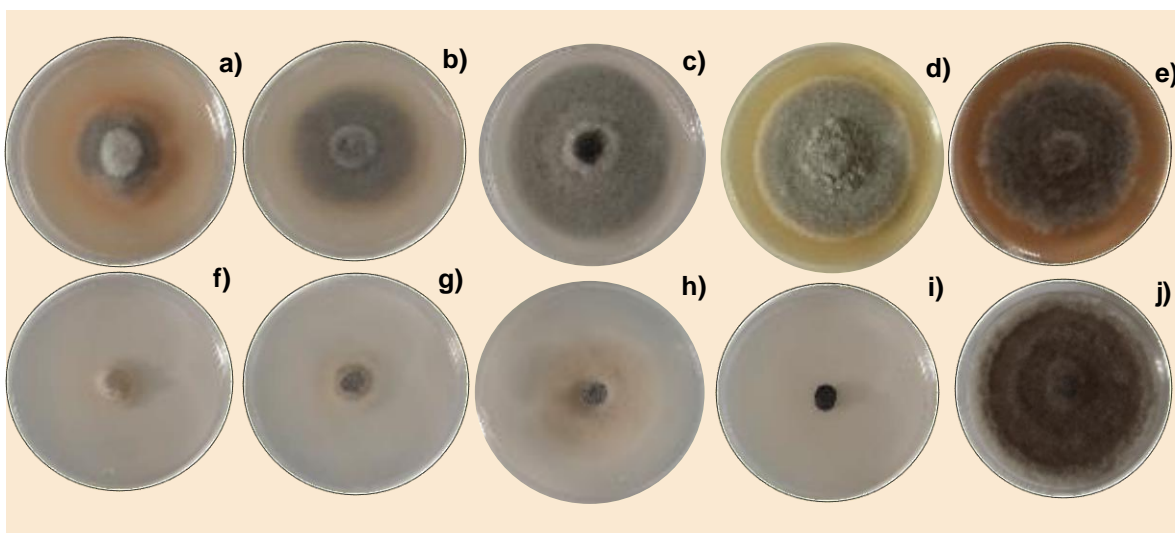


Figura 4.7. Efecto de los extractos etanólicos sobre el crecimiento micelial de *Corynespora cassiicola* ITC7. **a)** MDT (1,000 µg/mL), **b)** MDT (500 µg/mL), **c)** MDT (250 µg/mL), **d)** MDR (1,000 µg/mL), **e)** PNH (1,000 µg/mL), **f)** α-asarona (500 µg/mL), **g)** α-asarona (250 µg/mL), **h)** α-asarona (125 µg/mL), **i)** control positivo (procloraz), **j)** control negativo (DMSO+ disco de micelio).

4.3.3. Efectividad *in vitro* de extractos activos en disco de hoja de chile habanero

Los extractos EEs de *M. depressa* (MDT) y *P. neesianum* (PNH) y el estándar α-asarona se evaluaron a dos concentraciones contra *C. cassiicola* en el bioensayo de disco de hoja de chile habanero. Los datos no mostraron ningún crecimiento del micelio de *C. cassiicola* en los discos tratados con el extracto EE de *M. depressa* a 50 µg/cm² y la α-asarona a 25 µg/cm² a los siete días, presentando un efecto de control similar al del fungicida procloraz a la concentración de

0.11% (Figura 4.8). En contraste, fue evidente la presencia de micelio de *C. cassiicola*, en el resto de las muestras, α -asarona ($12.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), MDT ($25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$), y las dos concentraciones de PNH a siete días de crecimiento. En el control negativo se observó presencia de micelio. En paralelo, quedó descartada una posible toxicidad en los discos de hoja por la disolución al 1% de DMSO-Tween 20 al 0.5% utilizada para disolver los EE evaluados.

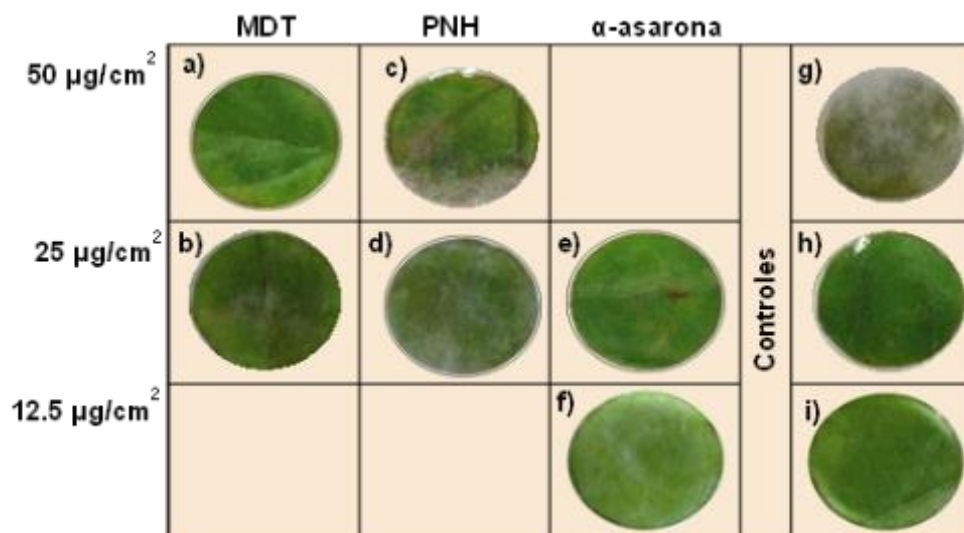


Figura 4.8. Efectividad de los EE promisorios sobre la inhibición de *Corynespora cassiicola* en el ensayo de disco foliar después de siete días de incubación. **a)** MDT: (corteza de tallo) $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, **b)** MDT: $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, **c)** PNH: (hojas) $50 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, **d)** PNH: $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, **e)** α -asarona: $25 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, **f)** α -asarona: $12.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$. **Controles:** **g)** suspensión de fragmento de micelio, **h)** disolución al 1% de DMSO-Tween 20 al 0.5%, **i)** procloraz al 0.11%.

4.3.4. Efecto de extractos activos en semillas de *Lactuca sativa*

Los extractos etanólicos MDT, MDR y PNH, estadísticamente no afectaron la germinación de las semillas de *L. sativa* con respecto al control negativo (MeOH) a los siete días de exposición, considerados inocuos a la concentración evaluada ($125 \mu\text{g}/\text{cm}^2$). La α -asarona, a la concentración del $62.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, presentó una variación mínima en el porcentaje de germinación (72.5%), con respecto al control positivo natural DCRM-5B (% germinación= 45%) en las semillas de lechuga a la concentración de $62.5 \mu\text{g}/\text{cm}^2$, a los siete días de exposición (Figura 4.9).

El crecimiento radicular de las plántulas de lechuga resultantes de la germinación, al estar en contacto con los extractos de *M. depressa* (MDT) y (MDR), al compararlos con el control negativo mostraron ser estadísticamente iguales a una concentración de $125 \mu\text{g}/\text{cm}^2$ (Figura 4.9 y 4.10).

Con respecto al EE de *P. neesianum* se observó una mínima reducción del crecimiento radicular del 13 % a una concentración de 125 µg/cm², mientras que α-asarona del 39% a 62.5 µg/cm². Estos resultados resultaron menores al presentado con el control positivo natural del 49% a la concentración de 62.5 µg/cm² (Figura 4.11).

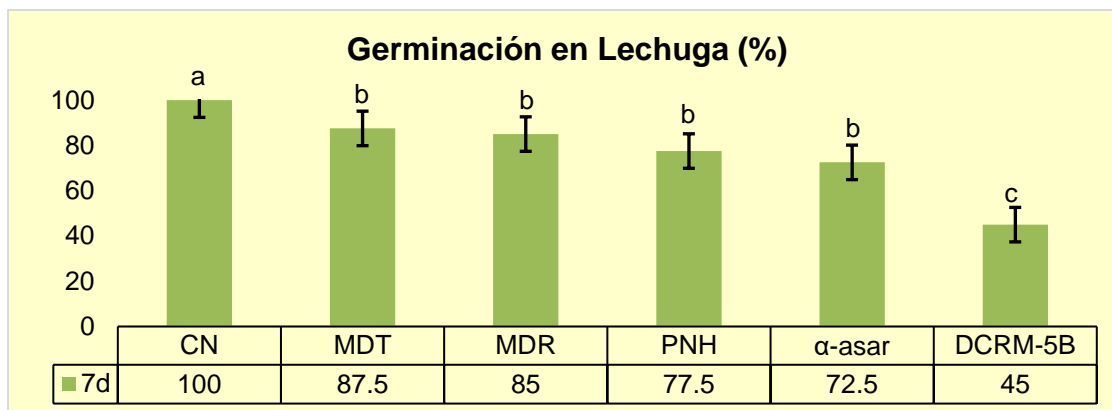


Figura 4.9. Efecto de extractos etanólicos sobre el porcentaje de germinación en lechuga a los siete días de exposición a 125 µg/cm². **CN:** MeOH; **MDT:** *M. depressa* (corteza de tallo); **MDR:** *M. depressa* (corteza de raíz); **PNH:** *P. neesianum* (hojas); **α-asar:** α-asarona y **DCRM-5B:** control positivo natural a 62.5 µg/cm². Nota: barras con la misma literal son iguales (Tukey $p=0.05$).

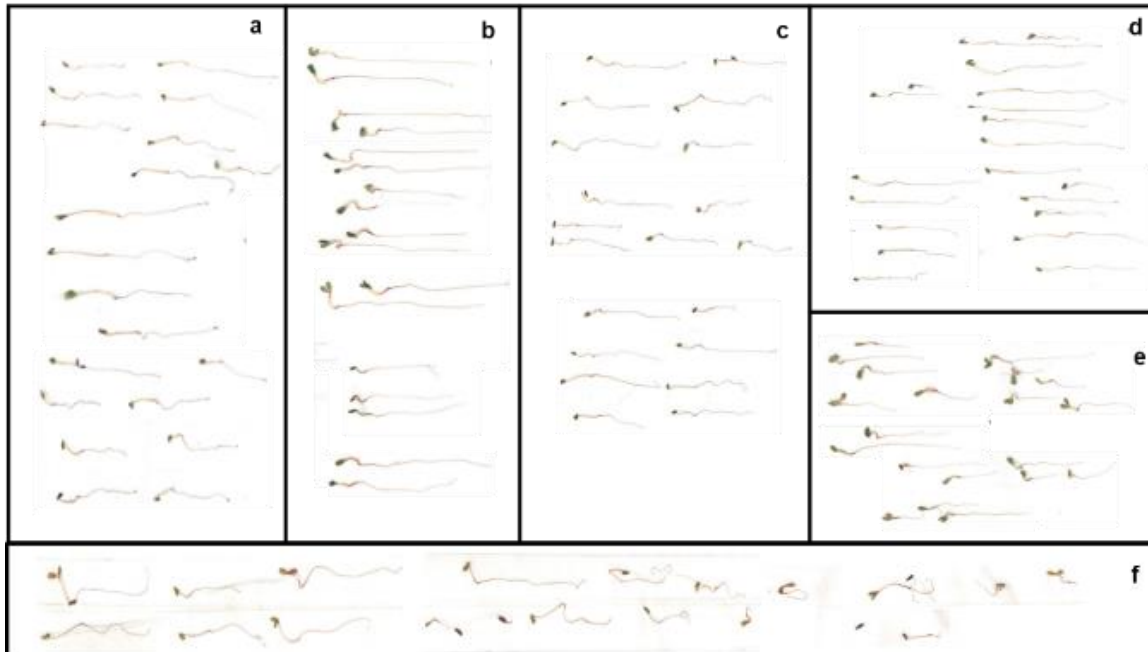


Figura 4.10. Efecto en el crecimiento radicular por la exposición de extractos etanólicos en semillas de lechuga. **a)** control negativo: MeOH; **b)** extracto MDT; **c)** MDR; **d)** PNH; **e)** α-asarona; **f)** control positivo natural: (DCRM-5B).

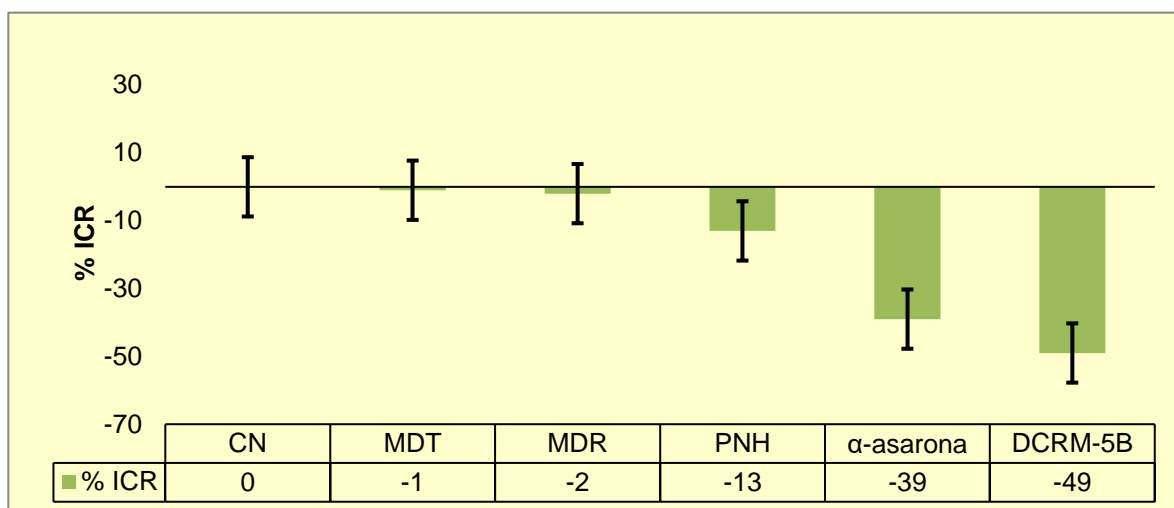


Figura 4.11. Efecto de extractos etanólicos sobre el porcentaje de crecimiento radicular en semillas de lechuga: **a)** control negativo: MeOH; **b)** extracto MDT; **c)** MDR; **d)** PNH; **e)** α-asarona; **f)** control positivo natural: DCRM-5B. %ICR: Inhibición del crecimiento radicular.

4.3.5. Efecto de inocuidad de extractos activos en *Eisenia fetida*

En el Cuadro 4.3. se reportan los resultados de la toxicidad aguda en la lombriz de tierra (*E. fetida*), con el ensayo de contacto en papel filtro, de los EEs con mejor efecto antifúngico *M. depressa* (MDT), *P. neesianum* (PNH), y el estándar comercial α-asarona a diferentes concentraciones. El extracto de la corteza del tallo de *M. depressa* a la concentración de 100 µg/cm² (5 mg/mL de aplicación) y el estándar α-asarona a la concentración de 20 µg/cm² (1 mg/mL de aplicación) ocasionaron el 100% de mortalidad, a las 72 h de exposición en *Eisenia fetida*, siendo estadísticamente iguales al control positivo natural y al comercial. Observándose laceraciones en la superficie del cuerpo de las lombrices, ocasionadas por la exposición de MDT y α-asarona, mismas que se pudieron observar en las lombrices expuestas a los controles positivos. Por lo tanto, estas dos muestras se evaluaron en una dilución seriada y se determinó que el extracto de MDT presentó una CL₅₀ y CL₉₀ de 28.3 y 45.2 µg/cm², respectivamente, 6.5 y 11.0 µg/cm² para la α-asarona, respectivamente, contra *E. fetida* a las 72 h de exposición (Cuadro 4.12). Estos resultados indican que ambos productos son tóxicos al organismo benéfico *E. fetida*. También se observaron laceraciones en la superficie del cuerpo de las lombrices, ocasionadas por la exposición de MDT y α-asarona, mismas que se pudieron observar en las lombrices expuestas a los controles positivos.

El EE de las hojas de *P. neesianum* (PNH) causó el 65% de mortalidad en las lombrices a las 72 h de ser expuestas al mismo, éste es significativamente diferente al controles negativo y positivo. Sin embargo, no se observó laceración alguna en el cuerpo de las lombrices sobrevivientes (35%) a la exposición del mismo. El EE de PNH a las concentraciones de 50 µg/cm², no mostró diferencias significativas con respecto al control negativo (M= 0%).

Cuadro 4.3. Inocuidad de los extractos etanólicos a diferentes concentraciones contra *Eisenia fetida* y concentración letal (CL₅₀ y CL₉₀) de *M. depressa* y el estándar α-asarona en *Eisenia fetida* a las 72 h.

Especies (órgano)	µg/cm ²	% Mortalidad/h			µg/cm ²	
		24	48	72	CL ₅₀ (IC)	CL ₉₀ (IC)
<i>Mosannonna depressa</i> (Corteza de tallo)	100	90 ^a	100 ^a	100 ^a		
	50	10 ^e	20 ^e	50 ^d		
	25	0 ^f	10 ^f	20 ^f		
	12.5	0 ^f	0 ^g	0 ⁱ	28.3 (23.0-34.7)	45.2 (37.9-60.3)
<i>Piper neesianum</i> (Hoja)	100	0 ^f	0 ^g	65 ^c		
	50	0 ^f	0 ^g	0 ⁱ		
	25	0 ^f	0 ^g	0 ⁱ		
	12.5	0 ^f	0 ^g	0 ⁱ		
α-asarona	20	35 ^c	95 ^b	100 ^a		
	10	25 ^d	65 ^d	80 ^b		
	5	0 ^f	0 ^g	45 ^e		
	2.5	0 ^f	0 ^g	5 ^h	6.5 (5.2-8.1)	11.0 (9.1-15.2)
Control positivo natural	1,000	79 ^b	90 ^c	100 ^a		
Control positivo comercial	20	25 ^d	65 ^d	100 ^a		
Control negativo (MeOH)	-	0 ^f	0 ^g	10 ^g		

IC: Intervalos de confianza; control positivo natural (DCRM-5B); control positivo comercial Vydate® (oxamil). ^{a,b,c}:Medias con letras diferentes dentro de las columnas difieren significativamente (prueba de Tukey, *p* <0.05).

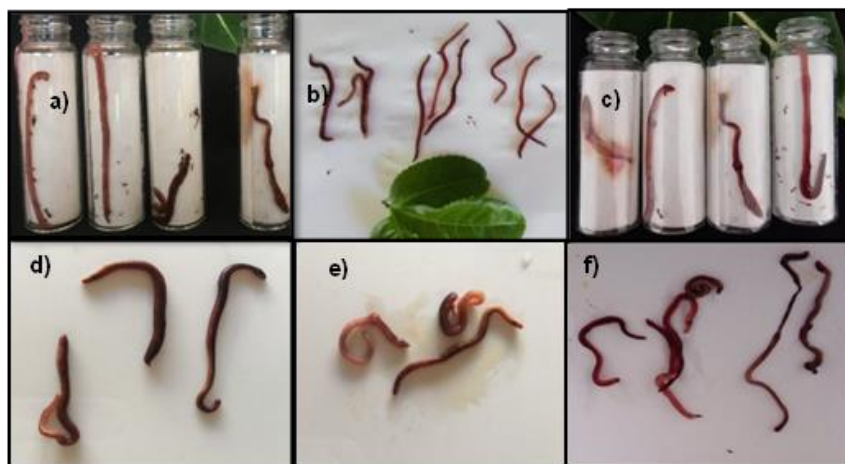


Figura 4.12. Bioensayo de inocuidad de extractos etanólicos contra *Eisenia fetida*: **a)** MDT; **b)** PNH, **c)** α-asarona, **d)** control negativo: MeOH; **e)** control positivo comercial: Vydate® (oxamil) y **f)** control positivo natural: DCRM-5B.

4.4. DISCUSIÓN

Continuando con la bioprospección antifúngica de los extractos orgánicos de las especies nativas de la península de Yucatán, se seleccionaron las especies más efectivas en estudios anteriores, confirmando que las especies *M. depressa* (corteza) y *P. neesianum* (hojas) correspondieron a los extractos activos contra la cepa *C. cassiicola* ITC7, patógeno foliar de chile habanero. El presente estudio es el primer reporte de ambas especies con efecto antifúngico contra *C. cassiicola*. Colateralmente, el espectro de acción de *M. depressa* se enriquece, ya que ha sido reportado que inhibe el crecimiento micelial de las cepas *C. lunata* (ITC26), *F. equiseti* (FCHE) y *F. oxysporum* (FCHJ) aislados de plántulas de chile habanero con CI_{50} en el rango de 188, 468, 944 $\mu\text{g/mL}$ y contra el dermatofito *Trichophyton mentagrophytes*, con una CMI de 300 $\mu\text{g/mL}$ (Cruz-Cerino *et al.*, 2020; Jimenez-Arellanes *et al.*, 1996). Esta misma cepa fue sensible al extracto acuoso de *Bonellia flammea* al 3% (p/v) ocasionando una inhibición del 50% contra *C. cassiicola* ITC7 (Moo-Koh *et al.*, 2014), es menor al reportado en el presente estudio en el ensayo de dilución en agar. Por otra parte, el EE de las raíces de *Acalypha gaumeri* el cual mostró una CI_{50} de 0.33 mg/mL contra la cepa *C. cassiicola* (ITC03), aislada de *Capsicum annum* L. (Vargas-Díaz *et al.*, 2014).

En la literatura, existen escasos reportes que involucren el uso de extractos de plantas para controlar a *C. cassiicola in vitro*, en invernadero y en campo (Lima, 2012). En el presente estudio, se reporta por primera vez el efecto del EE de la corteza de *M. depressa* y el compuesto α -asarona para controlar la infección causada por *C. cassiicola* en hojas de chile habanero. Los resultados mostraron una inhibición completa del crecimiento micelial de *C. cassiicola* con el EE de MDT a 50 $\mu\text{g/cm}^2$ y α -asarona a 25 $\mu\text{g/cm}^2$. Con concentraciones menores los extractos permitieron el crecimiento del micelio en el borde del disco de hoja. Por otra parte, la α -asarona, el principio antifúngico de la corteza del tallo de *M. depressa* (Cruz-Cerino *et al.*, 2020) mostró alta efectividad contra *C. cassiicola in vitro* en el ensayo de dilución en agar y en el ensayo de disco foliar. Con esto se confirmó que α -asarona es uno de los principios antifúngicos de *M. depressa* contra *C. cassiicola*.

Con respecto al extracto etanólico de las hojas de *P. neesianum*, se reporta su acción antifúngica por primera vez contra la cepa *C. cassiicola*, ampliando su espectro de acción además de *F. equiseti* y *C. lunata* (Cruz-Cerino *et al.*, 2020). Sin embargo, su efecto fue menor en el ensayo de disco foliar de chile habanero, a las dos concentraciones evaluadas. Del género *Piper*,

únicamente el EE de las hojas *Piper aduncum* se ha reportado con efecto mortal contra *C. cassiicola* a la concentración de 2,000 µg/mL (Lima, 2012).

Las pruebas de inocuidad a los productos de fuentes naturales son prerrequisito para llegar a su comercialización y aplicación en campos agrícolas. Ante la efectividad contra hongos fitopatógenos de los extractos EEs de *M. depressa*, *P. neesianum* y α -asarona, se determinó su inocuidad hacia la germinación y crecimiento de la raíz de semillas de *Lactuca sativa* y en el organismo benéfico *Eisenia fetida*. Los resultados indicaron que el extracto etanólico de la corteza del tallo de *M. depressa* y las hojas de *P. neesianum* no afectan la germinación de las semillas de *L. sativa*, ni el crecimiento de la raíz, pero la α -asarona, presenta cierta toxicidad en el crecimiento de la raíz. En particular se ha reportado que EEs vegetales han resultado ser fitotóxicos en cultivos de interés agrícola, inhibiendo la germinación de *L. sativa*. Por ejemplo, los EEs de la hoja de *Byrsonima intermedia* y *Melia azedarach* al 5% inhiben su germinación en un 40 y 100%, respectivamente (Amâncio *et al.*, 2021; Lungu *et al.*, 2011). Este último extracto EE al 5 y 2.5% y un extracto acuoso de *Piper umbellatum* (hojas) al 5, 7.5 y 10% redujeron al 100% el crecimiento radicular de semillas lechuga (Ramos, 2017; Lungu *et al.*, 2011).

Por otra parte, es importante evaluar una serie de variedades de semillas para conocer la sensibilidad de los extractos EE y compuestos puros, así como determinar las dosis efectivas del extracto etanólico de *P. neesianum* (hoja) y α -asarona que presentaron cierta capacidad de alelopatía hacia la reducción del crecimiento radicular.

En cuanto a la inocuidad en *Eisenia fetida*, el EE de *M. depressa* induce una LC_{50} que equivale a una exposición a 1400 µg/mL en 50 cm² durante 72 h del EE, siendo menos tóxico que la α -asarona a la concentración de 325 µg/mL. Esto quiere decir, que ambos, se consideran inocuos, al aplicarlos por debajo de este umbral contra algún hongo fitopatógeno a controlar. Para inhibir al 50% de la población de los patógenos evaluados *C. lunata*, *F. equiseti* y *F. oxysporum* se requieren de 188, 468 y 944 µg/mL de la corteza de *M. depressa*. En cuanto, al compuesto α -asarona se considera ligeramente tóxico para la lombriz, para controlar patógenos de suelo, como es el caso de la cepa evaluada *F. oxysporum*, se requiere de una concentración de 482 µg/mL, no así para controlar los patógenos *C. lunata* y *F. equiseti* 190 y 236 µg/mL, respectivamente. Este comportamiento ha sido reportado previamente (Natalli *et al.*, 2020), por lo cual la opción de utilizar extractos en lugar de los compuestos puros es viable por diferentes aspectos, tales como el costo, toxicidad y los efectos sinérgica que pudieran darse entre los componentes.

Aunque la especie *M. depressa* es la que ha presentado mayor efectividad como antifúngico con su extracto etanólico, se ha reportado sin efecto en las especies de *Bemisia tabaci* en ensayos de repelencia (Esquivel-Chi, 2021), ni en el nemátodo agallador *M. incognita* y *M. javanica* (Aviles-Gomez, 2020), demostrando que no es un biocida.

En el caso del EE de las hojas de *P. neesianum*, la toxicidad en *E. fetida* se consideró baja a la concentración de 50 µg/cm² comparada con la inocuidad mostrada por el aceite esencial de *Piper betle* a 1,000 µg/cm² con un 5.4% de mortalidad a las 48 h de exposición en el ensayo de contacto en papel filtro (Vasanth-Srinivasan *et al.*, 2018). A la fecha muy pocos extractos vegetales han sido evaluados contra organismos benéficos, enfocándose más a la disponibilidad del material y su efectividad en los organismos blanco (Pino-Otín *et al.*, 2019).

Ponte *et al.* (1992) han documentado que los extractos de origen vegetal luego de ser aplicados tienen la facilidad de descomponerse por diversos factores como la luz y temperatura, lo cual pudo haber ocurrido en los extractos evaluados. Sin embargo, el que un extracto EE sea inocuo a los organismos benéficos es un indicador de una excelente oportunidad para que las especies *M. depressa* y *P. neesianum* continúen en evaluación, contra otros blancos debido a que podrían ser un nuevo producto biorracional que proporcione una alternativa ecológica para controlar enfermedades causadas por hongos fitopatógenos en el cultivo de chile habanero, para lograrlo es primordial evaluar a diferentes dosis el efecto antifúngico y en campo, además de corroborar su toxicidad en más organismos blanco.

5. CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y PERSPECTIVAS

5.1 CONCLUSIONES GENERALES

Se confirma la hipótesis de que algunas especies de plantas nativas de la península de Yucatán tienen alto potencial para inhibir a los fitopatógenos asociados al chile habanero.

Los extractos etanólicos demostraron mayor capacidad antifúngica que los extractos acuosos para controlar hongos fitopatógenos, indicando que hay componentes de menor polaridad como principios activos.

Los extractos etanólicos de la corteza del tallo de *M. depressa* y las hojas de *P. neesianum* en las evaluaciones antifúngicas correspondieron a las más promisorias para el control de hongos fitopatógenos, los cuales demostraron en los bioensayos tener mayor actividad antifúngica.

La α -asarona es un fenilpropanoide y corresponde al principio antifúngico mayoritario de la corteza de *M. depressa* y uno de los metabolitos responsables de la actividad antifúngica contra los fitopatógenos evaluados *C. cassicola*, *C. lunata* y *F. equiseti*.

Mosannonna depressa y *Piper neesianum* se adicionan a las alternativas para controlar al patógeno *C. lunata* causante de enfermedades postcosecha en frutos de *Capsicum chinense* ya que en los bioensayos *in vitro* mostraron poseer mayor actividad que los demás extractos.

El extracto de la corteza de *M. depressa* es un candidato para ser evaluado en invernadero en el control de *C. cassicola* en plantas de chile habanero.

El extracto de la corteza de *M. depressa* y la α -asarona, son inocuos a la germinación y crecimiento radicular de *L. sativa* al mostrar bajos efectos en los bioensayos *in vitro*.

La α -asarona es ligeramente tóxica para *Eisenia fetida*, por lo que debe considerarse su aplicación contra patógenos de suelo.

5.2 PERSPECTIVAS

Continuar con las evaluaciones de inocuidad del extracto EE de *M. depressa* y α -asarona. A pesar de que esta última puede ser ligeramente tóxica al modelo de inocuidad es recomendable realizarle pruebas a nivel invernadero y campo para tener un panorama más amplio de los efectos del mismo, así como variar las concentraciones a utilizar y evaluarlos con otros modelos blanco para observar la especificidad de los mismos.

Los extractos EE de *M. depressa* y *P. neesianum* deben evaluarse a otras concentraciones en frutos poscosecha.

Determinar el mecanismo de acción de α -asarona en los fitopatógenos estudiados.

Colectar las especies que resultaron efectivas en sitios más cercanos y corroborar si mantienen la actividad antifúngica o producen diferentes compuestos antifúngicos.

Continuar con los estudios de los extractos considerados inocuos en la presente investigación, para su desarrollo como fungicida natural alternativo.

Aislar los compuestos que les confieren actividad al EE de las hojas de *P. neesianum* y evaluarlos en pruebas de inocuidad en el presente trabajo.

El análisis cromatográfico del EE de *P. cubana* debe realizarse para conocer su perfil químico. Paralelamente, debe realizarse la purificación para determinar cuáles son los metabolitos responsables de la actividad antifúngica en *P. cubana* sobre los patógenos del género *Fusarium*, evaluados en el presente estudio.

Investigar y explorar la propagación de las especies de *M. depressa* y *P. neesianum*.

REFERENCIAS

- Abou-Jawdah, Y., Sobh, H., Salameh, A. (2002). Antimycotic activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50, 3208-3213. Doi:10.1021/jf0115490.
- Abdel Ghany, T.M., Shater, A.R.M., Negm, M.E., Al Abboud, M.A., Elhussieny, N.I. (2015). Efficacy of botanical fungicides against *Curvularia lunata* at molecular levels. *Journal of Plant Pathology and Microbiology*, 6, 2. Doi: 10.4172/2157-7471.1000289.
- Aceves, N.L., Juárez, J.L., Palma, D.L., López, L.R., Rivera, B.H., Rincón, J.R., Martínez, A.S. (2008). Estudio para determinar zonas de alta potencialidad del cultivo del chile habanero (*Capsicum chinese* Jacq.) en el estado de Tabasco. Gobierno de Tabasco, Secretaria de Desarrollo Forestal y Pesca, DEIDRUS-TAB, INIFAP, SAGARPA y Colegio de Postgraduados. Villahermosa, Tabasco, México.
- Achicanoy, H. (1981). Evaluación *in vitro* de fungicidas para el control de *Crinipellis pernicios* (Stehel) Singer y *Moniliphthora roreri* (Cif & Par) Tesis Magister. Facultad de Ciencias agrarias. Universidad Nacional de Colombia- ICA. pp. 51.
- Akinbode, O.A. (2010). Evaluation of antifungal efficacy of some plant extracts on *Curvularia lunata*, the causal organism of maize leaf spot. *African Journal of Environmental Science and Technology*, 4, 797-800. ISSN: 1996-0786.
- Akonda, M.M.R., Yasmin, M., Hossain, I. (2015). Study on etiology, incidence and severity of Southern corn leaf blight, *Curvularia* leaf spot, sheath blight and damping off of maize. *International Journal of Biosciences*, 7, 111-117. Doi:10.12692/ijb/7.6.111-117.
- Álvarez-Reyes, A., González-Lavaut, J.A., Urquiola-Cruz, A. (2008). Evaluación fitoquímica de *Erythroxyllum confusum* Britt. (Erythorxylacea) al variar el método de secado de las hojas. Revista CENIC. *Ciencias Químicas*, 39, 135-137. ISSN: 1015-8553.
- Almeda, F., Astorga, L., Orellana, A., Sampuel, L., Sierra, P., Gaitán, I., Cáceres, A. (2015). *Piper* genus: Source of natural products with anti-tyrosinase activity favored in phytocosmetics. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 2, 6-6. Doi:10.15171/ijpni.2015.06.

- Amini, J., Sidovich, D. (2010). The effects of fungicides on *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* associated with *Fusarium* wilt of tomato. *Journal of Plant Protection Research*, 50, 172-178. Doi:10.2478/v10045-010-0029-x.
- Amâncio, B.C.S., Govêa, K P., Neto, A.R.C., de Oliveira Ribeiro Trindade, L., de Souza, T.C., da Silva, G.A., Barbosa, S. (2021). Allelopathic activity of different *Byrsonima* spp. leaf extracts on *Lactuca sativa* L. bioassay. *Biologia*. 76, 3201-3209. Doi: 10.1007/s11756-021-00872-0.
- Ankli, A., Heinrich, M., Bork, P., Wolfram, L., Bauerfeind, P., Brun, R., Wasescha, M. (2002). Yucatec Mayan medicinal plants: evaluation based on indigenous uses. *Journal of Ethnopharmacology*, 79, 43-52. Doi: 10.1016/S0378-8741(01)00355-5.
- Andrade-Cetto, A. (2011a). Ethnopharmacological studies of two Mayan medicinal plants used in the treatment of type 2 diabetes. In International Symposium on Medicinal and Aromatic Plants IMAPS2010 and History of Mayan Ethnopharmacology IMAPS2011 964. pp. 229-234. Doi:10.17660/ActaHortic.2012.964.28.
- Andrade-Cetto, A., Martínez-Zurita, E., Soto-Constantino, A., Revilla-Monsalve, M.C., Wiedenfeld, H. (2008b). Chronic hypoglycemic effect of *Malmea depressa* root on n5-streptozotocin diabetic rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 116, 358-362. Doi: 10.1016/j.jep.2007.11.043.
- Andrade-Cetto, A., Heinrich, M (2005c). Mexican plants with hypoglycaemic effect used in the treatment of diabetes. *Journal of Ethnopharmacology*, 99, 325-348. Doi: 10.1016/j.jep.2005.04.019.
- Avilez-Gomez (2020). Evaluación *in vitro* de extractos acuosos de plantas nativas de la península de Yucatán contra *Meloidogyne incognita* y *M. javanica*. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán, Mérida, Yucatán. México. pp. 78.
- Barupal, T., Sharma, K. (2017). Effect of leaf extracts of *Lawsonia inermis* Linn. On *Curvularia lunata*, caused leaf spot disease of maize. *International Journal of Innovative Research and Advanced Studies*, 4, 64-67. ISSN: 2394-4404.
- Bashir, M.R., Atiq, M., Sajid, M., Mohsan, M., Abbas, W., Alam, M.W., Bashair, M. (2018). Antifungal exploitation of fungicides against *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* causing

- Fusarium wilt of chilli pepper in Pakistan. *Environmental Science and Pollution Research*, 25 , 6797-6801. Doi:10.1007/s11356-017-1032-9.
- Baños, S.B., Necha, L.L.B., Luna, L.B., Torres, K.B. (2002). Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruit after storage. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 20, 8-12. ISSN: 0185-3309.
- Balu, K.E., Ramya, K.S., Radha, A., Krishnasamy, G. (2020). Structure of intact chitinase with hevein domain from the plant *Simarouba glauca*, known for its traditional anti-inflammatory efficacy. *International Journal of Biological Macromolecules*, 161, 1381-1392. Doi:10.1016/j.ijbiomac.2020.07.284.
- Balick, M.J., Arvigo, R. (2015). Message from the Gods. A Guide to the Useful Plants of Belize. Oxford University Press, Oxford. ISBN:978-0-19-996576-2.
- Balouiri, M., Sadiki, M., Ibnsouda, S.K. (2016). Methods for *in vitro* evaluating antimicrobial activity: A revises. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 6 , 71-79. Doi: 10.1016/j.jpha.2015.11.005
- Belson, N. (2000). US regulation of agricultural biotechnology: an overview. *AgBioForum*, 3 , 268-280.
- Begum, J., Yusuf, M., Chowdhury, J. U., Khan, S., Anwar, M.N. (2007). Antifungal activity of forty higher plants against phytopathogenic fungi. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 24 , 76-78. Doi: 10.3329/bjm.v24i1.1245.
- Begum, J., Sohrab, H., Yusuf, M.D., Chowdury, J.U. (2004). *In vitro* antifungal activity of azaron isolated from the rhizome extract of *Acorus calamus* L. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 7 , 1376-1379. ISSN:1028-8880.
- Belwal, T., Devkota, H.P., Hassan, H.A., Ahluwalia, S., Ramadan, M.F., Mocan, A., Atanasov, A.G. (2018). Phytopharmacology of Acerola (*Malpighia* spp.) and its potential as functional food. *Trends in Food Science and Technology*. 74, 99-106. Doi: 10.1016/j.tifs.2018.01.014.

- Bisht, S., Balodi, R., Ghatak, A., Kumar, P. (2018). Determination of susceptible growth stage and efficacy of fungicidal management of *Curvularia* leaf spot of maize caused by *Curvularia lunata* (Wakker) Boedijn. *Maydica*, 61 , 5. ISSN: 2279-8013.
- Bisht, S.U.N.A.I.N.A., Kumar, P., Srinivasanraghvan, A., Purohit, J.Y.O.T.I.K.A. (2013). *In vitro* management of *Curvularia* leaf spot of maize using botanicals, essential oils and bio-control agents. *Bioscan*, 8, 731-733.
- Borges-Gómez, L., Cervantes, C.L., Ruiz, N.J., Soria, F.M., Reyes, O.V. Villanueva, C. E. (2010a). Capsaicinoides en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) bajo diferentes condiciones de humedad y nutrición. México. *Terra Latinoamericana*. 28, 35-41. ISSN: 2395-8030.
- Borges-Gómez, L., Moo-Kauil, C., Ruíz-Novelo, J., Osalde-Balam, M., González-Valencia, C., Yam-Chimal, C., Can-Puc, F. (2014b). Suelos destinados a la producción de chile habanero en Yucatán: características físicas y químicas predominantes. *Agrociencia*, 48, 347-359. ISSN 1405-3195.
- Bosland, P.W., Votava, E.J. (2012). Peppers: Vegetable and Spice *Capsicums*, 2nd ed., CABI: Wallingford, Oxfordshire, UK. (22), 16–36. ISBN 9781845938253.
- Boehlendorf, B., Neff S., Shuez T.C., Molleyres, L.P., Winkler, T., Dobler M, Huang, Y. (2004). Patent GB 2396349. Compounds obtained from a fungal microorganism and derivatives thereof. pp. 44.
- Burgueño-Tapia, E., Castillo, L., González-Coloma, A., Joseph-Nathan, P. (2008). Antifeedant and phytotoxic activity of the sesquiterpene p-benzoquinone perezone and some of its derivatives. *Journal of Chemical Ecology*, 34, 766-771. Doi: 10.1007/s10886-008-9495-2.
- Butler, S., Young-Kelly, H., Raper, T., Cochran, A., Jordan, J., Shrestha, S., Shelby, P. (2016). First report of target spot caused by *Corynespora cassiicola* on Cotton in Tennessee. *Plant Disease*, 100, 535-535. Doi:10.1094/PDIS-07-15-0785-PDN.
- Castillo, M. (2004). Ensayos Toxicológicos y Métodos de Evaluación de calidad de aguas. *Centro Internacional de Investigaciones para el Desarrollo*. México. pp.189. ISBN 968-5536-33-3.

- Carballo-Bautista, M.A., Moguel-Salazar, F., Brito-Argáez, L., Cristóbal-Alejo, J., Islas-Flores, I. (2010). A brief morphological description of a small internal fruit grown in habanero pepper (*Capsicum chinense* Jacq.) main fruit. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 33, 281-285. ISSN 0187-7380.
- Cabrera, M.G., Cúndom, M.A., Gutiérrez, S.A., Álvarez, R.E. (2006). Situación de la mancha anillada (*Corynespora cassiicola*) de la soja en provincias del NE de Argentina. Comunicaciones Científicas y Tecnológicas, Resumen A-022, Facultad de Ciencias Agrarias, Universidad Nacional del Nordeste, Argentina.
- Cáceres-Rueda de León, I., Colorado-Vargas, R., Salas-Muñoz, E., Muñoz Castellanos, L.N., Hernández-Ochoa, L. (2013). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos acuosos de especias contra *Fusarium oxysporum*, *Alternaria alternata*, *Geotrichum candidum*, *Trichoderma* spp., *Penicillium digitatum* y *Aspergillus niger*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31, 105-112. ISSN 0185-3309.
- Carvalho, F.P. (2017). Pesticides, environment, and food safety. *Food and Energy Security*. 6, 48-60. Doi:10.1002/fes3.108.
- Cáceres, A., Cruz, S.M., Gaitán, I., Guerrero, K., Álvarez, L.E., Marroquín, M.N. (2012), Antioxidant activity and quantitative composition of extracts of *Piper* species from Guatemala with potential use in natural product industry. *Acta Horticulturae*, 964, 77–84. Doi:10.17660/ActaHortic.2012.964.9.
- Cáceres, A., Almeda, F., Astorga, L.M., Orellana, A.C., Sampuel, L.I., Sierra, P., Zelada, V.F. (2018). Anti-urease activity of native species of genus *Piper* from Guatemala with potential application in infection control. *International Journal of Phytocosmetics and Natural Ingredients*, 5, 2-2. Doi:10.15171/ijpni.2018.02.
- Castillo-Avila, G.M., García-Sosa, K., Peña-Rodríguez, L.M. (2009). Antioxidants from the leaf extract of *Byrsonima bucidaefolia*. *Natural product communications*, 4, 84-86. Doi: 10.1177/1934578X0900400118.
- Calderón, Á.I., Romero, L.I., Ortega-Barría, E., Solís, P.N., Zacchino, S., Giménez, A., Pinzón, R., Cáceres, A., Tamayo, G., Guerra, C., Espinosa, A., Correa, M., Mahabir, P.G. (2010). Screening of Latin American plants for antiparasitic activities against malaria,

- Chagas disease, and leishmaniasis. *Pharmaceutical Biology*, 48 , 545-553. Doi: 10.3109/13880200903193344.
- Chávez, D., Cui, B., Chai, H.B., García, R., Mejía, M., Farnsworth, N.R., Kinghorn, A.D. (2002). Reversal of Multidrug Resistance by Tropane Alkaloids from the Stems of *Erythroxylum rotundifolium*. *Journal of Natural Products*, 65 , 606-610. Doi:10.1021/np0104774.
- Chimbekujwo, I.B (2000). Frequency and pathogenicity of *Fusarium* wilts (*Fusarium solani* and *Fusarium equiseti*) of cotton (*Gossypium hirsutum*) in Adamawa in Nigeria. *Revista de Biología Tropical*, 48, 1-5. ISSN 0034-7744.
- Chen, Y., Li, J., Li, S.X., Zhao, J., Bernier, U.R., Becnel, J.J., Agramonte, N.M., Duke, S.O., Cantrell, C.L., Wedge, D.E. (2016). Identification and Characterization of Biopesticides from *Acorus tatarinowii* and *A. calamus*. In Medicinal and Aromatic Crops: Production, Phytochemistry, and Utilization. American Chemical Society, pp. 121-143. ISBN: 9780841231269.
- Chel-Guerrero, L.D., Sauri-Duch, E., Fragoso-Serrano, M.C., Pérez-Flores, L.J., Gómez-Olivares, J.L., Salinas-Arreortua, N., Sierra-Palacio, E.C., Mendoza-Espinoza, J.A. (2018). Phytochemical Profile, Toxicity, and Pharmacological Potential of Peels from Four Species of Tropical Fruits. *Journal of Medicinal Food*. 21, 734-743. Doi:10.1089/jmf.2017.0124.
- Chamorro, G., Salazar, M., Salazar, S., Mendoza, T. (1993). Pharmacology and toxicology of *Gutteria gaumeri* and alpha-asarone. *Revista de Investigación Clínica; organo del Hospital de Enfermedades de la Nutrición*, 45 , 597-604. PMID: 815988.
- Chiles y Pimientos. Available online: https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/255626/Planeacion_Agricola_Nacional_2017-2030_-_parte_tres [Acceso 14 September 2020].
- Chistokhodova, N., Nguyen, C., Calvino, T., Kachirskaia, I., Cunningham, G., Miles, D.H (2002). Antithrombin activity of medicinal plants from central Florida. *Journal of Ethnopharmacology*, 81 , 277-280. Doi:10.1016/S0378-8741(02)00097-1.

- Choudhury, D., Dobhal, P., Srivastava, S., Saha, S., Kundu, S. (2018). Role of botanical plant extracts to control plant pathogens. A review. *Indian Journal of Agricultural Research*, 52 , 341-6. Doi:10.18805/IJARE.A-5005.
- Covarrubias, D.A.V., Belmont, R.M., Pérez, A.J., Moctezuma, H.E.F. (2013). Aceites esenciales y extractos acuosos para el manejo *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *F. solani*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 31 , 170-179. ISSN 2007-8080.
- Cristóbal-Alejo, J., Meléndez, E.Z., Tun-Suárez, J.M., Moreno, L.L., Sánchez, E.R. (2006). Control químico y epidemiología de la mancha foliar del chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en Yucatán, México. *Fitosanidad*, 10 , 217-220. ISSN: 1562-3009.
- Cristóbal-Alejo, J., Navarrete-Mapen, Z., Herrera-Parra, E., Mis-Mut, M., Tun-Suárez, J.M., Ruiz-Sánchez, E. (2013). Hifomicetos asociados a plantas tropicales del estado de Yucatán, México: Identificación genérica y evaluación de fungicidas para su control. *Revista de Protección Vegetal*, 28 , 138-144. ISSN 1010-2752.
- Cruz-Cerino, P., Cristóbal-Alejo, J., Ruiz-Carrera, V., Carnevali, G., Vera-Ku, M., Martín, J., Reyes, F., Gamboa-Angulo, M. (2020). Extracts from Six Native Plants of the Yucatán Peninsula Hinder Mycelial Growth of *Fusarium equiseti* and *F. oxysporum*, Pathogens of *Capsicum chinense*. *Pathogens*, 9 , 827. Doi: 10.3390/pathogens9100827.
- Cruz-Estrada, A., Ruiz-Sánchez, E., Baizabal, I.M., Balam-Uc, E., Gamboa-Angulo, M. (2019). Effect of *Eugenia winzerlingii* extracts on *Bemisia tabaci* and evaluation of its nursery propagation. *Phyton*, 88 , 161-170. Doi:10.32604/phyton.2019.05809.
- Cruz, S., Samayoa, M., Cáceres, A., Gaitán, I., Molina, R., Álvarez, L. (2005). Caracterización de aceites esenciales y evaluación de la actividad biocida de cinco especies nativas de Piperaceae. *Tikalía*, 23, 51-67.
- Cruz, S., Cáceres, A., Álvarez, L., Apel, M., Henríquez, A. (2012). Chemical diversity of essential oils from 15 Piper species from Guatemala. *Acta Horticulturae*, 964, 39-46. Doi: 10.17660/ActaHortic.2012.964.4.
- CLSI, Clinical and Laboratory Standards Institute. (2002). Reference method for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard M38-A. National Committee for Clinical Laboratory Standards, Wayne, PA.

- D'Armas, H., Vásquez, V., Ordaz, G. (2018). Phytochemical screening and bioactivity analysis of extracts from *Helicteres guazumifolia* Kunth (Sterculiaceae). *International Journal of Herbal Medicine*, 6 , 47-50. ISSN: 2321-2187.
- Da Silva Nunes, R., Silva Kahl, V.F., Da Silva Sarmiento, M., Richter, M.F., Abin-Carriquiry, J.A., Martinez, M.M., De Barros Falcão Ferraz, A., Da Silva, J. (2013). Genotoxic and antigenotoxic activity of acerola (*Malpighia glabra* L.) extract in relation to the geographic origin. *Phytotherapy Research*, 27, 1495-1501. Doi: 10.1002/ptr.4896.
- De Villatoro, B.S., Gonzalez, F.G., Polonsky, J., Baskevitch-Varon, Z. (1974). Chrysophanic acid, chrysophanein and chaparrin from *Alvaradoa amorphoides*. *Phytochemistry*, 13, 2018-2019.
- De García, L., Guarín, D. L., Tobar, M. C. (1986). Obtención de ayanina de las hojas de *Croton glabellus*. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 15 , 95-98. Doi:10.15446/rcciquifa.
- Dewanjee, S., Gangopadhyay, M., Bhattacharya, N., Khanra, R., Dua, T.K. (2015). Bioautography and its scope in the field of natural product chemistry. *Journal of Pharmaceutical Analysis*, 5 , 75-84. Doi: 10.1016/j.jpha.2014.06.002.
- de Rodríguez, D.J., Trejo-González, F. A., Rodríguez-García, R., Díaz-Jimenez, M. L. V., Sáenz-Galindo, A., Hernández-Castillo, F. D., Peña-Ramos, F.M. (2015). Antifungal activity *in vitro* of *Rhus muelleri* against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Industrial Crops and Products*, 75, 150-158. Doi:10.1016/j.indcrop.2015.05.048.
- De-la-Cruz-Chacón, I., Riley-Saldaña, C.A., Arrollo-Gómez, S., Sancristóbal-Domínguez, T.J., Castro-Moreno, M., González-Esquinca, A.R. (2019). Spatio-temporal variation of alkaloids in *Annona purpurea* and the associated influence on their antifungal activity. *Chemistry and Biodiversity*, 16, 1-14. Doi:10.1002/cbdv.201800284.
- Dean, R., Van Kan, J.A., Pretorius, Z.A., Hammond-Kosack, K.E., Di Pietro, A., Spanu, P.D., Foster, G.D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13 , 414-430. Doi:10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x.

- Deepika, M., Pokhar, R., Kusum, M., Vinod, S. (2012). Management of fruit rot (*Curvularia lunata*) of bell pepper. *Journal of Mycology and Plant Pathology*, 42 , 317-320.
- Díaz-Braga, A.J. (2012). Evaluación de Extractos Fúngicos contra *Meloidogyne incognita* (Kofoid & White) Chitwood y Establecimiento de Bioensayos de Inocuidad. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. México. pp. 98.
- Dissanayake, M.L.M.C., Ito, S.I., Akakabe, Y. (2015). TLC Bioautography Guided Detection and Biological Activity of Antifungal Compounds from Medicinal Plant *Acorus calamus* Linn. *Asian Journal of Plant Pathology*. 9 , 16-26. Doi:10.3923/ajppaj.2015.16.26.
- Dixon, L.J., Schlub, R.L., Pernezny, K., Datnoff, L.E. (2009). Host specialization and phylogenetic diversity of *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*, 99 , 1015-1027. Doi:10.1094/PHYTO-99-9-1015.
- Domínguez, X.A., Temblador, S., Cedillo M.E. (1976). Estudio químico de la raíz de la tullidora (*Karwinskia humboldtiana* Zucc.). *Revista Latinoamericana de Química*, 7, 46-48.
- Eshbaugh, W.H. (2012). Chapter 2: The Taxonomy of the Genus *Capsicum*. Peppers: Botany, Production and Uses. Russo, V.M (Ed). CABI. UK. pp. 14-18. ISBN-13:978 1845937676.
- El-Hawary, S.S., El-Fitany, R.A., Mousa, O.M., Salama, A.A., El Gedaily, R.A. (2021). Metabolic profiling and *in vivo* hepatoprotective activity of *Malpighia glabra* L. leaves. *Journal of Food Biochemistry*, 45 , e13588. Doi: 10.1111/jfbc.13588.
- El-Mohamedy, R.S., Abdalla, A.M. (2014). Evaluation of antifungal activity of *Moringa oleifera* extracts as natural fungicide against some plant pathogenic fungi *in vitro*. *Journal of Agricultural Technology*, 10 , 963-982. ISSN 1686-9141.
- Enríques, R.G., Chávez, M.A., Jauregui, F. (1980). Propenylbenzenes from *Guatteria gaumeri*. *Phytochemistry*, 19 , 2024-2025. Doi:10.1016/0031-9422(80)83029-9.
- Fernández N.R (1988). Tres especies nuevas de *Karwinskia* (Rhamnaceae) de México. *Acta Botánica Mexicana*, 2, 11-20. Doi:10.21829/abm2.1988.563.
- Fekry, A., Elsabbagh, W., Abu Bakr, M., El-Ghazaly, M., Mohamed, A.E.S. (2021). Antioxidant activity of *Malpighia glabra* L., leaves extract. Azhar. *International Journal of*

Pharmaceutical and Medical Sciences, 1 , 88-93. Doi: 10.21608/AIJPMS.2021.59935.1042.

Fort, R., Trinidad Barnech, J., Dourron, J., Colazzo, M., Aguirre-Crespo, F., Duhagon, M., Álvarez, G. (2018). Isolation and Structural Characterization of Bioactive Molecules on Prostate Cancer from Mayan Traditional Medicinal Plants. *Pharmaceuticals*, 11 , 78. Doi:10.3390/ph11030078.

Fortunato, A.A., Debona, D., Bernardeli, A.M.A., Rodrigues, F.Á. (2015). Changes in the antioxidant system in soybean leaves infected by *Corynespora cassiicola*. *Phytopathology*. 105), 1050-1058. Doi: 10.1094/PHYTO-10-14-0283-R.

Gamboa-Angulo, M.M., Cristóbal-Alejo, J., Medina-Baizabal, I.L., Chí-Romero, F., Méndez-González, R., Simá-Polanco, P., May-Pat, F. (2008). Antifungal properties of selected plants from the Yucatán península, México. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24 , 1955-1959. Doi: 10.1007/s11274-008-9658-x.

Gaherwal, S., Prakash, M. M., Khasdeo, K., Sharma, A. (2015). Impact of Selected Chemical and Herbal Pesticide on Beneficial Soil Microorganism. *International Journal of Microbiological Research*. 6 , 236-239. Doi:10.5829/idosi.ijmr.2015.6.3.9652.

Gené, J., Guarro, J. (2001). Identificación de hongos miceliarios. Guía práctica de identificación y diagnóstico en micología clínica. *Revista Iberoamericana de Micología*. 1-18. ISBN: 978-84-611-8776-8.

Giovannini, P., Howes, M.J.R. (2017). Medicinal plants used to treat snakebite in Central America: Review and assessment of scientific evidence. *Journal of Ethnopharmacology*, 199, 240-256. Doi: 10.1016/j.jep.2017.02.011.

González-Lavaut, J.A., Garcia González, N., Gordo Álvarez, O., Vélez-Castro, H. (2008). Una Entidad Química Aislada de *Erythroxylum confusum* Britton: Palmitato de β -amirina. *Latin American Journal of Pharmacy*. 27 , 85-8. ISSN 0326-2383.

Godoy-Rodríguez, T (2019). Actividad antifúngica de plantas nativas de la península de Yucatán para el control de fitopatógenos poscosecha de *Capsicum* spp. Tesis de Maestría. Centro de Investigación Científica de Yucatán. Mérida, Yucatán. México. pp.98.

- Gupta, S.P., Rana, K.S., Sharma, K., Chhabra, B.S. (2014). Antifungal activity of aqueous leaf extract of *Ocimum sanctum* on dominant fungal species of monuments. *European Chemical Bulletin*. 2 , 609-11.
- Gupta, M., Sharma, S., Bhaduria, R. (2016). *In vitro* efficacy of *Momordica charantia* extracts against phytopathogenic fungi, *Fusarium oxysporum*. *Journal of Biopesticides*, 9 , 8.
- Gutiérrez-Lugo, M.T., Barrientos-Benítez, T., Luna, B., Ramírez-Gama, R.M., Bye, R., Linares, E., Mata, R. (1996). Antimicrobial and cytotoxic activities of some crude drug extracts from Mexican medicinal plants. *Phytomedicine*, 2 , 341-347. Doi:10.1016/S0944-7113(96)80079-1.
- Grosvenor, S.N., Mascoll, K., McLean, S., Reynolds, W.F., Tinto, W.F. (2006). Tirucallane, apotirucallane, and octanorapotirucallane triterpenes of *Simarouba amara*. *Journal of Natural Products*. 69 , 1315-1318. Doi: 10.1021/np060214f.
- Hadacek, F., Greger, H., (2000). Testing of antifungal natural products: methodologies, comparability of results and assay choice. *Phytochemical Analysis: An International Journal of Plant Chemical and Biochemical Techniques*, 11 , 137-147. Doi: 10.1002/(SICI)1099-1565(200005/06)11:3<137::AID-PCA514>3.0.CO;2-I.
- Hernández-Rodríguez, Z.G., Riley-Saldaña, C.A., González-Esquinca, A.R., Castro-Moreno, M., de la Cruz-Chacón, I. (2018). Antifungal activity of *Solanum* extracts against phytopathogenic *Curvularia lunata*. *Journal of Plant Protection Research*, 58 , 311-315. Doi: 10.24425/jppr.2018.124634.
- Herrera-Parra, E., Cristóbal-Alejo, J., Martínez-Bolaños, M., Hernández-Arenas, M., López-Guillén, G. (2017). Primer registro de *Fusarium solani* y *F. equiseti* en plantaciones de *Jatropha curcas* en México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 35 , 150-161. Doi: 10.18781/r.mex.fit.1608-1.
- Hernández-Rodríguez, Z.G. (2016). Actividad antifúngica de especies del género *Solanum* sobre *Curvularia lunata*. Tesis de Licenciatura en Biología. Instituto en Ciencias Biológicas-UNICACH. Tuxtla Gutiérrez, Chiapas. México. pp. 86.

- Hoil-Cocom, P.A (2016). Actividad inhibitoria del extracto acuoso de *Bonellia flammea* contra hongos postcosecha de *Capsicum* spp. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Conkal. Mérida, Yucatán. México. pp. 49.
- Husain, A., Indani, A., Bhutada, P. (2017). Hypercholesterolemia effectively managed with homeopathic medicine *Gautteria gaumeri* (Yumel): results from a clinical study in academic clinical set up in north India. *International Journal of Advances in Medicine*. 4 , 772. Doi: 10.18203/2349-3933.ijam20172270.
- Irkin, R., Korukluoglu, M. (2007). Control of *Aspergillus niger* with garlic, onion and leek extracts. *African Journal of Biotechnology*. 6 , 384-387. ISSN: 1684-5315.
- Jamkhande, P.G., Wattamwar, A.S (2015). *Annona reticulata* Linn. (Bullock's heart): Plant profile, phytochemistry and pharmacological properties. *Journal of Traditional and Complementary Medicine*, 5 , 144-152. Doi:10.1016/j.jtcme.2015.04.001.
- Jimenez-Arellanes, A., Mata, R., Lotina-Henssen, B., Lang, A.L.A., Ibarra, L.V. (1996). Phytogrowth-inhibitory compounds from *Malmea depressa*. *Journal of Natural Products*, 59 , 202-204. Doi:10.1021/np960058k.
- Jiménez-Reyes, M.F., Carrasco, H., Olea, A., Silva-Moreno, E. (2018). Natural compounds: A sustainable alternative for controlling phytopathogens. *PeerJ Preprints*, 6, e26664v1. Doi: 10.7287/peerj.preprints.26664v1.
- Reller, L. B., Weinstein, M., Jorgensen, J.H., Ferraro, M.J. (2009). Antimicrobial susceptibility testing: a review of general principles and contemporary practices. *Clinical Infectious Diseases*, 49 ,1749-1755. Doi: 10.1086/647952.
- Jones, J. R., Lebar, M.D., Jinwal, U.K., Abisambra, J. F., Koren III, J., Blair, L., Dickey, C.A. (2011). The diarylheptanoid (+)-a R, 11 S-myricanol and two flavones from bayberry (*Myrica cerifera*) destabilize the microtubule-associated protein Tau. *Journal of Natural Products*, 74 , 38-44. Doi: 10.1021/np100572z.
- Juárez, E.M.G. (2014). Evaluación de cuatro reguladores de crecimiento en chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) en Acayucan, Veracruz. México. *Revista Científica Biológica Agropecuaria Tuxpan*, 2 , 748-755. ISSN: 2007-6940.

- Kehie, M., Kumaria, S., Tandon, P. (2013). *In vitro* plantlet regeneration from cotyledon segments of *Capsicum chinense* Jacq. cv. Naga King Chili, and determination of capsaicin content in fruits of *in vitro* propagated plants by High Performance Liquid Chromatography. *Scientia Horticulturae*, 164, 1-8. Doi: 10.1016/j.scienta.2013.08.018.
- Kurhekar, J., Tupas, G.D., Otero, M.C.B. (2019). *In-vitro* Assays for Antimicrobial Assessment. In *Phytochemistry: An in-silico and in-vitro Update*. Springer, Singapore, pp. 279-298. Doi: 10.1007/978-981-13-6920-9_15279.
- Kuri, S.K., Islam, M.R., Mondal, U. (2010). Effect of aqueous extract of some plants on some stored and field fungi. *Journal of Agroforestry and Environment*, 4 , 37-40. ISSN 1995-6983.
- Laforet, E.P. (2015). Especies oportunistas de importancia clínica de los géneros *Bipolaris* Shoemaker y *Curvularia* Boedijn: su caracterización bajo los nuevos criterios taxonómicos. *Boletín Micológico*, 30 , 40-63. Doi: 10.22370/bolmicol.2015.30.2.348.
- Lee, H.S. (2007). Fungicidal property of active component derived from *Acorus gramineus* rhizome against phytopathogenic fungi. *Bioresource Technology*, 98 , 1324-1328. Doi: 10.1016/j.biortech.2006.05.018.
- Liu, D.W., Liu, D., Liu, Q. Y., Zhang, D., Tao, L., Zhang, Y.J. (2019). First Report of Cucumber Target Leaf Spot, on Cucumber in Heilongjiang, Northeastern China. *Plant Disease*, 103 , 765-765. Doi: 10.1094/PDIS-09-18-1504-PDN.
- Lima, T.C., de Jesus Souza, R., da Silva, F.A., Biavatti, M.W. (2018). The genus *Calea* L.: A review on traditional uses, phytochemistry, and biological activities. *Phytotherapy Research*, 32 , 769-795. Doi: 10.1002/ptr.6010.
- Lima, M.V.L.D. (2012). Atividade do óleo volátil, fases e extrato etanólico de *Piper aduncum* L. contra *Corynespora cassiicola* (Berk. e MA Curtis) CT Wei, agente causal da mancha-alvo do tomateiro (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Mestre em Agronomia Tropical. Universidade Federal do Amazonas. pp. 61.
- López, E., Navarro, A., Manchón, N., Herrera, J. (2014). Componentes funcionales en *Nanche* (*Byrsonima crassifolia* (L) Kunth). *Cuerpos Académicos*, 2, 6-22.

- Lungu, L., Popa, C.V., Morris, J., Savoiu, M. (2011). Evaluation of phytotoxic activity of *Melia azedarach* L. extracts on *Lactuca sativa* L. *Romanian Biotechnological Letters*, 16 , 6089-6095.
- Matos, O.C., Baeta, J., Silva, M.J., Ricardo, C.P. (1999). Sensitivity of *Fusarium* strains to *Chelidonium majus* L. extracts. *Journal of Ethnopharmacology*. 66 , 151-158. Doi: 10.1016/S0378-8741(98)00183-4.
- Macías, R.H., Muñoz Villalobos, J. A., Velásquez Valle, M.A., Potisek Talavera, M.D.C., Villa Castorena, M.M. (2013). Chile habanero: descripción de su cultivo en la península de Yucatán. *Revista Chapingo Serie Zonas Áridas*. 12 , 37-43. ISSN: 2007-526X.
- Matyjaszczyk, E. (2018). "Biorationals" in integrated pest management strategies. *Journal of Plant Diseases and Protection*, 125 , 523-527. Doi: 10.1007/s41348-018-0180-6.
- Manju, M.J., Benagi, V.I., Shankarappa, T.H., Kuruvilla Jacob, C., Sabu, P.I. (2014). Antifungal activity of some biological agents against *Corynespora cassiicola* causing Corynespora leaf fall disease of rubber (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Indian Journal of Advances in Plant Research*, 1 , 30-32. ISSN: 2347-8918.
- Martín, J., Crespo, G., González-Menéndez, V., Pérez-Moreno, G., Sánchez-Carrasco, P., Pérez Victoria, I., Ruiz-Pérez, L.M., González-Pacanowska, D., Vicente, F., Genilloud, O., Gerald, F.B., Reyes F. (2014). MDN-0104, an antiplasmodial betaine lipid from *Heterospora chenopodii*. *Journal of Natural Products*. 77 , 2118–2123. Doi: 10.1021/np500577v.
- Manasi, P.S., Gaikwad, D.K. (2011). A critical review on medicinally important oil yielding plant laxmitaru (*Simarouba glauca* DC.). *Journal of Pharmaceutical Sciences and Research*. 3 , 1195. ISSN:0975-1459.
- Martínez-Fernández, E., Martínez-Jaimes, P., Guillén-Sánchez, D., Peña-Chora, G., Hernández-Hernández, V.M. (2015). Diversidad de *Fusarium* en las raíces de caña de azúcar (*Saccharum officinarum*) en el estado de Morelos, México. *Revista Mexicana de Micología*, 42, 33-43. ISSN 0187-3180.
- Martínez-Ceja, A., Romero-Estrada, A., Columba-Palomares, M.C., Hurtado-Díaz, I., Álvarez, L., Teta-Talixtacta, R., Sánchez-Ramos, M., Cruz-Sosa, F., Bernabé-Antonio, A. (2022).

- Anti-inflammatory, antibacterial and antioxidant activity of leaf and cell cultures extracts of *Randia aculeata* L. and its chemical components by GC-MS. *South African Journal of Botany*, 144, 206-218. Doi:10.1016/j.sajb.2021.08.036.
- Majumdar, N., Mandal, N.C., Majumdar, C.N. (2019). Screening of different botanicals extract on two polyphagous postharvest pathogens from mango and banana. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8 , 4253-4256. ISSN: 2278-4136.
- Mejía, R. (2016). *Guatteria gaumeri*, *Malmea depressa* o Yumel, una revisión sobre su historia, sus propiedades y su uso en la homeopatía. *La homeopatía de México*, 85 , 28-38.
- Mejía-Bautista, M.A., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J.M., Reyes-Ramírez, A (2016a). Actividad *in vitro* de *Bacillus* spp. en la inhibición de crecimiento micelial de *Fusarium equiseti* y *Fusarium solani* aislado de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agrociencia*, 50 , 1123-1135. ISSN 1405-3195.
- Mejía-Bautista, M.Á., Reyes-Ramírez, A., Cristóbal-Alejo, J., Tun-Suárez, J.M., Borges-Gómez, L. D. C., Pacheco-Aguilar, J.R. (2016b). *Bacillus* spp. en el Control de la Marchitez Causada por *Fusarium* spp. en *Capsicum chinense*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 34 , 208-222. Doi: 10.18781/r.mex.fit.1603-1.
- Mikawlawng, K., Kaushik, S., Pushker, A., Kumar, S., Kameshwor, M., Sharma, G. (2014). Comparative *in vitro* antifungal activities of *Simarouba glauca* against *Fusarium oxysporum* and *Aspergillus parasiticus*. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 2, 1-7. ISSN: 2320-3862.
- Mitscher, L.A., Gollapudi, S.R., Oburn, D.S., Drake, S. (1985). Antimicrobial agents from higher plants: Two dimethylbenziso-chromans from *Karwinskia humboldtiana*. *Phytochemistry*, 24, 1681-1683. Doi:10.1016/S0031-9422(00)82534-0.
- Mis-Mut, D.M. (2015). Identificación Molecular de *Trichoderma* spp. con Aplicación Agrícola y su Efectividad *in vitro* contra *Fusarium* spp. Tesis de Maestría; Instituto Tecnológico de Conkal: Mérida, Yucatán, México pp. 102.
- Mitchell, S.A., Ahmad, M.H. (2006). A review of medicinal plant research at the University of the West Indies, Jamaica, 1948-2001. *West Indian Medical Journal*, 55 , 243-269.

- Mishra, A.K., Mishra, A., Kehri, H. K., Sharma, B., & Pandey, A.K. (2009). Inhibitory activity of Indian spice plant *Cinnamomum zeylanicum* extracts against *Alternaria solani* and *Curvularia lunata*, the pathogenic dematiaceous moulds. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials*, 8 , 1-7. Doi:10.1186/1476-0711-8.
- Mogle, U.P. (2013). Efficacy of leaf extracts against the postharvest fungal pathogens of cowpea. *Bioscience Discovery*, 4 , 39-42. ISSN: 2229-3469.
- Moreno, L.L. (2015). Evaluación agronómica de germoplasma de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.). *Agroproductividad*, 8 , 24-29.
- Momin, R. A., Nair, M. G. (2002). Pest-managing efficacy of trans-asarone isolated from *Daucus carota* L. seeds. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 50 , 4475-4478. Doi: 10.1021/jf020209r.
- Monzote, L., Piñón, A., Setzer, W.N. (2014). Antileishmanial Potential of Tropical Rainforest Plant Extracts.. *Medicines*, 1 , 32-55. Doi: 10.3390/medicines1010032.
- Moya-Elizondo, E.A., Jacobsen, B.J. (2016). Integrated management of *Fusarium* crown rot of wheat using fungicide seed treatment, cultivar resistance, and induction of systemic acquired resistance (SAR). *Biological Control*, 92, 153-163. Doi: 10.1016/j.biocontrol.2015.10.006.
- Moo-Koh, F.A., Cristóbal Alejo, J., Reyes-Ramírez, A., Tun-Suárez, J.M., Sandoval-Luna, R., Ramírez-Pool, J.A. (2014). Actividad *in vitro* del extracto acuoso del *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. *Agrociencia*, 48 , 833-845. ISSN 1405-3195.
- Naves, E.R., de Ávila Silva, L., Sulpice, R., Araújo, W.L., Nunes-Nesi, A., Peres, L.E., Zsögön, A. (2019). Capsaicinoids: Pungency beyond *Capsicum*. *Trends in plant science*, 24 , 109-120. Doi:10.1016/j.tplants.2018.11.001.
- Nascimento, E.M., Rodrigues, F.F., Costa, W.D., Teixeira, R.N., Boligon, A.A., Sousa, E.O., Rodrigues, F.G., Coutinho D.M.H., da Costa, J.G.M. (2018). HPLC and *in vitro* evaluation of antioxidant properties of fruit from *Malpighia glabra* (Malpighiaceae) at different stages of maturation. *Food and Chemical Toxicology*, 119, 457-463. Doi:10.1016/j.fct.2017.11.042.

- Naruzawa, E.S., Papa, M.F.S. (2011). Antifungal activity of extracts from Brazilian Cerrado plants on *Colletotrichum gloeosporioides* and *Corynespora cassiicola*. *Revista Brasileira de Plantas Mediciniais*, 13 , 408-412.
- Nghia, N.A., Kadir, J., Sunderasan, E., Abdullah, M.P., Malik, A., Napis, S. (2008). Morphological and inter simple sequence repeat (ISSR) markers analyses of *Corynespora cassiicola* isolates from rubber plantations in Malaysia. *Mycopathologia*. 166 , 189-201. Doi: 10.1007/s11046-008-9138-8.
- Ntalli, N., Menkissoglu-Spiroudi, U., Doitsinis, K., Kalomoiris, M., Papadakis, E.N., Boutsis, G., Dimou, M., Monokrousos, N. (2020). Mode of action and ecotoxicity of hexanoic and acetic acids on *Meloidogyne javanica*. *Journal of Pest Science*, 93 , 867-877. Doi: 10.1007/s10340-020-01193-y.
- Nuez, F., O.R. J. Costa. (2003). El cultivo de pimientos, Chiles y Ajies. Mundi-Prensa. México. pp. 20-360.
- Ober, A.G., Fischer, N.H., Parodi, F. (1986). Jamaicolides AD, four sesquiterpene lactones from *Calea jamaicensis*. *Phytochemistry*, 25 (4), 877-881. Doi: 10.1016/0031-9422(86)80020-6.
- OECD, Organization of Economic Cooperative Development (1984). Earthworm Acute Toxicity Tests #207.
- Ogbebor, N., Adekunle, A.T. (2005). Inhibition of conidial germination and mycelial growth of *Corynespora cassiicola* (Berk and Curt) of rubber (*Hevea brasiliensis* muell. Arg.) using extracts of some plants. *African Journal of Biotechnology*, 4 (9), 996-1000. ISSN 1684–5315.
- Onofre, R.B., Rebello, C.S., Mertely, J.C., Peres, N.A. (2019). First Report of Target Spot Caused by *Corynespora cassiicola* on Strawberry in North America. *Plant Disease*, 103 (6), 1412-1412. Doi:10.1094/PDIS-01-19-0057-PDN.
- O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Wright, C.W., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C., Mahabir Gupta, P., Correya, M., Solis, P. (1988). Plants as sources of antimalarial drugs, Part 6: Activities of *Simarouba amara* fruits. *Journal of Ethnopharmacology*, 22 , 183-190. Doi: 10.1016/0378-8741(88)90126-2.

- Orozco-Martínez, J., Lira-Saade, R., Jiménez-Estrada, M., Ávila-Acevedo, J.G., Serrano-Parrales, R., Hernández-Delgado, T. (2020). Medicinal plants of Oaxaca, Mexico: ethnobotany and antibacterial activity. *Boletín latinoamericano y del caribe de plantas medicinales y aromáticas*, 19 , 221-235. ISSN: 0717 7917.
- Ortega-Acosta, S.Á., Hernández-Morales, J., Ochoa-Martínez, D.L., Ayala-Escobar V. (2015). First Report of *Corynespora cassiicola* Causing Leaf and Calyx Spot on Roselle in México. *Plant Disease*, 9 , 1041-1041. Doi: 10.1094/PDIS-04-14-0438-PDN.
- Pawar, K.R., Janavale, G.B., Wagh, S.G., Panche, A.N., Daspute, A.A., Pohare, M.B., Harke, S.N. (2019). Phytochemical analysis of *Simarouba glauca* Dc. and Comparison of its Bioactivity. *Asian Journal of Immunology*, 2 , 1-11.
- Payo-Hill, A.L., Domínguez, R.S., Suarez, M.O., Batista-Baez, M., Castro, H.V., Rastrelli, L., Aquino, R. (2000). Tropane alkaloids from the leaves and stem bark of *Erythroxylon alaternifolium* and *Erythroxylon rotundifolium*. *Phytochemistry*. 54 , 927-932. Doi: 10.1016/S0031-9422(00)00087-X.
- Patricio-Hernández, A., Ortega-Acosta, S.Á., Ramírez-Peralta, A., Ayala-Sánchez, A., Palemón-Alberto, F., Toledo-Hernández, E., Romero-Ramírez, Y., Toribio-Jiménez, J. (2020). Bacterias antagónicas para control en bioespacio del manchado de jamaica (*Corynespora cassiicola*) en *Hibiscus sabdariffa*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 38 , 450-462. ISSN 0185-3309.
- Paz, D.S.D., Araujo, J.R.G., Rodrigues, A.A.C., Diniz, N.B. (2018). Reaction of papaya genotypes to target spot and activity of plant extracts and *Bacillus* spp. on *Corynespora cassiicola*. *Revista Brasileira de Fruticultura*, 40 , 1-8. Doi: 10.1590/0100-29452018927.
- Pandeya, K.B., Tripathi, I.P., Mishra, M. K., Dwivedi, N., Pardhi, Y., Kamal, A., Gupta, Priyanka., Dwivedi, Nupa., Mishra, C. (2013). A critical review on traditional herbal drugs: An emerging alternative drug for diabetes. *International Journal of Organic Chemistry*, 3 , 1-22. Doi: 10.4236/ijoc.2013.31001.
- Paul, B.D., Rao, G.S., Kapadia, G.J. (1974). Isolation of myricadiol, myricitrin, taraxerol, and taraxerone from *Myrica cerifera* L. root bark. *Journal of Pharmaceutical Sciences*, 63 , 958-959. Doi:10.1002/jps.2600630638.

- Pathak, K., Zaman, K. (2013). An overview on medicinally important plant-*Annona reticulata* Linn. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry Research*, 5 , 299-301. ISSN: 0975-4873.
- Pérez-Chablé, C.L. (2019). Aislamiento e identificación de hongos en semillas de *Capsicum* spp. y su sensibilidad *in vitro* a extractos vegetales. Tesis de Maestría. Instituto Tecnológico de Conkal. México. pp. 49.
- Pérez, W., Bernal, B., Martín, A., Romeu, C. (2000). Estudio preliminar de dos extractos vegetales para el control *in vitro* del hongo *Corynespora cassiicola* (Berk & Curt) Wei. *Fitosanidad*, 15 , 43-46.
- Peraza-Sánchez, S.R., Cen-Pacheco, F., Noh-Chimal, A., May-Pat, F., Simá-Polanco, P., Dumonteil, E., García-Miss, M.R., Mut-Martín, M. (2007). Leishmanicidal evaluation of extracts from native plants of the Yucatán peninsula. *Fitoterapia*, 78 , 315-318. Doi. 10.1016/j.fitote.2007.03.013.
- Peraza-Sánchez, S. R., Chan-Che, E. O., Ruiz-Sánchez, E. (2005). Screening of Yucatecan plant extracts to control *Colletotrichum gloeosporioides* and isolation of a new pimarene from *Acacia pennatula*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 53 , 2429-2432. Doi: doi.org/10.1021/jf040422i.
- Pérez-Verdugo, O.C., Ruiz-Sánchez, E., Gamboa-Angulo, M., Latournerie-Moreno, L., Fernández-Concha, G.C., Cua-Basulto, M., Chan-Cupul, W. (2019). Actividad biológica de productos derivados de plantas en mosquita blanca (*Bemisia tabaci*) y su parasitoide *Encarsia formosa*. *Agroecosistemas Tropicales y Subtropicales*, 22, 575-583.
- Pedroso, A.T.R., Arrebato, M.A.R., Baños, S.B., Triana, A.C., González, D.R. (2012). Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista Científica UDO Agrícola*. 12 , 91-96. ISSN: 1317-9152.
- Perrett, S., Whitfield, P.J. (1995). Anthelmintic and pesticidal activity of *Acorus gramineus* (Araceae) is associated with phenylpropanoid asarones. *Phytotherapy Research*, 9 , 405-409. Doi: 10.1002/ptr.2650090604.

- Peñuelas-Rubio, O., Arellano-Gil, M., Verdugo-Fuentes, A.A., Chaparro-Encinas, L.A., Hernández-Rodríguez, S.E., Martínez-Carrillo, J.L., Vargas-Arispuro, I.D.C. (2017). *Larrea tridentata* extracts as an ecological strategy against *Fusarium oxysporum* radialis-*lycopersici* in tomato plants under greenhouse conditions. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35 , 360-376. ISSN 0185-3309.
- Phongpaichit, S., Pujenjob, N., Rukachaisirikul, V., Ongsakul, M. (2005). Antimicrobial activities of the crude methanol extract of *Acorus calamus* Linn. *Songklanakarin Journal of Science and Technology*, 27 , 517-523.
- Pino-Otín, M. R., Val, J., Ballesteros, D., Navarro, E., Sánchez, E., González-Coloma, A., Mainar, A.M. (2019). Ecotoxicity of a new biopesticide produced by *Lavandula luisieri* on non-target soil organisms from different trophic levels. *Science of the Total Environment*. 671, 83-93. Doi:10.1016/j.scitotenv.2019.03.293.
- Polonsky, J., Varon, Z., Rabanal, R. M., Jacquemin, H (1977a). 21, 20-Anhydromelianone and Melianone from *Simarouba amara* (Simaroubaceae); Carbon-13 NMR Spectral Analysis of Δ^7 -Tirucallol-Type Triterpenes. *Israel Journal of Chemistry*, 16 , 16-19.
- Polonsky, J., Varon, Z., Jacquemin, H., Pettit, G.R. (1978b). The isolation and structure of 13, 18-dehydroglauucarubinone, a new antineoplastic quassinoid from *Simarouba amara*. *Experientia*, 34 , 1122-1123.
- Ponte, J.D. (1992). Histórico das pesquisas sobre a utilização da manipueira (extrato líquido das raízes de mandioca) como defensivo agrícola. *Fitopatologia Venezuelana*, 5 , 2-5.
- Polanco-Hernández, G., Escalante-Erosa, F., García-Sosa, K., Acosta-Viana, K., Chan-Bacab, M.J., Sagua-Franco, H., Peña-Rodríguez, L.M. (2012). *In vitro* and *in vivo* trypanocidal activity of native plants from the Yucatán península. *Parasitology Research*, 110 , 31-35. Doi:10.1007/s00436-011-2447-8.
- Poot CJ. (2011). Agente causal que afecta el prendimiento del injerto en *Pouteria sapota* Jacq. y pruebas de sensibilidad *in vitro*. Tesis de Licenciatura en Agronomía. Instituto Tecnológico de Conkal, Yucatán. México. pp. 52.
- Puranik, S.I., Ghagane, S.C., Nerli, R.B., Jalalpure, S.S., Hiremath, M.B. (2017). Evaluation of *in vitro* antioxidant and anticancer activity of *Simarouba glauca* leaf extracts on T-24

- bladder cancer cell line. *Pharmacognosy Journal*, 9 , 906-912. Doi: 10.5530/pj.2017.6.142.
- Quintal-Novelo, C., Torres-Tapia, L.W., Moo-Puc, R., Peraza-Sánchez, S.R. (2015). Cytotoxic constituents from the stem bark of *Alvaradoa amorphoides*. *Journal of the Mexican Chemical Society*, 59 , 211-214. ISSN 1870-249X.
- Quintanilla, R.H.R., Pinto, A.C. (2014). Constituyentes Químicos y Propiedades Biológicas de Especies do Género *Serjania*. *Revista Virtual de Química*, 6 , 1583-1606. Doi:10.5935/1984-6835.20140103.
- Ramírez-Morillo, I.M. (2019). La flora de la península de Yucatán: ¿Diversa? ¿Bien conocida? ¿Protegida? No, no y ¿No? Desde el Herbario CICY. 11, 130-137. ISSN: 2395-8790.
- Ragab, M.M., Ashour, A.M.A., Abdel-Kader, M.M., El-Mohamady, R., Abdel-Aziz, A. (2012). *In vitro* evaluation of some fungicides alternatives against *Fusarium oxysporum* the causal of wilt disease of pepper (*Capsicum annum* L.). *International Journal of Agriculture and Forestry*, 2 , 70-77. Doi: 10.5923/j.ijaf.20120202.11.
- Ramirez, L.S., Castaño, D.M. (2009). Metodologías para evaluar *in vitro* la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et technical*, 15 , 263-268. ISSN: 0122-1701.
- Ramos, J.S. (2017). Respostas alelopáticas de *Piper umbellatum* L.(piperaceae) em sementes de alface (*Lactuca sativa* L.). Licenciatura em Ciências Biológicas. Universidade Do Estado Do Amazonas pp.1-12.
- Ramya, K. S., Kanimathi, P., Radha, A. (2019). GC–MS analysis and antimicrobial activity of various solvent extracts from *Simarouba glauca* leaves. *Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry*, 8 , 166-171. ISSN: 2278-4136.
- Ramírez, J.G., Avilés, B.W., Dzip E.R. (2006). Áreas con Potencial Productivo para Chile Habanero (*Capsicum chinense*, Jacq.) en el Estado de Yucatán. En: Primera Reunión Nacional de Innovación Agrícola y Forestal. INIFAP, COFUPRO, CICY, AMEAS y OTRAS INSTITUCIONES. Mérida, Yucatán, Mexico. pp. 66.

- Rajput, S.B., Karuppayil, S.M. (2013). β -Asarone, an active principle of *Acorus calamus* rhizome, inhibits morphogenesis, biofilm formation and ergosterol biosynthesis in *Candida albicans*. *Phytomedicine*, 20 , 139-142. Doi: 10.1016/j.phymed.2012.09.029.
- Rahman, M.S., Anwar, M.N. (2007). Antimicrobial activity of crude extract obtained from the root of *Plumbago zeylanica*. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 24 , 73-75. Doi: 10.3329/bjm.v24i1.1244.
- Ramírez-Mares, M.V., Hernández-Carlos. (2015). Plant-derived natural products from the American continent for the control of phytopathogenic fungi: a review. *Journal of Global Innovation in Agricultural and Social Sciences*, 3 , 96-118. Doi: 10.17957/JGIASS/3.4.721.
- Reyes-Ramírez, A., Alejo, J.C., Ruiz-Sánchez, E., Tun-Suárez, J.M. (2012b). Inhibición del crecimiento *in vitro* de *Fusarium* sp. aislado de chile habanero (*Capsicum chinense*) con hongos antagonistas. *Fitosanidad*, 16 , 161-165. ISSN: 1562-3009.
- Rinez, A., Daami-Remadi, M., Ladhari, A., Omezzine, F., Rinez, I., Haouala, R. (2013). Antifungal activity of *Datura metel* L. organic and aqueous extracts on some pathogenic and antagonistic fungi. *African Journal of Microbiology Research*, 7 , 1605-1612. Doi: 10.5897/AJMR12.2376.
- Rongai, D., Pulcini, P., Pesce, B., Milano, F. (2015). Antifungal activity of some botanical extracts on *Fusarium oxysporum*. *Open Life Sciences*, 10 , 409-416. Doi: 10.1515/biol-2015-0040.
- Rout, S.P., Kar, D.M. (2014). Identification of chemical compounds present in different fractions of *Annona reticulata* L. leaf by using GC-MS., 28 , 1786-1788. Doi: 10.1080/14786419.2014.939084.
- Rodeiro, I., Donato, M.T., Martínez, I., Hernández, I., Garrido, G., González-Lavaut, J.A., Menéndez. R., Laguna, A., Castell, J.V., Gómez-Lechón, M.J. (2008). Potential hepatoprotective effects of new Cuban natural products in rat hepatocytes culture. *Toxicology in vitro*, 22 , 1242-1249. Doi: 10.1016/j.tiv.2008.04.006.
- Rodríguez-García, C.M., Ruiz-Ruiz, J.C., Peraza-Echeverría, L., Peraza-Sánchez, S.R., Torres-Tapia, L.W., Pérez-Brito, D., Tapia-Tussell, R., Herrera-Chale, F.G., Segura-Campos

- M.R., Quijano-Ramayo, A., Ramón-Sierra, J.M., Ortiz-Vázquez, E. (2019). Antioxidant, antihypertensive, anti-hyperglycemic, and antimicrobial activity of aqueous extracts from twelve native plants of the Yucatan coast. *PloS One*, 14 , e0213493. Doi: 10.1371/journal.pone.0213493.
- Rodrigues, A.A.C., Menezes, M. (2005). Identification and pathogenic characterization of endophytic *Fusarium* species from cowpea seeds. *Mycopathologia*, 159 , 79-85.
- Rodríguez, D.J., Hernández-Castillo, D., Angulo-Sánchez, J.L., Rodríguez-García, R., Quintanilla, J.V., Lira-Saldivar, R.H. (2007). Antifungal activity *in vitro* of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products*, 25 , 111-116. ISSN: 0926-6690.
- Ruiz-Hernández, J. (2016). Bioecología y control de *Corynespora cassiicola* (Berk. & MA Curtis) en *Solanum lycopersicum* (L.). *Revista de Protección Vegetal*, 31 , 148-148. ISSN 1010-2752.
- Ruiz-Lau, N., Medina-Lara, F., Martínez-Estévez, M. (2011). El chile habanero: su origen y usos. *Ciencia*. 63 , 70-76.
- Sandoval-Chávez, R.A., Martínez-Peniche, R.Á., Hernández-Iturriaga, M., Fernández-Escartín, E., Arvizu-Medrano, S., Soto-Muñoz, L. (2011). Control biológico y químico contra *Fusarium stilboides* en pimiento morrón (*Capsicum annum* L.) en poscosecha. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, 17 , 161-172. ISSN 1027-152X.
- Saetae, D., Suntornsuk, W. (2010). Antifungal activities of ethanolic extract from *Jatropha curcas* seed cake. *Journal of Microbiology and Biotechnology*, 20 , 319-324. Doi: 10.4014/jmb.0905.05035.
- Saha, A., Rahman, M.S. (2008). Antimicrobial activity of crude extract from *Calycopteris floribunsa*. *Bangladesh Journal of Microbiology*, 25 , 137-139. Doi: 10.3329/bjm.v25i2.4877
- Salazar, L., Diamont, D., Aponte, G. (2015). Identificación del agente causal de la marchitez de *Stevia rebaudiana* Bertoni en muestras provenientes del estado Aragua, Venezuela. *Bioagro*, 27 , 57-61. ISSN: 1316-3361.

- Savithamma, N., Rao, M.L., Suhurulatha, D. (2011). Screening of medicinal plants for secondary metabolites. *Middle-East Journal of Scientific Research*, 8 , 579-584.
- Satyanarayana, T., Gangarao, B. (2013). Pharmacognostical and Phytochemical Studies of *Annona reticulata* linn International. *Journal of Research In Pharmacy and Chemistry*, 3 , 477-482. ISSN: 1990-9233.
- Schmidt, J.M., Noletto, J.A., Vogler, B., Setzer, W.N (2007). Abaco bush medicine: Chemical composition of the essential oils of four aromatic medicinal plants from Abaco Island, Bahamas. *Journal of Herbs, Spices and Medicinal Plants*, 12, 43-65. Doi:10.1300/J044v12n03_04.
- Sesan, T.E., Enache, E., Iacomi, B.M., Oprea, M., Oancea, F., Iacomi, C. (2017). *In vitro* antifungal activity of some plant extracts against *Fusarium oxysporum* in blackcurrant (*Ribes nigrum* L.). *Acta Scientiarum Polonorum Hortorum Cultus*, 16 , 163-172. Doi: 10.24326/asphc.2017.6.1.
- Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). (2018). Registro Nacional Agropecuario. <http://www.sagarpa.mx/quienesomos/MarcoJuridico/Paginas/REGISTRONACIONALAGROPECUARIO.aspx> [Acceso 11 de junio 2021].
- Shimomoto, Y., Adachi, R., Morita, Y., Yano, K., Kiba, A., Hikichi, Y., Takeuchi, S. (2008). *Corynespora* blight of sweet pepper (*Capsicum annuum*) caused by *Corynespora cassiicola* (Berk. & Curt.) Wei. *Journal of General Plant Pathology*, 74 , 335-337. Doi:10.1007/s10327-008-0100-x.
- Shi, W., Tan, Y., Wang, S., Gardiner, D.M., De Saeger, A., Liao, Y., Wang, C., Fan, Y., Wang, Z., Fan, Y., Wang, Z., Wu, A. (2017). Mycotoxigenic potentials of *Fusarium* species in various culture matrices revealed by mycotoxin profiling. *Toxins*, 9 , 6. Doi: 10.3390/toxins9010006.
- Shafique, S., Asif, M., Shafique, S. (2015). Management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *capsici* by leaf extract of *Eucalyptus citriodora*. *Pakistan Journal of Botany*, 47 , 1177-1182.

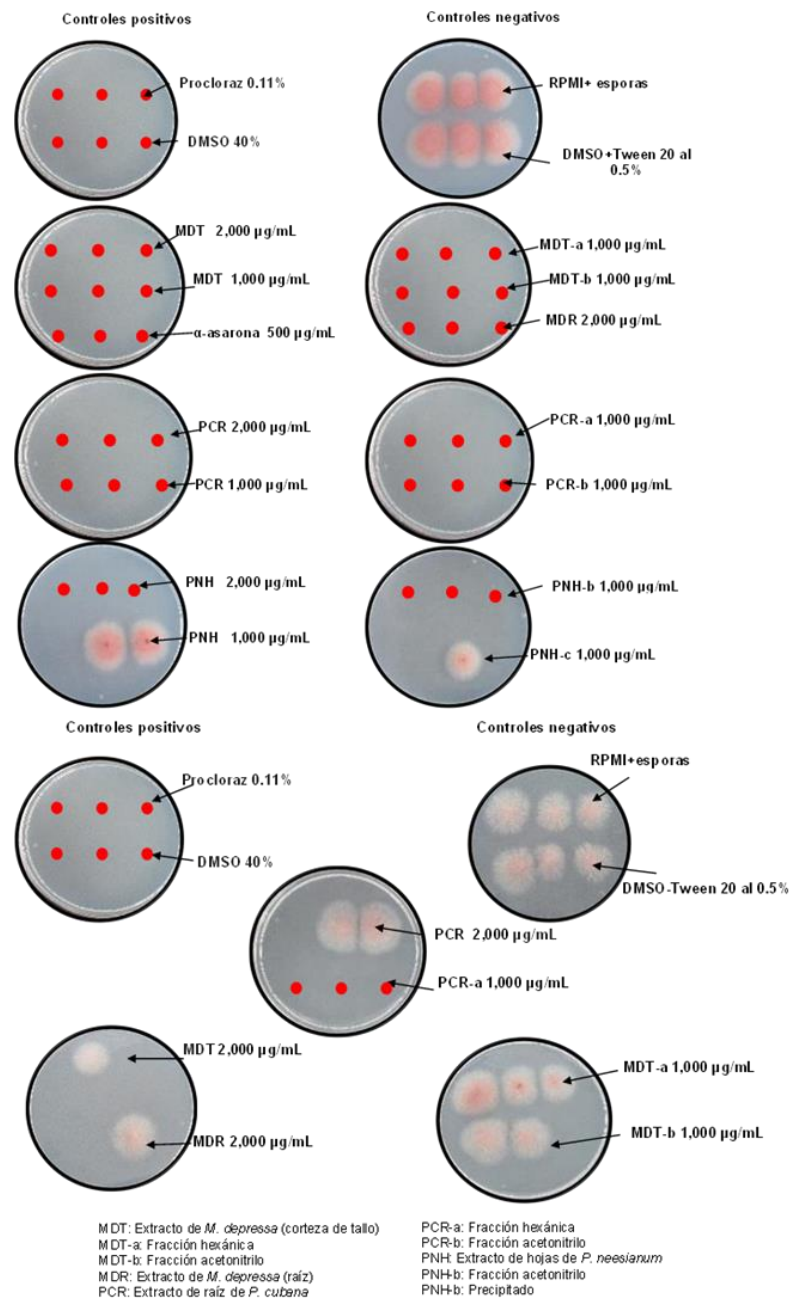
- Sharma, S., Singh, R., Thakre, B. (2019). Antifungal Activity of Leaf Extracts of *Ocimum sanctum* against Fungal Pathogens. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 8 , 1210-1214. Doi: 10.20546/ijcmas.2019.804.139.
- Shamsi, S., Saha, T., Naher, N. (2016). Efficacy of plant extracts and fungicides against fungi associated with lemon in storage. *Bioresearch Communications*, 2 , 249-253. ISSN: 2411-0272.
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. (2017). Con denominación de origen y producción orgánica, el valor agregado del chile habanero. <https://www.gob.mx/siap>. [Acceso 20 septiembre 2021].
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (2018). Chile habanero de la Península de Yucatán. <https://www.gob.mx/siap>. [Acceso 15 septiembre 2021].
- Singha, I.M., Unni, B.G., Kakoty, Y., Das, J., Wann, S.B., Singh, L., Kalita, M.C. (2011). Evaluation of *in vitro* antifungal activity of medicinal plants against phytopathogenic fungi. *Archives of Phytopathology and Plant Protection*, 44 , 1033-1040. Doi: 10.1080/03235401003672913.
- Silva, F.L., da Silva, J. L., Silva, J.M., Marcolin, L.S., Nouailhetas, V.L., Yoshida, M., Vendramini, P.H., Eberlin, M.N., Barbosa-Filho, J.M. Moreno, P.R. (2017). Antispasmodic activity from *Serjania caracasana* fractions and their safety. *Revista Brasileira de Farmacognosia*. 27 , 346-352. Doi: 10.1016/j.bjp.2016.12.002.
- Slish, D.F., Arvigo, R., Balick, M.J. (2004). *Aseis yucatanensis*: a natural product from Belize that exhibits multiple mechanisms of vasorelaxation. *Journal of Ethnopharmacology*, 92 , 297-302. Doi: 10.1016/j.jep.2004.03.003.
- Soto-Sobenis, A., Castillo, B., Delgado, A., González, A., Montenegro, R. (2001). Alkaloid screening of herbarium samples of Rubiaceae from Panama. *Pharmaceutical Biology*. 39 , 161-169. Doi: 10.1076/phbi.39.3.161.5925.
- Srinivasan, K. (2015). Biological activities of red pepper (*Capsicum annum*) and its pungent principal capsaicin: a review. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56 , 1488-1500. Doi: 10.1080/10408398.2013.772090.

- Subba, B., Aryal, P. (2016). Study of Biological Activity and Chemical Constituent of *Annona reticulata*. *Journal of Institute of Science and Technology*, 21 , 157-163. Doi: 10.3126/jist.v21i1.16068.
- Suresh, V., Sumalatha, N., Ravat, V.K., & Basu, A. (2017). First Report of *Corynespora* Leaf Spot Caused by *Corynespora cassiicola* on Chilli in West Bengal, India. *International Journal of Current Microbiology and Applied Sciences*, 6 , 3216-3219. Doi: 10.20546/ijcmas.2017.606.383.
- Tarache, A. (2007). Separación e identificación de algunos compuestos constituyentes de la planta *Helicteres baruensis* Jacq. (Sterculiaceae) y su actividad biológica. Trabajo de pregrado. Departamento de Química, Universidad de Oriente, Cumaná, Venezuela. pp. 29-34.
- Tapia-Vargas, M., Larios-Guzmán, A., Díaz-Sánchez, D.D., Ramírez-Ojeda, G., Hernández-Pérez, A., Vidales-Fernández, I., Guillén-Andrade, H. (2016). Producción hidropónica de chile habanero negro (*Capsicum chinense* Jacq.). *Revista Fitotecnia Mexicana*. 39 , 241-245. Doi: 10.35196/rfm.2016.3.241-245.
- Tapwal, A., Garg, S., Gautam, N., Kumar, R. (2011). *In vitro* antifungal potency of plant extracts against five phytopathogens. *Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54 , 1093-1098. ISSN:1516-8913.
- Terramoto, A., Meyer, M.C., Suassuna, N.D., Cunha, M.G.D. (2017). *In vitro* sensitivity of *Corynespora cassiicola* isolated from soybean to fungicides and field chemical control of target spot. *Summa Phytopathologica*, 43 , 281-289. Doi: 10.1590/0100-5405/2195.
- Thang, T.D., Kuo, P.C., Huang, G.J., Hung, N.H., Huang, B.S., Yang, M.L., Luong, N.X., Wu, T.S (2013). Chemical constituents from the leaves of *Annona reticulata* and their inhibitory effects on NO production. *Molecules*, 18 , 4477-4486. Doi: 10.3390/molecules18044477.
- Tian, J., Zeng, X., Zhang, S., Wang, Y., Zhang, P., Lü, A., Peng, X. (2014). Regional variation in components and antioxidant and antifungal activities of *Perilla frutescens* essential oils in China. *Industrial Crops and Products*, 59, 69-79. Doi: 10.1016/j.indcrop.2014.04.048.

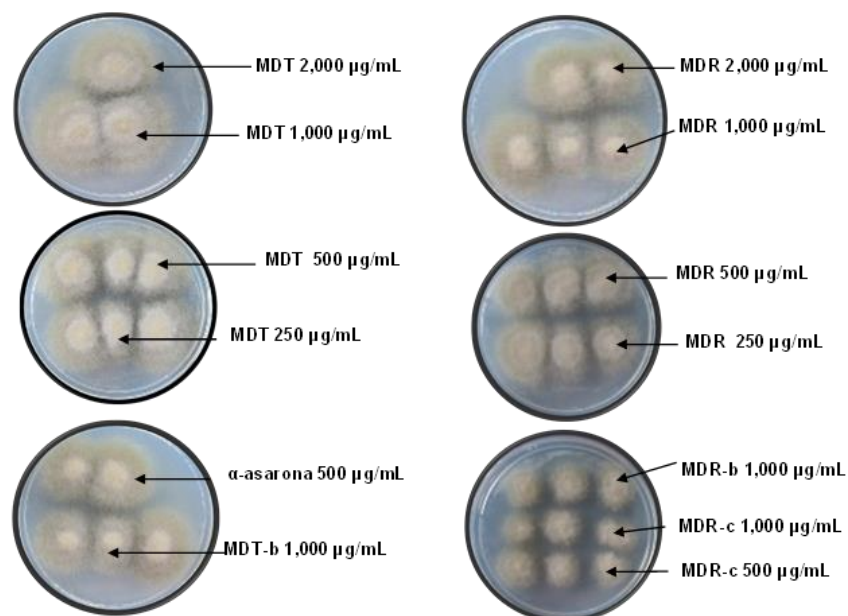
- Tun-Suárez, J.M., Castillo-Peraza, M.E., Cristóbal-Alejo, J., Latournerie-Moreno, L. (2011). Etiología de la mancha foliar del chile dulce (*Capsicum annuum* L.) y su control *in vitro* en Yucatán, México. *Fitosanidad*, 15 , 5-10. ISSN 1818-1686.
- Tun-Dzul, J. (2001). Chile habanero, características y tecnología de producción. SAGARPA, INIFAP. Mocochoá, Yucatán, México. pp. 74.
- Vasanth-Srinivasan, P., Senthil-Nathan, S., Ponsankar, A., Thanigaivel, A., Chellappandian, M., Edwin, E.S., Selin-Rani, S., Kalaivani, K., Hunter, W.B., Duraipandian, V., Al-Dhabi, N.A. (2018). Acute toxicity of chemical pesticides and plant-derived essential oil on the behavior and development of earthworms, *Eudrilus eugeniae* (Kinberg) and *Eisenia fetida* (Savigny). *Environmental Science and Pollution Research*, 25 , 10371-10382. Doi: 10.1007/s11356-017-9236-6.
- Vargas-Díaz, A.A., Gamboa-Angulo, M., Medina-Baizabal, I.L., Pérez-Brito, D., Cristóbal-Alejo, J., Ruiz-Sánchez, E. (2014). Evaluación de Extractos de Plantas Nativas Yucatecas contra *Alternaria chrysanthemi* y Espectro de Actividad Antifúngica de *Acalypha gaumeri*. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 32 , 01-11. ISSN 0185-3309.
- Venkatesan, R., Karuppiyah, P.S., Arumugam, G., Balamuthu, K. (2019). β -Asarone Exhibits Antifungal Activity by Inhibiting Ergosterol Biosynthesis in *Aspergillus niger* ATCC 16888. *Proceedings of the National Academy of Sciences, India Section B: Biological Sciences*, 89 , 173-184. Doi: 10.1007/s40011-017-0930-4.
- Velarde-Félix, S., Garzón-Tiznado, J.A., Hernández-Verdugo, S., López-Orona, C.A., Retes-Manjarrez, J.E. (2018). Occurrence of *Fusarium oxysporum* causing wilt on pepper in México. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 40 , 238-247. Doi: 10.1080/07060661.2017.1420693.
- Villa-Martínez, A., Pérez-Leal, R., Morales-Morales, H.A., Basurto-Sotelo, M., Soto-Parra, J.M., Martínez-Escudero, E. (2014). Situación actual en el control de *Fusarium* spp. y evaluación de la actividad antifúngica de extractos vegetales. *Acta Agronómica*, 64 , 194-205. Doi: 10.15446/acag.v64n2.43358.
- Villaseñor, J.L. (2016). Checklist of The Native Vascular Plants of Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 87 , 559-902. Doi: 10.1016/j.rmb.2016.06.017.

- Waksman, N., Ramírez, N. (1992). Isolation of a new dymeric Anthracenone from *Karwinskia parvifolia*. *Revista Latinoamericana de Química*, 23 , 25-27.
- Walia, S., Saha, S., Tripathi, V., Sharma, K.K. (2017). Phytochemical biopesticides: some recent developments. *Phytochemistry Reviews*, 16 , 989-1007. Doi: 10.1007/s11101-017-9512-6.
- Wahyuni, Y., Ballester, A.R., Sudarmonowati, E., Bino, R.J., Bovy, A.G. (2013). Secondary metabolites of *Capsicum* species and their importance in the human diet. *Journal of Natural Products*, 76 , 783-793. Doi: 10.1021/np300898z.
- Wenqiang, G., Shufen, L., Ruixiang, Y., Yanfeng, H. (2006). Comparison of composition and antifungal activity of *Artemisia argyi* Levl. et Vant inflorescence essential oil extracted by hydrodistillation and supercritical carbon dioxide. *Natural Product Research*, 20 , 992-998. Doi: 10.1080/14786410600921599.
- Zhang, J., Yamada, S., Ogihara, E., Kurita, M., Banno, N., Qu, W., Feng, F., Akihisa, T. (2016). Biological Activities of Triterpenoids and Phenolic Compounds from *Myrica cerifera* Bark. *Chemistry and Biodiversity*, 13 , 1601-1609. Doi: 10.1002/cbdv.201600247.
- Zhu, J., Zhang, L., Ma, D., Gao, Y., Mu, W., Liu, F. (2019). A bioactivity and biochemical analysis of iminoctadine tris (albesilate) as a fungicide against *Corynespora cassiicola*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 158, 121-127. Doi: 10.1016/j.pestbp.2019.04.016.

ANEXOS



Anexo 1. Efecto fungicida o fungistático de extractos activos y fracciones de *M. depressa* corteza de tallo y raíz, *Piper neesianum* hojas y *Parathesis cubana* raíz contra *Fusarium equiseti* y *F. oxysporum*.



MDT: Extracto de *M. depressa* (corteza de tallo)
 MDT-b: Fracción de acetoniitrilo
 MDT-c: Precipitado
 MDR: Extracto de *M. depressa* (corteza de raíces)
 MDR-b: Fracción de acetoniitrilo
 MDR-c: Precipitado

Anexo 2. Efecto fungicida o fungistático de extractos activos y fracciones de *M. depressa* corteza de tallo y raíz, *Piper neesianum* hojas contra *Curvularia lunata*.

Rendimiento de los extractos etanólicos y acuosos

Los rendimientos más altos (>10%) de los EE se obtuvieron a partir de las hojas de *Bakeridesia notolophium*, seguido del extracto de la raíz de *Byrsonima bucidaefolia* Sandl., las hojas y la raíz de

Morella cerifera, así con la hoja de *Licaria* sp. Por otra parte, el EA de la raíz *Alvaradoa amorphoides* y las hojas de *Bravaisia berlandieriana* presentaron el rendimiento más alto (>16%), seguido (>14%) con los pertenecientes a las hojas de *Alseis yucatanensis*, *Diospyros* sp., *Stenmadenia donnell-smithii*, los tallos de *Bravaisia berlandieriana*, *Ipomoea clavata*, *Macroscopus diademata*, así como las hojas y tallo de *Helicteres baruensis* y *Serjania caracasana*.

Especie	Parte vegetal	Rendimiento % (p/100 g rvsm*)	
		EtOH	H ₂ O
<i>Alseis yucatanensis</i> Standl.	H	3.8	11.2
<i>Alvaradoa amorphoides</i> Liebm.	H	3.6	2.5
	T	1.7	1.4
	R	2.8	16.2
<i>Annona primigenia</i> Standl. & Steyerm	H	2.3	3.3
	CT	2.5	4.2
<i>Bakeridesia notolophium</i> (A. Gray) Hochr.	H	10.1	5.4
	T	2.1	0.9
<i>Bravaisia berlandieriana</i> (Nees) T.F. Daniel	H	1.4	14.8
	T	1.1	10.8
	R	1.8	6.6
<i>Byrsonima bucidifolia</i> Standl.	H	5.1	3.3
	T	7.4	3.7
	R	11	3.9
<i>Calea jamaicensis</i> (L.) L.	PC	2.0	6.0
<i>Cameraria latifolia</i> L.	H	8.2	4.0
	CT	3.3	4.0
	R	6.2	4.6
<i>Chrysophyllum mexicanum</i> Brandegees ex Standl.	H	3.1	3.3
	T	0.9	3.8
	R	3.8	5.6
<i>Coccoloba</i> sp.	H	3.8	4.1
	T	6.6	0.0
<i>Croton arboreus</i> Millsp.	H	1.0	2.7
	T	2.5	3.4
	R	4.3	3.0
<i>Croton itzaeus</i> Lundell	H	2.5	3.9
	CT	3.4	4.3
	CR	2.0	1.8
<i>Croton</i> sp.	PC	1.7	0.8
<i>Cupania</i> sp.	H	2.7	6.2
	T	1.7	0.3
<i>Diospyros</i> sp.	H	2.3	11.3

<i>Erythroxylum confusum</i> Britton	H	4.4	4.3
	T	9.0	4.4
	R	9.6	2.5
<i>Erythroxylum rotundifolium</i> Lunan	H	2.0	6.4
	T	0.6	1.0
<i>Erythroxylum</i> sp.	H	3.9	4.0
<i>Eugenia</i> sp.	H	2.1	5.9
	T	0.9	5.9
	R	0.8	2.0
<i>Euphorbia armourii</i> Millsp	PC	2.6	6.3
<i>Guettarda combsii</i> Urb.	H	4.3	5.4
	CT	3.0	5.9
	CR	3.3	5.2
<i>Helicteres baruensis</i> Jacq.	H	1.2	9.9
	T	1.4	11.2
	R	1.0	3.2
<i>Heteropterys laurifolia</i> (L.) A. Juss.	H	4.7	3.1
	CT	4.7	4.0
	R	4.4	6.3
<i>Hybanthus yucatanensis</i> Millsp.	H	1.4	7.7
	T	0.8	2.6
<i>Ipomoea clavata</i> (G. Don) Ooststr. ex J.F.Macbr.	PC	2.2	10.7
<i>Karwinskia humboldtiana</i> (Willd. ex Roem. & Schult.) Zucc.	H	2.6	8.3
<i>Licaria</i> sp.	H	16.4	6.2
	CT	2.5	3.4
	CR	3.4	3.9
<i>Macroscepis diademata</i> (Ker Gawl.) W.D. Stevens	H	3.6	7.7
	CT	2.8	12.2
<i>Malpighia glabra</i> L.	H	1.5	7.3
	T	0.7	3.5
	R	0.7	5.3
<i>Morella cerifera</i> (L.) Small.	H	11.4	5.0
	T	6.9	5.9
	CR	20.1	5.0
<i>Mosannonna depressa</i> (Ball.) Chatrou	H	4.2	8.4
	CT	4.2	9.3
	CR	7.0	6.0
<i>Parathesis cubana</i> (A. DC.) Molinet & M. Gómez	H	9.9	7.5
	CT	4.4	5.2
	CR	9.3	6.8
<i>Paullinia</i> sp.	H	3.0	4.6

	R	2.6	1.7
<i>Piper neesianum</i> C.DC.	H	1.0	8.7
	T	1.4	4.7
	R	1.1	2.8
<i>Psychotria</i> sp.	PC	3.0	1.0
<i>Randia aculeata</i> L.	H	1.2	5.6
	T	0.6	3.9
	R	1.3	4.1
<i>Serjania caracasana</i> (Jacq.) Willd	H	2.4	11.1
	T	4.6	11.2
	R	6.2	6.7
<i>Simarouba glauca</i> DC.	H	6.5	5.0
	CT	2.1	2.3
	CR	1.9	6.6
<i>Stemmadenia donnell-smithii</i> (Rose) Woodson	H	4.0	10.7
	CT	1.8	3.6
<i>Turnera aromatica</i> Arbo	PC	1.7	4.4

rvsm*: Residuo vegetal seco y molido, H; hoja; T: tallo; R: raíz, CT: corteza de tallo; CR: corteza de raíz,
PC: planta completa