



Artículo Científico

Composición química de hidrolatos de *Tagetes* y evaluación *in vitro* e *in vivo* contra hongos asociados a enfermedades en fresa (*Fragaria x ananassa*)

Miguel Ángel Ruíz-González, Miguel Ángel Serrato-Cruz*, Ernestina Valadez-Moctezuma, Roney Solano-Vidal, Universidad Autónoma Chapingo. km 38.5 Carretera México-Texcoco. 56230, Chapingo, Estado de México.

*Autor de
correspondencia:
Miguel Ángel Serrato-Cruz
serratocruz@gmail.com

Sección:
Edición periódica

Recibido:
28 Enero, 2024
Aceptado:
25 Junio, 2024
Publicado:
09 Julio, 2024

Cita:
Ruíz-González MA,
Serrato-Cruz MA,
Valadez-Moctezuma E
y Solano-Vidal R. 2024.
Composición química de
hidrolatos de *Tagetes* y
evaluación *in vitro* e *in vivo*
contra hongos asociados
a enfermedades en fresa
(*Fragaria x ananassa*).
Revista Mexicana de
Fitopatología 42(3): 26.
[https://doi.org/10.18781/R.
MEX.FIT.2401-5](https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2401-5)



RESUMEN

Antecedentes / Objetivo. Las plantas aromáticas contienen compuestos químicos con potencial para formular productos antifúngicos. El objetivo de esta investigación fue caracterizar la composición química en hidrolatos de especies de *Tagetes* y evaluar su efecto *in vitro* e *in vivo* contra hongos asociados a enfermedades en fresa.

Materiales y métodos. Los hidrolatos de *T. coronopifolia*, *T. minuta*, *T. parryi* y *T. terniflora* fueron analizados mediante cromatografía de gases acoplado a detector selectivo de masas. Se evaluaron *in vitro* hidrolatos al 100, 75, 50 y 25 % y fungicidas comerciales Promyl contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia solani* y Ridomil Gold contra *Phytophthora capsici*. En la evaluación *in vivo* las plantas de fresa se asperjaron con hidrolatos y 24 h después fueron inoculadas con suspensión de esporas 1×10^6 . Los datos se analizaron mediante análisis de varianza y pruebas de medias de Tukey ($p \leq 0.05$).

Resultados. Los monoterpenos fueron los compuestos mayoritarios en las cuatro especies. El hidrolato de *T. parryi* *in vitro* inhibió totalmente el crecimiento de *B. cinerea* y fue efectivo como tratamiento preventivo en la evaluación *in vivo*. *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* fueron menos susceptibles a todos los hidrolatos.

Conclusión. El hidrolato de *T. parryi* se puede aplicar como preventivo contra *B. cinerea* en plantas de fresa.

Palabras clave: Enfermedades fungosas, *Fragaria*, inhibición, antifúngico

INTRODUCCIÓN

En México, la superficie sembrada de fresa (*Fragaria x ananassa*) en el año 2018 fue de 13,562 ha y en 2022 se redujo a 7,872 ha (SIAP, 2022), esta disminución se debe a problemas fitosanitarios que afectan su producción, asociados con diferentes especies de hongos, entre ellos *Fusarium oxysporum*, *Rhizoctonia* spp. (Golzar *et al.*, 2007), *Phytophthora* spp. (Serret-López *et al.*, 2016) y *Botrytis cinerea* (Boddy, 2016), esta situación repercute en pérdidas de hasta 50 % de la producción (Bárceñas-Santana *et al.*, 2019). Para el control de estos hongos, se ha recurrido principalmente al uso de agroquímicos, sin embargo, el uso y dosis inadecuadas de estos ha generado efectos negativos en el ambiente y en el humano, también los hongos han desarrollado resistencia a fungicidas, aun así, su uso se intensifica y se han vuelto indispensables para la seguridad alimentaria mundial (Zubrod *et al.*, 2019). Esta situación ha motivado a investigadores y productores a explorar alternativas, como los extractos de plantas o compuestos derivados de las mismas que se han utilizado con éxito en el control de hongos fitopatógenos. Los extractos vegetales tienen la ventaja de contener más de un compuesto antifúngico, por lo que el desarrollo de resistencia del patógeno es menos probable si los diferentes compuestos afectan a un proceso metabólico diferente (Shuping y Eloff, 2017). Es importante considerar que en los extractos el rendimiento y la composición química es variable y depende de las condiciones climáticas, el sitio de cultivo y el tiempo de cosecha (Santos-Gomes *et al.*, 2001; Bhat *et al.*, 2016). Además, debido a su naturaleza volátil y a la termolabilidad de sus componentes, son muy susceptibles a la degradación (Odak *et al.*, 2018). Por lo anterior, el conocimiento científico previo de los recursos naturales o de las condiciones de manejo, tanto en campo como en almacenamiento, resulta indispensable para el aprovechamiento sustentable local de plantas y su transformación a insumos de biocontrol de hongos fitopatógenos como una vía de sustitución de pesticidas en sistemas de producción agrícola.

Tagetes (Asteraceae) es un recurso vegetal que en México está representado aproximadamente por 35 especies, varias con potencial en el control de hongos (Serrato, 2014), los extractos acuosos de algunas especies de *Tagetes* se han evaluado mostrando resultados promisorios, por ejemplo, *T. erecta* o compasúchil es efectivo en el control de *Fusarium oxysporum* (Wang *et al.*, 2022) y *Rhizoctonia solani* (Espejo *et al.*, 2010), en tanto que *in vitro*, el aceite esencial de *T. lemmoni* o rudilla inhibe totalmente el crecimiento micelial de *B. cinerea* (Larios-Palacios *et al.*, 2020). Durante el proceso de hidrodestilación de plantas aromáticas se obtiene un extracto acuoso conocido como hidrosol, agua aromática, hidroflorato o hidrolato, su obtención es rápida, barata y se caracteriza por contener aceite esencial en concentraciones bajas ($< 1 \text{ mL L}^{-1}$), además de algunos componentes de aceite

polares, oxigenados e hidrófilos que forman enlaces de hidrógeno con el agua (Tisserand y Young 2014; Labadie *et al.*, 2016; Taglienti *et al.*, 2022). Los hidrolatos se utilizan en perfumería, cosmética, como saborizantes de alimentos, aromaterapia y terapias tradicionales (Rajeswara, 2013). Los estudios sobre el efecto biológico de los hidrolatos aún son limitados en comparación con los realizados con aceites esenciales (Yann-Olivier *et al.*, 2018). En el área agrícola, se han usado con éxito hidrolatos de *Ocimum basilicum*, *Cuminum cyminum*, *Echinophora tenuifolia*, *Daucus carota* subsp. *sativus*, *Rosmarinus officinalis* y *Satureja hortensis* para controlar algunos hongos fitopatógenos como *Alternaria citri*, *Alternaria mali*, *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* f. sp. *tulipae*, *Penicillium expansum* y *Rhizoctonia solani* (Boyraz y Özcan, 2005; Boyraz y Özcan, 2006; Zatlá *et al.*, 2017). Por mucho tiempo, a los hidrolatos se les ha definido como productos de desecho de la hidrodestilación, pero en la actualidad se empiezan a utilizar como una alternativa para controlar hongos fitopatógenos. Por ello, la exploración y evaluación de otras especies aromáticas en el control de hongos de alta incidencia en cultivos como la fresa es indispensable. Considerando que *Tagetes* es un recurso natural abundante en México y, por lo tanto, fuente potencial de hidrolato como insumo para el biocontrol de hongos fitopatógenos, el objetivo de esta investigación fue caracterizar la composición química en hidrolatos de especies de *Tagetes* y evaluar su efecto *in vitro* e *in vivo* contra hongos asociados a enfermedades en fresa.

MATERIALES Y MÉTODOS

Muestreo vegetal. En el campo experimental de la Universidad Autónoma Chapingo (19.491733, -98.873179), en el mes de mayo de 2022 bajo condiciones de invernadero se cultivaron plantas de *Tagetes*: *T. coronopifolia*, *T. minuta*, *T. parryi* y *T. terniflora*, las cuales en etapa de floración fueron recolectadas en el mes de octubre y con tijeras de poda se cortaron en segmentos de 2 cm aproximadamente. La cantidad de 4 kg de una mezcla de flores (25 %), hojas (35 %) y tallos (40 %) se introdujo en matraz de destilador tipo italiano y posteriormente se agregaron 2 L de agua potable, se encendió el termostato (135±5 °C) y durante 40 min se hizo la hidrodestilación (Uddin *et al.*, 2023). Se obtuvieron 400 mL kg⁻¹ de hidrolato fresco, se depositó en frascos de plástico y se conservó a una temperatura de 4 °C hasta su uso. Tres especímenes de cada especie fueron ingresados al Herbario Jorge Espinoza Salas de la Preparatoria Agrícola, Universidad Autónoma Chapingo con números de registro 36282, 36280, 33299 y 36281, respectivamente.

Identificación de compuestos químicos. Los hidrolatos se analizaron en un Cromatógrafo de Gases (CG) Agilent 7890B acoplado a Detector Selectivo de Masas

(MSD) Agilent 5977A (CRO-E-003) y equipado con una columna DB-WAX Ultra Inert 60 m x 250 μm x 0.25 μm . La rampa de temperatura fue 40 °C por 1 min hasta 240 °C a una velocidad de 9 °C min^{-1} . Se utilizó helio como gas acarreador a un flujo de 1 mL min^{-1} durante los 24 min que duró la corrida. Los hidrolatos se filtraron en un microfiltro de PTFE de 45 μm , enseguida, se disolvieron 100 μL de la muestra en 400 μL de diclorometano grado HPLC, el extracto se concentró hasta un volumen de 1 mL y se inyectó 1 μL al cromatógrafo de gases en modo splitless. Los compuestos se identificaron con base en los patrones de fragmentación de los espectros de masas, los cuales se compararon con los espectros de masas depositados en la base de datos del NIST 14 (National Institute of Standards and Technology) y la base de datos de fragancias Flavor (Agilent Technologies). Se realizó la determinación de los índices de retención de Kovats con alcanos C7-C40 (Sigma-Aldrich). Los índices de retención de Kovats experimentales se compararon con los índices de Kovats de la literatura (NIST:webbok.nist.gov/chemistry/) considerando que el índice de Kovats experimental coincidiera (± 50 unidades) con el de la literatura para la identificación correcta del compuesto. La abundancia relativa de cada compuesto se estimó con base en el área de los picos.

Procedencia de los hongos. *Fusarium oxysporum*, *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani* fueron aislados a partir muestras de chile manzano (*Capsicum pubescens*) recolectadas en una plantación de chile manzano ubicado en el campo experimental agrícola Chapingo y *Botrytis cinerea* se aisló a partir de muestras de flores de rosa silvestre (*Rosa* sp.) recolectadas en el municipio de Acaxochitlán, Hidalgo. El tejido vegetal fue desinfectado con hipoclorito de sodio al 1 % y lavado tres veces con agua bidestilada, después, en medio de cultivo Agar Dextrosa y Papa (PDA) (BD Bioxon) se colocaron fragmentos de 5 mm del tejido vegetal para aislar los hongos y el oomiceto se aisló en medio de cultivo que contenía 20 g de harina de maíz, 18 g de agar-agar, 0.8 mL de pimarcina, 0.02 g de rifamicina y 0.25 g L^{-1} de ampicilina diluida en agua destilada. Las cajas Petri se dejaron a temperatura ambiente y fueron monitoreadas cada 24 h hasta observar crecimiento micelial. A las 72 h, se observó crecimiento y se transfirió inóculo a nuevo medio de cultivo para obtener cultivos puros. Después, *F. oxysporum*, *R. solani* y el oomiceto *P. capsici* fueron identificados mediante su morfología (Nelson *et al.*, 1983; Gutiérrez *et al.*, 2006; Leslie y Summerell, 2006; Plancarte *et al.*, 2017). *B. cinerea* también se identificó mediante su morfología y con pruebas de patogenicidad en frutos de fresa (Barnett y Hunter, 1986; Terrones-Salgado *et al.*, 2019); además, se hizo extracción de ADN con método SDS (Dodecil Sulfato Sódico), después se hizo amplificación en PCR utilizando iniciadores NL4 y ITS5HP (Toju *et al.*, 2012; Hudagula *et al.*, 2022). El programa térmico se fijó a 94 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos a 94 – 56 – 72 °C durante 1 – 1 – 2.3 s, respectivamente y una extensión final a

72 °C durante 10 min. Los productos amplificados de las reacciones de PCR fueron separados por electroforesis utilizando geles de agarosa al 1.2 %. Los fragmentos amplificados y purificados se enviaron a MacroGen para la secuenciación. Las secuencias en formato FASTA se compararon con la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), con lo cual se corroboró la identidad del hongo y el número de acceso en GenBank para *B. cinerea* es PP401673.1. Para la identificación molecular de los otros organismos, la extracción de ADN se hizo con el método CTAB (Weising *et al.*, 2005) con modificaciones, el micelio se obtuvo de cajas Petri con crecimiento de *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* y se colocó en morteros, se agregó nitrógeno líquido y el micelio se maceró con pistilo estéril. En tubos Eppendorf de 2 mL se agregó 1 mL de CTAB 2 % + 0.2 % β -mercaptoetanol y se agregó el micelio macerado, se agitó por inmersión, se incubó a 55 °C en termoblok durante 20 min con agitación cada 5 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron durante 5 min a 12,000 x g, con micropipetas se transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo y se agregaron 1.2 volumen de isopropanol al 100 %, se agitó por inmersión y se llevaron a centrifugar durante 10 min a 12,000 x g, se descartó el sobrenadante y se hizo un lavado con etanol al 70 %, los tubos con el ADN precipitado se centrifugaron durante 10 min a 12,000 x g y al final se decantó el etanol, los tubos se colocaron invertidos sobre papel absorbente hasta que el pellet se secó, finalmente a cada tubo se le adicionaron 50 μ L de TE y se mantuvieron a -20 durante 24 h. La concentración de ADN se determinó en un espectrofotómetro a 260 nm en un Nanodrop V3.5.2 (Coleman Technologies Inc. For Nanodrop Technologies). Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un volumen final de 25 μ L, se usaron iniciadores NL4-ITS5SHP, ITS4-ITS5HP, ITS1-NL4, ITS1-ITS4B para amplificar la región (Toju *et al.*, 2012; Hudagula *et al.*, 2022), iniciadores NMSI-NMS2 para amplificar la subunidad pequeña del ribosoma y los iniciadores EF1-EF2 (Raja *et al.*, 2017; Deng *et al.*, 2022) para amplificar el gen TEF. Las condiciones de PCR para la región ITS y subunidad pequeña del ribosoma fueron las siguientes: un primer ciclo de pre-desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, alineamiento a 58 °C durante 45 segundos y extensión a 72 °C durante 1 min y finalmente con una extensión a 72 °C durante 10 min. Las condiciones de PCR para TEF fueron: un primer ciclo de pre-desnaturalización a 95 °C durante 5 min, seguido de 35 ciclos de desnaturalización a 95 °C durante 1 min, alineamiento a 55 °C durante 45 s y extensión a 72 °C durante 1.5 min y finalmente con una extensión a 72 °C durante 10 min. El producto de amplificación por PCR se visualizó en electroforesis, se preparó un gel de agarosa al 1.2 % con buffer TAE 1x, corrido a 100 volts durante 1h. Para el revelado de bandas, el gel se tiñó con bromuro de etidio durante 15 min, después se visualizó con software Qwenty One (BioRad). El tamaño de las bandas se estimó tomando como referencia los marcadores de peso molecular 1 kb (Invitrogen) que fueron

colocadas en los extremos. Los productos amplificados se conservaron a 4 °C para su análisis. Los fragmentos amplificados y purificados se enviaron a Macrogen para la secuenciación. Las secuencias en formato FASTA se compararon con la base de datos BLAST (Basic Local Alignment Search Tool), con lo cual se corroboró la identidad de los hongos, después se hizo el registro en la base de datos del GenBank. El número de registro para cada hongo es: *F. oxysporum* (PP729638.1), *R. solani* (PP713022.1) y *P. capsici* (PP922286.1).

Evaluación *in vitro*. Se preparó medio PDA mezclado con hidrolato en cuatro concentraciones (100, 75, 50 y 25 % v/v) por cada especie, las concentraciones del hidrolato se prepararon mediante diluciones con agua bidestilada y se obtuvieron 16 tratamientos de hidrolato y el testigo con PDA. Como testigos de referencia se usaron fungicidas comerciales de la Distribuidora Técnica Industrial, S. A. de C. V. y Syngenta Agro, S.A de C.V. distribuidos en Artículos Entomológicos S. A. de C. V. Texcoco. Promyl (Benomilo: Metil 1-(butilcarbamoil) bencimidazol-2-il-carbamato) se usó para *Botrytis cinerea*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* (Vega-López y Granados-Montero, 2023) y Ridomil Gold (N-(metoxiacetil)-N-(2,6-xilil)-D-alaninato de metilo) para *Phytophthora capsici* (Pons-Hernández *et al.*, 2020). De cada fungicida se usó 1.5 g L⁻¹. Después de preparar el medio de cultivo, en el centro de cada caja Petri que contenía el medio de cultivo combinado con hidrolato se colocó un disco (3.5 mm) con micelio de cada hongo (colonias de 10 días de edad) y después se incubaron en condiciones de oscuridad con las siguientes temperaturas: *B. cinerea* a 20 °C, *P. capsici* a 27 °C, *F. oxysporum* y *R. solani* a 30 °C. Cada 24 h se midió el crecimiento radial con un vernier digital.

Evaluación *in vivo*. Solo los tratamientos que tuvieron el mayor efecto de inhibición en condiciones *in vitro* se retomaron para su evaluación *in vivo*. La evaluación se hizo en un invernadero y se usaron plantas de fresa var. “FESTIVAL” provenientes de Zamora, Michoacán de cinco meses de edad en fase de floración mantenidas en maceta con tezontle rojo; la fertilización se hizo con solución Steiner al 100 % con riegos semanales y con aplicación semanal de fertilizante foliar PEKA® (1 mL L⁻¹) (Producto elaborado por Química Sagal y distribuido en Agroquímicos Texcoco S.A. de C. V.). Cuando las plantas estaban en fructificación, se seleccionaron cuatro frutos maduros a los que se les hizo solo una perforación de 0.2 cm de profundidad con aguja de disección esterilizada con alcohol y a cada planta se le asperjaron 20 mL de hidrolato con atomizador, 24 h después de la aplicación de hidrolatos se inocularon las plantas con una suspensión de esporas 1 x 10⁶ de *F. oxysporum* y *B. cinerea* preparada con agua bidestilada y 1 mL L⁻¹ de Tween 20, la aplicación de las esporas se hizo con atomizador, *P. capsici* y *R. solani* se inocularon mediante micelio. Las plantas inoculadas se cubrieron con una bolsa de polietileno durante 48 h para mantener la humedad, posteriormente, las hojas, frutos maduros, frutos

inmaduros y flores fueron monitoreadas cada 24 h hasta las 72 h para la detección de síntomas causados por los patógenos (*B. cinerea*, *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani*).

Diseño experimental y análisis de datos. El experimento *in vitro* se analizó bajo un Diseño Completamente al Azar (DCA) con cinco repeticiones cada uno, una caja Petri fue una unidad experimental. Con los datos del crecimiento radial se calculó el porcentaje de inhibición (Kagezi *et al.*, 2015). El experimento *in vivo* se hizo con un DCA, se usaron cuatro macetas por tratamiento, una maceta fue considerada una unidad experimental, con los datos registrados sobre los frutos y flores enfermos y no enfermos se estimó la incidencia de la enfermedad (Macías *et al.*, 2016). Los datos se sometieron a un análisis de varianza y pruebas de medias de Tukey ($p \leq 0.05$) en Software académico SAS.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Compuestos químicos. En el hidrolato de *T. parryi* se identificaron 14 compuestos, en *T. minuta* 13, en *T. coronopifolia* 11 y un total de 9 en *T. terniflora* (Figura 1). En el hidrolato de *T. parryi*, los compuestos mayoritarios fueron el 3-Hexen-1-ol (25.5 %), isopiperitanona (14.9 %), 1,3-Di-terc-butilbenceno (6.1 %) y α -terpineol (5.9 %) (Cuadro 1). Al realizar una comparación con compuestos encontrados en aceite esencial de la misma especie, Díaz-Cedillo y Serrato-Cruz (2011) identificaron siete compuestos principales: canfeno, 3, 6, 6-trimetil-2-norpinanol, anisol, 4-isopropil-1-metil-2-ciclohexenol, cineol, eugenol y α -terpineol y González-Velasco *et al.* (2022) registraron 21 compuestos, entre ellos, verbenona, dihidrotagetona, tagetona, eugenol y α -terpineol, la mayoría de estos compuestos son monoterpenos y sesquiterpenos. En el hidrolato de *T. parryi* únicamente el α -terpineol y la dihidrotagetona fueron similares a lo reportado en aceite esencial, por lo que gran parte de los compuestos resultaron diferentes de lo consignado para el aceite esencial.

En el hidrolato de *T. coronopifolia* se encontró dihidrotagetona (53.9 %), cis-tagetona (11.9 %), (Z)-tagetona (9.7 %) y trans-tagetona (5.9 %) (Cuadro 1); ningún compuesto encontrado en la muestra de hidrolato coincidió con lo reportado para el aceite esencial por Díaz-Cedillo *et al.* (2013): (1S)-6,6-dimetil-2-metilenbicyclo [3.1.1] heptan-3-ona, verbenona, 2-oxo-decanoato de metilo y crisantenona.

En hidrolato de *T. terniflora* la dihidrotagetona (45 %), eucaliptol (13.2 %), trans-3-Hexen-1-ol (10.8 %) y cis-tagetona (4.5 %) (Cuadro 1) fueron los mayoritarios. Solo el compuesto cis-tagetona fue común en el aceite esencial e hidrolato analizado (Lizarraga *et al.*, 2017).

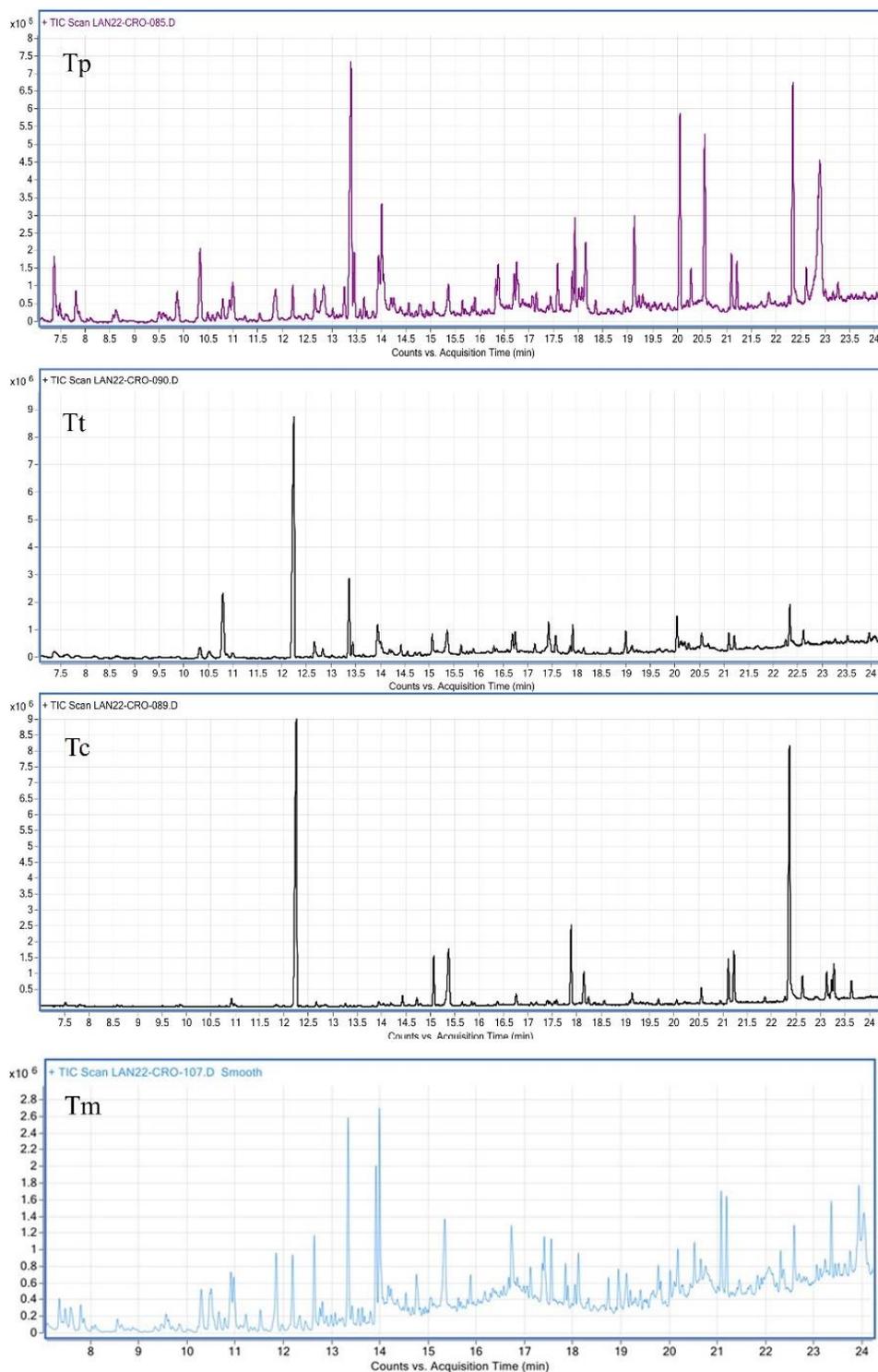


Figura 1. Cromatogramas de hidrolatos de *Tagetes parryi* (Tp), *T. terniflora* (Tt), *T. coronopifolia*, (Tc) y *T. minuta* (Tm), donde se observan los picos de los compuestos identificados.

Cuadro 1. Abundancia relativa (%) e índices de Kovats (IK) ± desviación estándar de compuestos químicos encontrados en hidrolatos de *Tagetes coronopifolia*, *T. minuta*, *T. parryi* y *T. terniflora* analizados por GC/MSD.

<i>T. parryi</i>	%	IK	<i>T. coronopifolia</i>	%	IK
° 3-Hexen-1-ol, (E)-	25.5	1370 ± 18.5	+ Dihidrotagetona	53.9	1319 ± 3.3
+ Isopiperitenona	14.9	1833 ± 41.9	+ Cis-tagetona	11.9	1500 ± 23.1
- 1,3-Di-terc-butilbenceno	6.1	1426 ± 9.5	+ (Z)-tagetenona	9.7	1704 ± 9.5
+ α-terpineol	5.9	1700 ± 14.8	+ Trans-tagetona	5.9	1522 ± 8.2
+ (Z)-tagetenona	4.5	1704 ± 24.4	* 10,11-tetradecadanoato de metilo	1.6	1663 ± 19.8
+ Cis-tagetona	3.2	1517 ± 10.7	* Cariofileno	1.2	1585 ± 33.5
* 10,11-tetradecadanoato de metilo	2.3	1663 ± 19.8	+ 2-(3-metil-2-ciclopens-1-il)-2-metilpropionaldehído	0.8	1442 ± 31.5
+ Dihidrotagetona	2.2	1319 ± 1.3	* β-bisaboleno	0.7	1715 ± 21.7
+ Terpinen-4-ol	1.9	1619 ± 6.4	+ Estragol	0.6	1676 ± 12.3
´ Benceno, 1-etil-2-metil-	1.7	1254 ± 9.1	+ Isopiperitenona	0.6	1833 ± 41.5
+ Eucaliptol	1.5	1199 ± 23.5	+ Ipsenona	0.3	1444 ± 5.4
3-Hexen-1-ol, propanoato, (Z)-	1.1	1380 ± 24.3			
° 2-ciclohexeno-1-ona	1	1424 ± 36.8			
* Isospathulenol	0.4	2186 ± 0			

<i>T. terniflora</i>	%	IK	<i>T. minuta</i>	%	IK
+ Dihidrotagetona	45	1319 ± 3.7	° 3-Hexen-1-ol, (E)-	16.4	1394 ± 0.28
+ Eucaliptol	13.2	1212 ± 14.6	´ Benceno, 1,3-bis(1,1-dimetiletil)-	14.6	1436 ± 2.26
° 3-Hexen-1-ol, (E)-	10.8	1394 ± 0.5	+ Cis-tagetona	10.1	1517 ± 10.81
+ Cis-tagetona	4.5	1517 ± 10.6	+ Dihidrotagetona	5.6	1319 ± 1.2
+ α-Terpineol	3.1	1680 ± 28.7	° 2 - Clorociclohexanol	4.7	1659 ± 24.25
+ Trans-tagetona	2.2	1501 ± 6.2	+ Trans-tagetona	4.3	1726 ± 8.2
+ Terpinen-4-ol	2.2	1606 ± 15.4	+ Isopiperitenona	2.8	1833 ± 41
° Alcohol feniletílico	0.5	1923 ± 15.8	* 10,11-tetradecadanoato de metilo	2.5	1663 ± 19.8
° 2-ciclohexeno-1-ona	0.5	1412 ± 45.4	1-Pentanona, 1-(2-furanil)-	1.3	1747 ± 10.5
			- p-xileno	1.2	1142 ± 11.1
			+ α-terpineol	1	1697 ± 16.4
			+ Terpinen-4-ol	1	1635 ± 4.8
			´ Etilbenceno	0.3	1146 ± 2.9

+ : monoterpenos, *sesquiterpenos, - : compuestos fenólicos, ° : alcoholes, ´ : compuesto de benceno

En el hidrolato de *T. minuta* el compuesto mayoritario fue el 3-Hexen-1-ol (16.4 %), benceno, 1,3-bis(1,1-dimetiletil)- (14.6 %), cis-tagetona (10.1 %) y dihidrotagetona (5.6 %) (Cuadro 1). Solo la dihidrotagetona fue común con lo que reportan Karimian *et al.* (2014) para esta especie cuyo aceite esencial contiene compuestos como: dihidrotagetona, E-ocimeno, tagetona, cis-β-ocimeno, Z-ocimeno, limoneno y epoxiocimeno.

Los compuestos 3-Hexen-1-ol, (E)-, dihidrotagetona y cis-tagetona fueron comunes en los hidrolatos de las especies de *Tagetes* en estudio (Cuadro 1), mientras que, al comparar la composición química de los hidrolatos con la de aceites esenciales,

estos no coinciden en compuestos ni en abundancia, por lo que la composición química de hidrolatos y aceites esenciales siempre es diferente, cuantitativa y cualitativamente (D'Amato *et al.*, 2018). En otros estudios se ha encontrado que tanto en hidrolatos como en los aceites esenciales los monoterpenos y los monoterpenos oxigenados son abundantes, pero no se encuentran los mismos compuestos (Vuko *et al.*, 2021). Inouye *et al.* (2008) compararon 43 hidrolatos con aceites esenciales obtenidos de mismo proceso de destilación al vapor y encontraron que 18 de los 43 hidrolatos analizados mostraron un componente mayoritario diferente al del aceite.

Los aceites esenciales de *Tagetes* son ricos en monoterpenos, además de cantidades bajas de sesquiterpenos y compuestos oxigenados (Salehi *et al.*, 2018). En este estudio, los compuestos mayoritarios en las cuatro especies pertenecen a monoterpenos y en menor cantidad a sesquiterpenos, compuestos fenólicos y algunos alcoholes (Cuadro 1). Aunque ya se tenía información sobre la composición de hidrolatos de dos especies de América del Sur (Rajeswara *et al.*, 2006; Lima *et al.*, 2009), la identificación de los compuestos en hidrolatos de las cuatro especies de *Tagetes* de México constituyen otro antecedente importante para avanzar en el conocimiento fitoquímico del género.

Evaluación *in vitro*. Los tratamientos evaluados mostraron efectos inhibitorios significativos sobre *B. cinerea* ($p < 0.0001$), *F. oxysporum* ($p < 0.0053$), *P. capsici* ($p < 0.0001$) y *R. solani* ($p < 0.0001$) (Cuadro 2). El hidrolato al 100 % de *T. parryi* inhibió el crecimiento micelial de *B. cinerea* en 71.3 %, sin diferencia estadística respecto al efecto producido por el fungicida comercial, incluso, diluciones de este hidrolato en 50 y 75 % mostraron diferencias estadísticas con el testigo; mientras que, con hidrolato al 100 % o diluido de las otras especies de *Tagetes*, la inhibición del micelio fue menor a 40 %, en la mayoría, sin diferencia estadística respecto del testigo (Cuadro 2). En *P. capsici*, el hidrolato de *T. coronopifolia* al 75 y al 100 % fue efectivo para inhibir totalmente el crecimiento micelial, al igual que el fungicida; con hidrolatos de *T. minuta*, *T. parryi* y *T. terniflora* en diluciones de 50 y 75 % la inhibición de *P. capsici* fue significativa ($p < 0.0001$) con respecto al testigo, pero no respecto al fungicida. Ninguna concentración de los hidrolatos evaluados mostró un efecto fungistático contra *F. oxysporum* y *R. solani*. Los hidrolatos de *T. minuta*, *T. parryi* y *T. terniflora* inhibieron estos hongos en 26.6 %, en el caso de *T. coronopifolia* al 100 %, se inhibió a *F. oxysporum* y *R. solani* en 25 y 34.4 %, respectivamente (Cuadro 2). El efecto inhibitorio de los aceites esenciales e hidrolatos es debido a los monoterpenos, sesquiterpenos y compuestos fenólicos (Hu *et al.*, 2019; Hill, 2022). Los monoterpenos son pequeños y pasan entre las moléculas grasas que forman la membrana celular y afectan funciones dentro de la célula, mientras que los sesquiterpenos no son tan pequeños para pasar por la membrana celular, pero tienen formas únicas que les permiten adherirse a los espacios

Cuadro 2. Porcentaje de inhibición *in vitro* de micelio de hongos después de la aplicación de hidrolatos de especies de *Tagetes*.

Tratamientos	Inhibición (%) del micelio de los hongos			
	<i>B. cinerea</i>	<i>P. capsici</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>R. solani</i>
TO	0 ± 0 e	0 ± 0 f	0 ± 0 c	0 ± 0 c
FC	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a	100 ± 0 a
H100C	40 ± 28.8 bcde	100 ± 0 a	25 ± 15.5 b	34.4 ± 22.2 b
H100M	35 ± 21.6 bcde	54.3 ± 2.5 b	21 ± 4.5 bc	20 ± 11.7 bc
H100P	71.3 ± 9.7 ab	55.3 ± 3 b	23 ± 4 b	26.6 ± 6.8 bc
H100T	25.3 ± 15 cde	57 ± 13.1 b	16.6 ± 2 bc	20 ± 2.6 bc
H75C	22.6 ± 23.5 cde	100 ± 0 a	16.6 ± 3.5 bc	32.6 ± 13.2 bc
H75M	34 ± 7.9 bcde	43.3 ± 9 bc	18.6 ± 7.6 bc	15.6 ± 6 bc
H75P	54.6 ± 18.9 bc	38.3 ± 10.4 bcd	12.3 ± 7 bc	17 ± 13.5 bc
H75T	14 ± 17.8 cde	38.3 ± 3 bcd	11.3 ± 10.5 bc	20 ± 11.5 bc
H50C	22.6 ± 2.3 cde	61.6 ± 20.4 b	9.1 ± 9.4 bc	19.6 ± 10.4 bc
H50M	25 ± 4.5 cde	27 ± 3.6 cde	16 ± 7.9 bc	10.6 ± 8.8 bc
H50P	54 ± 10.5 bcd	28.3 ± 8.5 cde	10.6 ± 6.5 bc	14.3 ± 7.5 bc
H50T	10.3 ± 24.2 de	17 ± 11.7 def	6.3 ± 7.57 bc	10 ± 12.6 bc
H25C	4.6 ± 5.6 e	10.3 ± 11.6 ef	1 ± 1 c	11.6 ± 18 bc
H25M	3.6 ± 6.3 e	16 ± 5 def	10.6 ± 7.5 bc	10 ± 10.7 bc
H25P	33.3 ± 7 bcde	13 ± 3 ef	9.3 ± 3 bc	13 ± 4.5 bc
H25T	0 ± 0 e	4.6 ± 8 ef	4 ± 4 bc	8.4 ± 0 bc
Valor p	0.0001	0.0001	0.0053	0.0001
CV	33	14	21	30
DMS	41	23	39	30

TO: Testigo, FC: Fungicida comercial, H: Hidrolato, 100, 75, 50 y 25: Concentración (%) de hidrolato usada, C: *T. coronopifolia*, M: *T. minuta*, P: *T. parryi*, T: *T. terniflora*, CV: Coeficiente de variación, DMS: Diferencia mínima significativa, Medias con letras diferentes entre las columnas son estadísticamente diferentes (Tukey, 0.05). Los valores promedio ± desviación estándar.

de estructuras proteínicas tridimensionales y afectan la actividad proteínica (Hill, 2022). Hu *et al.* (2019) mencionan que los compuestos fenólicos pueden interferir con las membranas, las paredes celulares y la acción de las enzimas. En el hidrolato de *T. parryi* se encontró una mayor diversidad de grupos de compuestos, entre estos se encontró el compuesto fenólico 1,3-Di-terc-butilbenceno (Cuadro 1). Al respecto, Zatlá *et al.* (2017) mencionan que los compuestos fenólicos de *Daucus carota* subsp. *sativus* tienen actividad antifúngica contra *B. cinerea*. Belabbés *et al.* (2017) atribuyen el efecto antifúngico contra *Penicillium expansum* a los sesquiterpenos oxigenados encontrados en el hidrolato de *Calendula arvensis*. En *T. parryi*, *T. coronopifolia* y en *T. minuta* se encontró el sesquiterpeno 11-tetradecadanoato de metilo con una abundancia relativa entre 1.6 y 2.5 % (Cuadro 1) y el efecto inhibitorio de estos hidrolatos fue mayor (Cuadro 2) a lo observado con *T. terniflora*, que

no contenía este compuesto. También, los aceites con abundancia de monoterpenos inhiben el crecimiento de hongos (Stević *et al.*, 2014), lo que permite resaltar que los hidrolatos de *Tagetes* analizados tienen abundantes monoterpenos (Cuadro 1). Aunque el efecto antifúngico se atribuye a los compuestos mayoritarios, es el efecto sinérgico de todos los compuestos los que causan los efectos antifúngicos y también algunos compuestos son más activos que otros (Dhifi *et al.*, 2016).

Evaluación *in vivo*. Los tratamientos con hidrolatos al 100 % de las cuatro especies de *Tagetes* mostraron la mayor inhibición *in vitro* (Cuadro 2), por ello, se retomaron para su evaluación *in vivo*. Las plantas de fresa no mostraron efecto fitotóxico debido a la aplicación de los hidrolatos de *Tagetes*, lo cual da buena expectativa para futuras evaluaciones en otras especies vegetales. Las plantas testigo inoculadas con *B. cinerea* presentaron síntomas de la enfermedad, tanto en frutos como en flores. Por otro lado, las plantas inoculadas con *F. oxysporum*, *P. capsici* y *R. solani* no mostraron síntomas de enfermedad en las flores, pero sí en el fruto perforado (Figura 2). Los frutos de fresa son muy perecederos, además, si el fruto presenta algún daño mecánico o lesión facilita la infección por patógenos (Ángel-García *et al.*, 2018); la falta de incidencia de la enfermedad en flores posiblemente esté relacionada con la ausencia de lesión y porque estos hongos afectan principalmente las raíces, la corona y frutos (Koike y Gordon, 2015; Awad, 2016; Barboza *et al.*, 2016).

El hidrolato de *T. parryi* fue efectivo como tratamiento preventivo contra *B. cinerea*, debido a que los frutos perforados (Figura 2A) y las flores (Figura 2B) no presentaron incidencia del hongo, por tal motivo, este hidrolato, representa un insumo alternativo a los fungicidas químicos que tienen efectos negativos en el ambiente y han inducido resistencia en este hongo (Leroux, 2004). Zatlá *et al.* (2017) evaluaron el efecto del hidrolato de *Daucus carota subsp. sativus* en frutos de fresa y este fue efectivo como tratamiento preventivo al inhibir totalmente a *B. cinerea* hasta el quinto día, estos autores atribuyen el efecto a la abundancia de compuestos fenólicos. Por ello, el efecto observado con el hidrolato de *T. parryi* también puede atribuirse al compuesto fenólico 1,3-Di-terc-butilbenceno en conjunto con los otros monoterpenos mayoritarios y sesquiterpenos encontrados en el hidrolato (Cuadro 1). Por otra parte, con la aplicación del hidrolato de *T. terniflora* en los frutos (Figura 2A) no se observaron síntomas de la enfermedad, pero las flores sí se infectaron y con el hidrolato de *T. minuta* se observó un efecto contrario, las flores no se infectaron y los frutos sí fueron infectados por el hongo (Figura 2B); con este resultado se contempla que una aplicación conjunta de estos hidrolatos podría ser efectiva contra este hongo. El hidrolato de *T. coronopifolia* no funcionó como tratamiento preventivo.

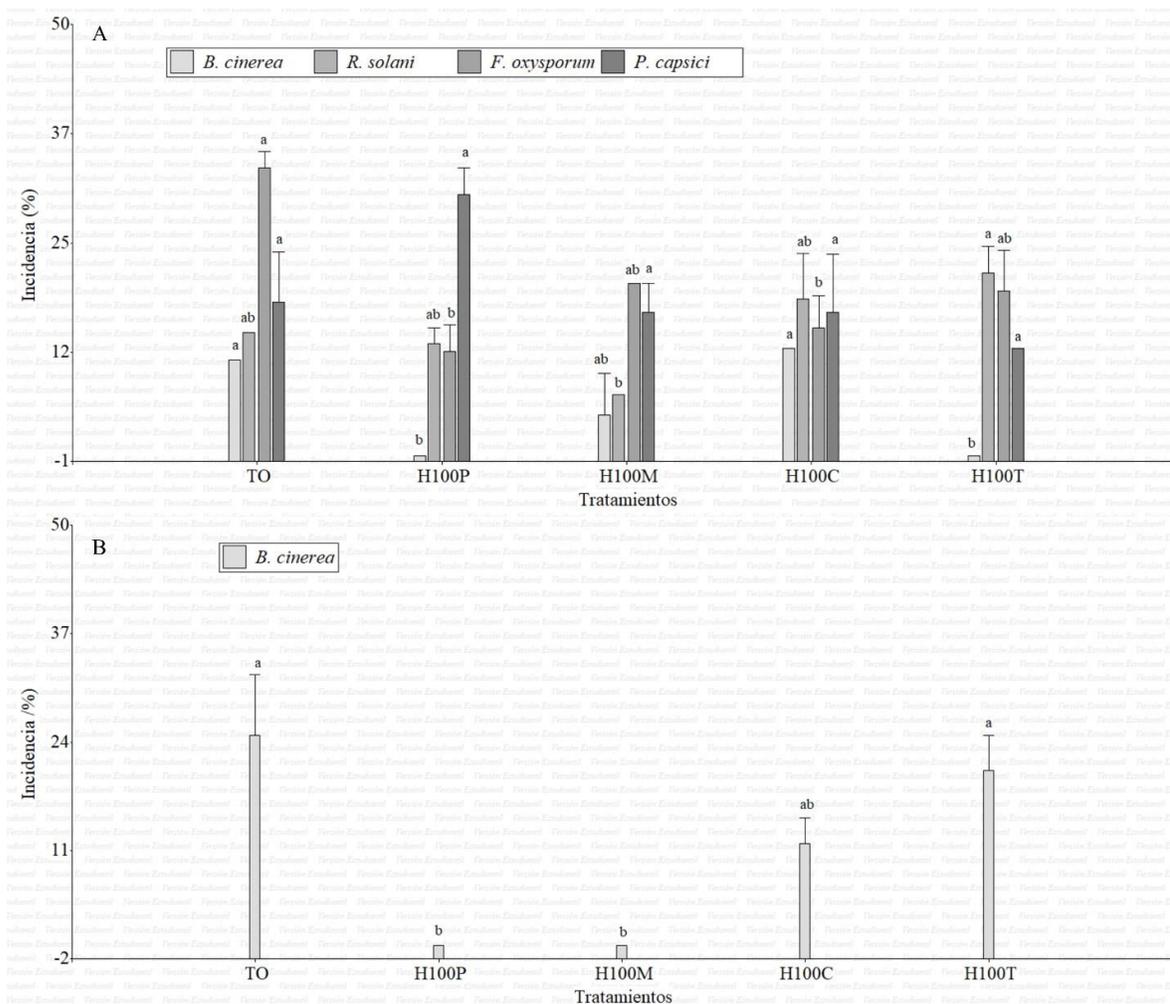


Figura 2. Incidencia de *B. cinerea*, *R. solani*, *F. oxysporum* y *P. capsici* en frutos (A) y flores (B) de fresa a los tres días posteriores a su inoculación en plantas testigo (TO) y sometidas a tratamientos con hidrolatos al 100 % de *Tagetes coronopifolia* (H100C), *T. minuta* (H100M), *T. parryi* (H100P) y *T. terniflora* (H100T).

CONCLUSIONES

Los hidrolatos de las especies de *Tagetes* ensayadas contienen entre 46 y 72 % de monoterpenos y en menor cantidad algunos alcoholes (0-33 %), sesquiterpenos (0-27 %) y compuestos fenólicos (0-8 %). Aunque en la evaluación *in vitro* se observó efecto fungistático con algunos hidrolatos, este efecto no se mantuvo en la aplicación *in vivo*, solo la aplicación del hidrolato de *T. parryi* es efectivo como tratamiento preventivo contra *B. cinerea* en plantas de fresa en floración y fructificación.

LITERATURA CITADA

- Ángel-García C, Robledo-Buriticá J y Castaño-Zapata J. 2018. Comparación de métodos de inoculación de *Fusarium solani* F. sp. passiflorae en plántulas de maracuyá (*Passiflora edulis* F. *flavicarpa*). Revista U.D.C.A. Actualidad & Divulgación Científica 21(1):23-31. <https://doi.org/10.31910/rudca.v21.n1.2018.659>
- Awad HM. 2016. Integrated management of *Rhizoctonia* root rot disease infecting strawberry in Egypt. Egyptian Journal of Crop Protection 11(1):1-11. <https://doi.org/10.21608/ejcp.2016.229437>
- Barboza EA, Fonseca MEN, Boiteux LS and Reis A. 2016. First worldwide report of a strawberry fruit rot disease caused by *Phytophthora capsici* isolates. The American Phytopathological Society (APS) 101(1). <https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0864-PDN>
- Bárceñas-Santana D, Guillén-Sánchez D, Yazmín-Basaldua C, Ramos-García ML y Valle-La Paz M. 2019. Etiología de la secadera de la Fresa (*Fragaria* spp.) en Morelos, México. Revista Mexicana de Fitopatología 37(3). <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1904-5>
- Barnett HL and Hunter BB. 1986. Taxonomy and Identification in Illustrated Genera of Imperfect Fungi (4th ed). American Phytopathological Society. St. Paul, Minnesota, USA. 234 p.
- Belabbés R, Dib MEA, Djabou N, Ilias F, Tabti B, Costa J and Muselli A. 2017. Chemical variability, antioxidant and antifungal activities of essential oils and hydrosol extract of *Calendula arvensis* L. from Western Algeria. Chemistry & Biodiversity 14(5):e1600482. <https://doi.org/10.1002/cbdv.201600482>
- Bhat GA, Rasool S, Shakeel-u-Rehman, Ganaie, MI, Qazi PH and Shawl AS. 2016. Seasonal variation in chemical composition, antibacterial and antioxidant activities of the essential oil of leaves of *Salvia officinalis* (Sage) from Kashmir, India. Journal of Essential Oil Bearing Plants 19(5):1129-1140. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2016.1211491>
- Boddy L. 2016. Pathogens of Autotrophs. Pp: 245-292. The Fungi (Third Edition). Academic press. <https://doi.org/10.1016/b978-0-12-382034-1.00008-6>
- Boyras N and Özcan MM. 2005. Antifungal effect of some spice hydrosols. Fitoterapia 76(7-8): 661-665. <https://doi.org/10.1016/j.fitote.2005.08.016>
- Boyras N and Özcan MM. 2006. Inhibition of phytopathogenic fungi by essential oil, hydrosol, ground material and extract of summer savory (*Satureja hortensis* L.) growing wild in Turkey. International Journal of Food Microbiology 107(3):238-242. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2005.10.002>
- D'Amato S, Serio A, López CC and Paparella A. 2018. Hydrosols: Biological activity and potential as antimicrobials for food applications. Food Control 86:126-137. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2017.10.030>
- Deng S, Ma X, Chen Y, Feng H, Zhou D, Wang X, Zhang Y, Zhao M, Zhang J, Daly P and Wei L. 2022. LAMP Assay for Distinguishing *Fusarium oxysporum* and *Fusarium commune* in Lotus (*Nelumbo nucifera*) Rhizomes. Plant Disease 106(1):231-246. <https://doi.org/10.1094/pdis-06-21-1223-re>
- Dhifi W, Bellili S, Jazi S, Bahloul N and Mnif W. 2016. Essential oils chemical characterization and investigation of some biological activities: A critical review. Medicines 3(4):25. <https://doi.org/10.3390/medicines3040025>
- Díaz-Cedillo F y Serrato-Cruz MA. 2011. Composición del aceite esencial de *Tagetes parryi* A. Gray. Revista Fitotecnia Mexicana 34(2):145-148. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S0187-73802011000200013&script=sci_abstract
- Díaz-Cedillo F, Serrato-Cruz MA, de la Cruz-Marcial J, Sánchez-Alonso MG y López-Morales V. 2013. Compuestos mayoritarios del aceite esencial en órganos de una población de *Tagetes coronopifolia* Willd. Revista Fitotecnia Mexicana 36(4):405-411. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0187-73802013000400006
- Espejo QF, Espinosa RR, Puente IM, Cupull SR and Rodríguez GM. 2010. Allelopathic effect of *Tagetes erecta* L. and *Terminalia catappa* L. on *Rhizoctonia solani* (Kühn). Centro Agrícola 37(2):89-92. <https://biblat.unam.mx/hevila/Centroagricola/2010/vol37/no2/13.pdf>
- Golzar H, Phillips D and Mack S. 2007. Occurrence of strawberry root and crown rot in western Australia. Australasian Plant Disease Notes 2(1):145. <https://doi.org/10.1071/dn07057>

- González-Velasco HE, Pérez-Gutiérrez MS, Alonso-Castro AJ, Zapata-Morales JR, Del Carmen Niño-Moreno P, Campos-Xolalpa N and González-Chávez MM. 2022. Anti-inflammatory and antinociceptive activities of the essential oil of *Tagetes parryi* A. gray (Asteraceae) and Verbenone. *Molecules* 27(9):2612. <https://doi.org/10.3390/molecules27092612>
- Gutiérrez B, González MS y Salih LA. 2006. Caracterización de aislamientos de *Rhizoctonia solani* Kühn que inducen pudriciones radicales en cultivares de caraota (*Phaseolus vulgaris* L.). *Bioagro* 18(1):063-072. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=2158715>
- Hill DCDK. 2022. Manual de química de aceites esenciales dōTERRA (2da edición). 82 p. <https://media.doterra.com/us/es/brochures/essential-oil-chemistry-handbook.pdf>
- Hu W, Li C, Dai J, Cui H and Lin L. 2019. Antibacterial activity and mechanism of *Litsea cubeba* essential oil against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* (MRSA). *Industrial Crops and Products* 130:34-41. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2018.12.078>
- Hudagula H, Maeno N, Takahashi S, Yoshida K, Ohtani K, Fonatsu Y, Kondo R and Yamaguchi A. 2022. Antifungal activities of vineyard habitat wild yeast for grape graymold disease and its initial promotion of alcohol fermentation in spontaneous wine-making. *Research Square (Research Square)*. <https://doi.org/10.21203/rs.3.rs-2098543/v1>
- Inouye S, Takahashi M and Abe S. 2008. Inhibitory activity of hydrosols, herbal teas and related essential oils against filament formation and the growth of *Candida albicans*. *Nippon Ishinkin Gakkai Zasshi* 50(4):243-251. <https://doi.org/10.3314/jjmm.50.243>
- Kagezi G, Kucel P, Olal S, Pinard F, Seruyange J, Musoli P and Kangire A. 2015. *In vitro* inhibitory effect of selected fungicides on mycelial growth of ambrosia fungus associated with the black coffee twig borer, *Xylosandrus compactus* Eichhoff (Coleoptera: Curculionidae) in Uganda. *African Journal of Agricultural Research* 10(23):2322-2328. <https://doi.org/10.5897/AJAR12.1705>
- Karimian P, Kavooosi G and Amirghofran Z. 2014. Anti-oxidative and anti-inflammatory effects of *Tagetes minuta* essential oil in activated macrophages. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 4(3):219-227. [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(14\)60235-5](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(14)60235-5)
- Koike ST and Gordon TR. 2015. Management of *Fusarium* wilt of strawberry. *Crop Protection* 73:67-72. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2015.02.003>
- Labadie C, Cerutti C, and Carlin F. 2016. Fate and control of pathogenic and spoilage micro-organisms in orange blossom (*Citrus aurantium*) and rose flower (*Rosa centifolia*) hydrosols. *Journal of Applied Microbiology* 121(6):1568-1579. <https://doi.org/10.1111/jam.13293>
- Larios-Palacios OE, López-Vázquez ÉY, Rodríguez AC, De Jesús Ruiz-Espinoza F, Solano-Vidal R y Serrato-Cruz MA. 2020. Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11(3):593-606. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.2077>
- Leroux P. 2007. Chemical Control of *Botrytis* and its Resistance to Chemical Fungicides. In: Elad, Y., Williamson, B., Tudzynski, P., Delen, N. (eds) *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer, Dordrecht. https://doi.org/10.1007/978-1-4020-2626-3_12
- Leslie JF and Summerell BA. 2006. A Brief History of *Fusarium* Taxonomy: The *Fusarium* laboratory manual. Pp:79-86. Wiley Online Library <https://doi.org/10.1002/9780470278376.ch8>
- Lima B, Agüero MB, Zygodlo JA, Tapia A, Solis CM, De Arias AR, Yaluff G, Zacchino S, Feresin GE and Schmeda-Hirschmann G. 2009. Antimicrobial activity of extracts, essential oil and metabolites obtained from *Tagetes mendocina*. *Journal of the Chilean Chemical Society* 54(1). <https://doi.org/10.4067/s0717-97072009000100016>
- Lizarraga E, Mercado MI, Galvez C, Ruiz AI, Ponessa GI and Catalan CAN. 2017. Morpho anatomical characterization and essential oils of *Tagetes terniflora* and *Tagetes minuta* (Asteraceae) growing in Tucumán (Argentina). *Boletín de la Sociedad Argentina de Botánica* 52(1):55-68. http://www.scielo.org.ar/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1851-23722017000100006
- Macías DR, Grijalva CRL, Núñez RF, Robles CF y López CA. 2016. Eficiencia de diferentes fungicidas en el control de la pudrición rosada en cebolla. *Revista Mexicana De Ciencias Agrícolas* 7(8):1933-1943. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2007-09342016000801933
- Nelson PE, Toussoun TA and Marasas WFO. 1983. *Fusarium* species. An illustrated manual for identification. The Pennsylvania State University. 193 p. https://books.google.com.mx/books/about/Fusarium_Species.html?id=qJIMAQAAMAAJ&redir_esc=y
- Odak I., Lukic T and Talić S. 2018. Impact of storage conditions on alteration of juniper and immortelle essential oils. *Journal of Essential Oil Bearing Plants* 21(3):614-622. <https://doi.org/10.1080/0972060x.2018.1489309>

- Plancarte AS, Alvarado GR, Pavía YLF, Pedraza-Santos ME, Pérez LL, Celaya MD y Pavía SPF. 2017. Protocolos de aislamiento y diagnóstico de *Phytophthora* spp.: enfoque aplicado a la investigación. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 8(8):1867-1880. <https://doi.org/10.29312/remexca.v8i8.708>
- Pons-Hernández JL, Guerrero-Aguilar BZ, González-Chavira MM, González-Pérez E, Villalobos-Reyes S y Muñoz-Sánchez CI. 2020. Variabilidad fenotípica de aislados de *Phytophthora capsici* en Guanajuato. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas* 11(8):1891-1901. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i8.2618>
- Raja HA, Miller AN, Pearce CJ and Oberlies NH. 2017. Fungal identification using molecular tools: a primer for the natural products research community. *Journal Of Natural Products* 80(3):756-770. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.6b01085>
- Rajeswara RBR, Kaul PN, Bhattacharya AK, Rajput DK, Syamasundar KV and Ramesh S. 2006. Comparative chemical composition of steam-distilled and water-soluble essential oils of South American marigold (*Tagetes minuta* L.). *Journal of Essential Oil Research* 18(6):622-626. <https://doi.org/10.1080/10412905.2006.9699184>
- Rajeswara RBR. 2013. Hydrosols and water-soluble essential oils: their medicinal and biological properties. In: *Recent progress in medicinal plants: Essential oils I*. Studium Press LLC, Houston, USA. 25 p. https://www.researchgate.net/publication/270281550_Hydrosols_and_Water-Soluble_Essential_Oils_Their_Medicinal_and_Biological_Properties
- Salehi B, Valussi M, Morais-Bragam MFB, Carneiro JNP, Leal ALAB, Coutinho HDM, Vitalini S, Kręgiel D, Antolak H, Sharifi-Rad M, Silva NCC, Yousaf Z, Martorell M, Iriti M, Carradori S and Sharifi-Rad J. 2018. *Tagetes* spp. essential oils and other extracts: chemical characterization and biological activity. *Molecules* 23(11):2847. <https://doi.org/10.3390/molecules23112847>
- Santos-Gomes PC and Fernandes-Ferreira M. 2001. Organ- and season-dependent variation in the essential oil composition of *Salvia officinalis* L. cultivated at two different sites. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 49(6):2908-2916. <https://doi.org/10.1021/jf001102b>
- Serrato CMA. 2014. El Recurso genético cempoalxóchitl (*Tagetes* spp.) de México (Diagnóstico). Universidad Autónoma Chapingo SAGARPA-SNICS-SINAREFI. Chapingo, Estado de México. 183p. https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/225091/El_recurso_gen_tico_del_cempoalxochitl_tagetes_spp_de_mexico_diagnostico_pdf
- Serret-López M, Espinosa-Victoria D, Gómez-Rodríguez O y Delgadillo-Martínez J. 2016. Tolerancia de plantas de fresa (*Fragaria × ananassa* Duch.) premicorrizadas con *Rhizophagus intraradices* e inoculadas con PGPR's a *Phytophthora capsici*. *Agrociencia* 50(8):1107-1121. https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952016000801107&script=sci_abstract
- Shuping DSS and Eloff JN. 2017. The use of plants to protect plants and food against fungal pathogens: a review. *African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines* 14(4):120-127. <https://doi.org/10.21010/ajtcam.v14i4.14SIAP>, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. 2022. Avance de siembras y cosechas. <https://www.gob.mx/siap/acciones-y-programas/produccion-agricola-33119> (consulta, septiembre 2023).
- Stević T, Berić T, Šavikin K, Soković M, Gođevac D, Dimkić I and Stanković S. 2014. Antifungal activity of selected essential oils against fungi isolated from medicinal plant. *Industrial Crops and Products* 55:116-122. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2014.02.011>
- Taglienti A, Donati L, Ferretti L, Tomassoli L, Sapienza F, Sabatino M, Di Massimo G, Fiorentino S, Vecchiarelli V, Nota P and Ragno R. 2022. *In vivo* antiphytoviral activity of essential oils and hydrosols from *Origanum vulgare*, *Thymus vulgaris*, and *Rosmarinus officinalis* to control zucchini yellow mosaic virus and tomato leaf curl New Delhi virus in *Cucurbita pepo* L. *Frontiers in Microbiology* 13:840893. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.840893>
- Terrones-Salgado J, Nieto-Ángel D, Nava-Díaz C, Téliz-Ortíz D, García-Velasco R, Vallejo-Pérez MR y Sánchez-García P. 2019. *Botrytis cinerea* causante del moho gris en frutos de zarzamora en México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37(3):365-382. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1906-1>
- Tisserand R and Young R. 2014. Essential Oil Safety. Pp: 5-22. In: *Essential oil composition*. <https://doi.org/10.1016/b978-0-443-06241-4.00002-3>
- Toju H, Tanabe AS, Yamamoto S and Sato H. 2012. High-coverage ITS primers for the DNA-based identification of Ascomycetes and Basidiomycetes in environmental samples. *PloS One* 7(7): e40863. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0040863>
- Uddin J, Humam A, Yahya IA, Ghulam MK and Syed GM. 2023. Ginger essential oil: Chemical composition, extraction, characterization, pharmacological activities, and applications. *Essential Oils, Extraction, Characterization and Applications* 345-376. <https://doi.org/10.1016/B978-0-323-91740-7.00014-1>

- Vega-López M y Granados-Montero M. 2023. Eficacia de benomil y folpet sobre *Fusarium oxysporum* patógeno de la fresa. Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas 14(3):485-490. <https://doi.org/10.29312/remexca.v14i3.3253>
- Vuko E, Dunkić V, Ruščić M, Nazlić M, Mandić N, Soldo B, Šprung M and Fredotović Ž. 2021. Chemical composition and new biological activities of essential oil and hydrosol of *Hypericum perforatum* L. ssp. veronense (Schrank) H. Lindb. Plants (Basel) 10(5):1014. <https://doi.org/10.3390/plants10051014>
- Wang X, Li K, Xu S, Duan Y, Wang H, Yin C, Chen X, Mao Z and Kong X. 2022. Effects of different forms of *Tagetes erecta* biofumigation on the growth of apple seedlings and replanted soil microbial environment. Horticulturae 8(7):633. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8070633>
- Weising K, Nybom H, Wolff K and Kahl. 2005. DNA Fingerprinting in Plants: Principles, Methods and Applications (2nd edn). Boca Raton: CRC Press. <https://doi.org/10.1093/aob/mcj057>
- Yann-Olivier H, Abril-Sierra MA, Sequeda-Castañeda LG, Bonnafous C and Raynaud C. 2018. Evaluation of combinations of essential oils and essential oils with hydrosols on antimicrobial and antioxidant activities. Journal of Pharmacy & Pharmacognosy Research 6(3):216-230. <https://jppres.com/jppres/>
- Zatla AT, Dib MEA, Djabou N, Ilias F, Costa J and Muselli A. 2017. Antifungal activities of essential oils and hydrosol extracts of *Daucus carota* subsp. Sativus for the control of fungal pathogens, in particular gray rot of strawberry during storage. Journal of Essential Oil Research 29(5):391-399. <https://doi.org/10.1080/10412905.2017.1322008>
- Zubrod JP, Bundschuh M, Arts G, Brühl CA, Imfeld G, Knäbel A, Payraudeau S, Rasmussen JJ, Rohr JR, Scharmüller A, Smalling KL, Stehle S, Schulz R and Schäfer RB. 2019. Fungicides: an overlooked pesticide class? Environmental Science & Technology 53(7):3347-3365. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b04392>