

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN

FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS



"ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS CONTRA
DIFERENTES ESPECIES DE *Fusarium* CAUSANTES DEL MAL DEL ALMÁCIGO"

Por

Q.B.P. Carlos Santiago Hernandez Iglesias

Como requisito para obtener el grado de maestro en ciencias con orientación
en microbiología

2023

ACTIVIDAD ANTIFUNGICA DE EXTRACTOS DE PLANTAS
CONTRA DIFERENTES ESPECIES DE *Fusarium*
CAUSANTES DEL MAL DEL ALMÁCIGO

Comité de Tesis



Dr. Eduardo Sánchez García
Director de Tesis



Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna
Vocal



D ra. Catalina Leos Rivas
Vocal



Dr. Aberlado Chávez Montes
Vocal



M.C. Raúl Asael Rodríguez Villareal
Vocal

Subdirección de Posgrado

AVISO DERECHOS DE AUTOR

DERECHOS RESERVADOS © PROHIBIDA SU REPRODUCCIÓN TOTAL O PARCIAL

Todo el material contenido en esta Tesis está protegido, el uso de imágenes, fragmentos de videos, y demás material contenido que sea objeto de protección de los derechos de autor, será exclusivamente para fines educativos e informativos y deberá citar la fuente donde se obtuvo mencionando al autor o autores.

AGRADECIMIENTO

Primeramente, agradecer el apoyo de CONACYT por permitirme terminar esta investigación que sin su apoyo y respaldo de la institución no podría a ver terminado con el número de apoyo 1151091.

Agradezco a la Facultad de Ciencias Biológicas por formarme como QBP y por medio de su excelente equipo administrativo y docente ahora puedo terminar mi maestría en ciencias.

También agradecer al laboratorio de Química Analítica por siempre recibirme con los brazos abierto y darme la oportunidad de poder realizar mi investigación.

Quiero agradecer la dirección y el apoyo del Doctor Eduardo Sánchez García que a base de confianza y respeto me permitió no solamente realizar esta maestría bajo su dirección, sino que también me permitió desarrollarme como investigador, le agradezco enormemente su apoyo y confianza en mi persona para llevar a cabo este proyecto.

Agradecer a la Doctora Catalina Rivas Morales jefa del laboratorio de química analítica por permitirme ser parte de mi comité de tesis y asesorarme durante mi tiempo de trabajo en el laboratorio.

Al Dr. Raúl Asael Rodríguez Villareal por siempre estar disponible para ayudarme y asesorarme, al Dr. David Gilberto por encaminarme en realizar una maestría en ciencias y siempre buscar mejorar no solo como estudiante si no como investigador, Dr. Abelardo Chávez Montes por siempre darme consejos que necesitaba, Dr. Carlos Eduardo Hernández Luna gracias por siempre mostrar interés en mi trabajo y mi desarrollo como investigador y a la Dra. Catalina Leos Rivas por siempre brindarme su apoyo a lo largo de la investigación, a todo mi comité de tesis gracias por permitirme poder su confianza y apoyo.

DEDICATORIAS

Primero que nada, agradecer a Dios por esta investigación y por poder terminarla en tiempo y forma.

Quiero agradecer a mis abuelos que siempre me han apoyado con amor y comprensión y que siempre han estado conmigo en los momentos de necesidad, gracias a mi abuelo Edmundo Luis iglesias que, a pesar de no poder estar en estos momentos de felicidad, sabes que siempre te extrañare.

A mi padre el Arq. Rene Hernandez Domínguez, que me enseñaste que con tiempo y dedicación todo es posible, gracias por siempre estar al pendiente de mí y mis proyectos, realmente es poco el espacio que tengo para agradecerte, gracias por ayudarme a ser el hombre que soy hoy en día y ayudarme a ser el investigador que quiero llegar a ser, es gracias a tus enseñanzas como tu apoyo en vida diaria que he podido llegar aquí. Mi madre que con amor y paciencia siempre estuviste a mi lado, gracias por tanto amor que me diste, sé que no fue fácil, batallaste conmigo y ahora estoy feliz de ser ese investigador que siempre supiste que seria, gracias madre por siempre estar conmigo. A mi hermana que estoy feliz de verte cumplir tus metas y sueños se que siempre podre contar con tu apoyo y amor. a mi novia la QBP Rosa Elizabeth Santo Chávez por acompañarme a lo largo de este viaje y siempre motivarme a seguir adelante, gracias por todo tu amor, te agradezco de todo corazón tu compañía y apoyo.

Quiero agradecer a mis compañeros del posgrado en ciencias con orientación en microbiología que hicieron más ameno el transcurso de mi maestría, que sin su amistad y apoyo esta maestría no hubiera sido lo mismo sin ellos,

ÍNDICE

RESUMEN	i
INTRODUCCIÓN	3
ANTECEDENTES	5
JUSTIFICACIÓN	13
HIPÓTESIS	14
OBJETIVOS DEL TRABAJO	14
MATERIALES Y MÉTODOS	15
RESULTADOS	18
DISCUSION	26
CONCLUSION	29
BIBLIOGRAFÍAS	30

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Halos de inhibición de los extractos metanólicos frente a <i>Fusarium</i> spp.	18
Tabla 2	Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF).	21
Tabla 3	Porcentajes de germinación.	23

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Inhibición del <i>Fusarium</i> spp. de los extractos metanólicos de <i>Mangifera indica</i> , <i>Dracaena Fragrans</i> .	19
Figura 2	Porcentaje de mortalidad en semillas inoculadas después de 18 d de incubación, comparadas contra semillas tratadas con el extracto de <i>Mangifera indica</i> .	23
Figura 3	Porcentaje de mortalidad en semillas inoculadas después de 18 d de incubación, tratadas y sin tratar con el extracto de <i>Dracaena fragrans</i> .	24
Figura 4	Imagen A semillas tratadas con el extracto de <i>Mangifera indica</i> , imagen B semillas no tratadas e inoculadas con las cepas de <i>Fusarium</i> .	23
Figura 5	Efecto de pudrición blanda en plántula de <i>Pinus engelmannii</i> .	25
Figura 6	Semillas tratadas con el extracto de <i>Dracaena fragrans</i> y semillas no tratadas e inoculadas con las cepas de <i>Fusarium</i> .	25

LISTA DE SÍMBOLOS Y ABREVIATURAS

PDA	Agar papa Dextrosa
POX	Peroxidasa
CAT	Catalasa
SOD	súper óxido dismutasa
μL	microlitros
mL	Mililitros
mg/mL	Miligramos sobre mililitros
CMI	Concentración Mínima Inhibitoria
CMF	Concentración Mínima Fungicida
mm	Milímetros
pH	Concentración de iones de hidrógeno
d	días

RESUMEN

El mal de almacigo o “damping-off” causada por *Fusarium*, es una enfermedad que ataca cultivos en etapas tempranas de crecimiento, especialmente durante la etapa de germinación, es causada por un complejo de hongos donde destaca el género *Fusarium* spp. Esta enfermedad provoca pudrición de semillas y marchitamiento de plántulas de pino en etapa de crecimiento. Representa un punto crítico para los proyectos de reforestación a nivel nacional, debido a que causa severas pérdidas en la producción de pinos, reportándose pérdidas de hasta un 60% de la producción total. El objetivo del presente estudio es evaluar el efecto de extractos de subproductos vegetales, plantas aromáticas y medicinales para el control de *Fusarium* spp. aislados de plántulas de pino con síntomas de la enfermedad. Para lograr este objetivo se pretende obtener los extractos con solventes con diferente grado de polaridad, para determinar de forma preliminar las propiedades antifúngicas que poseen los extractos, esto mediante las técnicas de difusión en pozo en agar. Posteriormente se determinará la concentración mínima inhibitoria y fungicida de los extractos utilizando la técnica de dilución en microplaca, posteriormente se llevarán a cabo pruebas de efectividad de los extractos en condiciones simuladas de invernadero, para esto se inocularon semillas de pino con las cepas de *Fusarium* spp y se evaluó el efecto de los extractos sobre el establecimiento de la enfermedad. Nuestros resultados de inhibición preliminar indican que los extractos metanólicos de *Mangifera indica* y *Dracaena fragrans* fueron los mostraron actividad antifúngica, contra las cepas de *Fusarium* spp. Con respecto a la concentración mínima inhibitoria y fungicida se obtuvieron rangos de concentración de 52.5 ± 25 mg/mL a 166.67 ± 51.64 mg/mL, dependiendo la cepa fúngica y del extracto. Por último, observándose una disminución considerable del porcentaje de mortalidad en plantulas tratadas con los extractos metanolicos de *Mangifera indica* y *Dracaena fragrans*.

ABSTRACT

Damping-off is a disease caused by a complex of fungi, with *Fusarium* spp. being prominent; It attacks crops in early stages of growth, especially during the germination phase. It leads to seed rotting and wilting of pine seedlings in their growth stage. It represents a critical point for reforestation projects at a national level, as it causes severe losses in pine production, with reported losses of up to 60% of the total production. The objective of this study is to evaluate the effect of extracts from plant by-products, aromatic plants and medicinal plants for the control of *Fusarium* spp. isolated from pine seedlings showing disease symptoms. To achieve this goal, extracts with solvents of different polarities will be obtained to preliminarily determine the antifungal properties of the extracts using techniques such as paper filter diffusion and agar well methods. Subsequently, the minimum inhibitory and fungicidal concentration of the extracts will be determined using the microplate dilution technique. Effectiveness tests of the extracts will be conducted under simulated greenhouse conditions by inoculating pine seeds with *Fusarium* spp. strains and evaluating the effect of the extracts on the disease's establishment. Our preliminary inhibition results indicate that the methanolic extracts of *Mangifera indica* and *Dracaena fragrans* showed antifungal activity against *Fusarium* spp. strains. Regarding the minimum inhibitory and fungicidal concentration, concentration ranges of 52.5 ± 25 mg/mL to 166.67 ± 51.64 mg/mL were obtained, depending on the fungal strain and the extract. Finally, a significant decrease in the mortality percentage was observed in seedlings treated with the methanolic extracts *Mangifera indica* and *Dracaena fragrans*.

1. INTRODUCCIÓN

La supervivencia inicial y el crecimiento de pinos utilizados en viveros para proyectos de reforestación depende principalmente del estado de salud de las semillas y de las plántulas en su primer año de cultivo (Cetina *et al.*, 2002). Con respecto a esto, la enfermedad del mal del almacigo (damping-off) se presenta como uno de los principales problemas fitosanitarios más comunes y graves debido al daño directo a la producción a pequeña y gran escala, donde se ha reportado en algunos casos, hasta una pérdida del 100% de la producción de plántulas, con un importante progreso en cortos periodos de tiempo (Kacprzak *et al.*, 2001). El mal del almacigo se presenta precisamente en el almácigo, que por definición es una estructura fija o portátil, diseñada para la germinación y crecimiento inicial de las plantas (NMX-AA-170-SCFI-2014). El almácigo debe estar preparado para depositar la semilla y así poder proporcionar los máximos cuidados durante la etapa de pre-germinación y pos-emergencia de la plántula (Aguilar, 1990). De allí el nombre de la enfermedad conocida como “mal de almaciguera o almacigo”. Esta importante enfermedad también es conocida como mal de los semilleros, marchitamiento fúngico, mal de la pudrición blanda y “Damping off”. Esta enfermedad se puede presentar en las primeras semanas del crecimiento de la plántula, cuando éstas comienzan a emerger; la sintomatología varía de acuerdo al periodo de crecimiento de la plántula, ya que esta enfermedad se puede establecer antes de la germinación de la semilla (pre-emergencia), provocando marras de nascencia por la podredumbre total de la radícula, además en la semilla, el micelio invade y ocasiona manchas en las cubiertas externas, causando una severa disminución en la germinación de plántulas debido a la muerte del embrión (Cisneros, 2004). mientras que el Damping off post-emergencia de 0 a 3 meses, la plántula emerge, pero es invadida por el hongo a través de la radícula, hasta el hipocótilo, pudriendo el cuello radicular, en este punto presentara un decoloración pardo-rojiza de sus hojas y cotiledonares sin llegar a producirse la defoliación, generando la clásica caída al suelo o pudrición blanda Soldevilla, C., 1995. La sintomatología más común que se presenta en viveros forestales es la presencia de una coloración amarilla de las puntas del follaje, posteriormente la marchites y finalmente la muerte de las plántulas (FDTA-Valles, 2002).

El control de mal del almácigo se basa en la utilización de antifúngicos de origen químico por ejemplo los antifúngicos más utilizados son: el sulfato de cobre pentahidratado, Azoxystrobin, Clorotalonil, Tiabendazol, Etridiazol Thiofanato, Fosetyl-A1, Ferbam, Metil isotiacinato, Propamocarb y Carboxin los cuales, en ocasiones se han utilizado indiscriminadamente (Alburqueque 2018). Es importante mencionar que el uso desmedido de estos antifúngicos representa un severo riesgo para la salud humana y el medio ambiente, además puede afectar el desarrollo de microorganismos benéficos y propicia la aparición de cepas resistentes (Abdel-Monahim *et al.*, 2011).

Debido a lo anterior, en años recientes se han buscado alternativas al control químico, buscando estrategias que sean accesibles, y que no presenten los efectos adversos antes mencionados (Naeini *et al.*, 2010). Con respecto a esto, diversos estudios revelan que la actividad biológica de algunos metabolitos secundarios de plantas medicinales y sub productos pueden ofrecen una alternativa efectiva en el control de agentes fitopatógenos causantes de una amplia gama de enfermedades (Zaker y Mosalanejad, 2010). En diversos estudios realizados en distintas partes del mundo enfocado a encontrar y evaluar diversos extractos de plantas y subproductos para el control y tratamiento enfermedades en plantas de interés comercial causadas por hongos fitopatógenos de diversos géneros fúngicos como *Fusarium*, han revelado que los compuestos biológicamente activos presentes en los extractos son los responsables directos de la actividad antifúngica utilizando extractos de diferentes polaridades de *Azadirachta indica* encontraron que los compuestos activos tales como nimbidina, nimbidato de sodio, nimbolida, gedunina, azadirachtina, ácido gálico, margolona, polisacáridos y terpenos son los que le proporcionan una actividad antifúngica importante (Ansari, 1995). Es por eso que en la presente investigación se evaluaron extractos de *Mangifera indica* y *Dracaena fragrans* para coadyuvar en el control de diferentes especies de *Fusarium* spp causantes de la enfermedad conocida como mal del almácigo o Damping-off.

2. ANTECEDENTES

La superficie forestal en México es aproximadamente de 138 millones de hectáreas, de los cuales 34 millones corresponden a superficie arbolada por bosques, selvas, manglares y otras asociaciones vegetales (INEGI, 1983). Lamentablemente México ocupa uno de los primeros lugares en tasas de deforestación y pérdida de zonas forestales en el mundo, se estima que la tasa de deforestación fluctúa entre 75,000 ha/año a cerca de 1.98 millones de hectáreas por año (Guirado López, C. O. 2011). Encontrando que las causas directas son es el incremento de la frontera agrícola y ganadera, y la expansión de áreas urbanas e industriales, así como tala ilegal junto con presencia de plagas y enfermedades en árboles y de forma indirecta se encuentran los factores económicos, políticos, tecnológicos, culturales y demográficos, así como la introducción de especies invasoras (CONAFOR 2013). por ello los proyectos de reforestación han tomado gran relevancia actualmente. México, en la búsqueda de mejorar preparación ha desarrollado la ENAREDD que sirve como Estrategia Nacional de Reducción de Emisiones por Deforestación y Degradación de los bosques, esta buscara desacelerar, frenar y revertir la pérdida de cubierta forestal (CONAFOR 2013) Y para ello se implementan más de 90 especies de coníferas; de las cuales 43 son endémicas y 20 pertenecen al género *Pinus*, (Gernandt y Pérez-de la Rosa, 2014; Pérez y Ceja-Romero, 2019; Conafor, 2019). La preservación de los recursos forestales en México ha cambiado en los últimos años, y se ha hecho hincapié en los programas de reforestación y en la restauración de ecosistemas forestales a través de acciones encaminadas a preservando el suelo y el agua (Rodríguez Trejo, 2008; Martínez Salvador & Prieto Ruiz, 2011). De acuerdo con la Plan Estratégico Forestal de México 2025, denominado “Bosque Sustentable” el desarrollo es un objetivo prioritario a mediano y largo plazo, y las políticas y programas establecidos, priorizan el establecimiento de plantaciones para fines de reforestación (CONAFOR, 2001). Como resultado de estas políticas, varias especies de árboles, incluido el *Pinus engelmannii* (pino Apache) siendo de interés económico por su uso para muebles y construcción, molduras, pulpa para papel, madera aserrada, postes y para la ebanistería, siendo también utilizado por su resistente a las heladas así, por ello se plantaron en un área que cubría aproximadamente 220 mil hectáreas en el período comprendido entre al año 2000 al 2011 (Burney,2015). Sin embargo, sólo un año después del establecimiento de la plantación, el promedio anual de la

tasa de mortalidad fue cercana al 45%, esto como resultado de diversos factores, en particular la calidad deficiente de las plántulas (Magaña Torres *et al.* al., 2007).

En México, la producción de plantas forestales está distribuida en 157 viveros y para el año de 2019, se reportó una producción total de 79 millones de plantas de 43 especies, entre ellas el Cedro blanco (*Cupressus luistonica*), Oyamel (*Abies religiosa*), Pinabete (*Picea chihuahuana*) y Sabino o Tásate (*Juniperus deppeana*), con respecto a las especies de pinos las especies más utilizadas en México son: Pino Ocote (*P. oocarpa*), Pino Lacio (*P. pseudostrobus*), Pino Chamaite (*P. montezumae*), Pino Escobetón (*P. michoacana*), Pino Apache (*P. engelmannii*) y Pino de Durango (*P. durangensis*). (Conafor, 2019). Una de las especies de mayor utilidad en los proyectos de reforestación es *Pinus engelmannii*, el cual se encuentra distribuido principalmente en los estados de Durango, Chihuahua, Sinaloa, Zacatecas y Sonora (Ávila-Flores *et al.*, 2016).

El cultivo de plantas en viveros forestales está regulado por la Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2016 en donde entre otras cosas, se establecen los lineamientos para la producción de plantas forestales en vivero, así como las características con las que deben cumplir las semillas que se van a utilizar. A esto se le conoce como control en el origen, y está establecido con base en la recomendación de la Asociación Internacional de Ensayos de Semillas (ISTA). De este modo se establecen las especificaciones mínimas con las que debe cumplir el material vegetal, así como los cuidados previos al manejo de las semillas previo a su plantado en campo.

Si bien el control y cuidado de las coníferas es de gran importancia para diversas organizaciones gubernamentales y privadas, las fitopatologías son comunes en muchas especies forestales, y pueden ser causadas por múltiples microorganismos como los oomicetos y los hongos filamentosos. El establecimiento de dichas fitopatologías se ven favorecidas por diversos factores como la sobrepoblación, riego pesado, suelos con mal drenaje, ambiente nublado y ventilación pobre Cibrián (2008). Los géneros más comunmente asociados a el mal del almácigo son *Phytophthora*, *Pythium*, *Fusarium* y *Rhizoctonia* (Camporota y Perrin, 1998; Gordon *et al.*, 2015).

Fusarium es un ascomiceto filamentosos que presenta una amplia distribución, es considerado cosmopolita, llegándose a encontrar en ambientes con temperaturas bajo cero y/o en zonas

desérticas (Mendoza *et al.*, 2003). *Fusarium* es responsable de un alto porcentaje del daño de plantas forestales debido a que causa la secadera y pudrición de la raíz que están siendo cultivadas en viveros, predominando en las especies de pinos como *Pinus pseudostrabus*, *P. engelmannii*, *P. devoniana*, *P. ayacahuite*, *P. greggii*, *Pinus patula*, *P. montezumae*, *P. cembroides*, *P. douglasiana*, *P. durangensis*, *P. cooperi*, *P. arizonica*, *P. eldarica*, teniendo mayor incidencia en con *P. greggii*, *P. engelmannii* y *P. montezumae* (García Díaz, S. E. (2017); Además, las especies de *Fusarium* se encuentran entre los patógenos de plantas más comunes por la alta versatilidad de su establecimiento y de su crecimiento, por lo que, muchas especies de plantas llegan a sufrir al menos una enfermedad producida por este género (Leslie y Summerell, 2006). Este hongo filamentoso, puede sobrevivir en el suelo en ausencia de sus anfitriones, como micelio o como esporas, si se llega a encontrar una plántula cerca, las esporas iniciaran la infestación que puede iniciar tanto en las raíces o en el tallo como en partes visibles de la plántula por encima del suelo (Ma *et al.*, 2013).

Fusarium puede causar daño en todas las etapas del desarrollo de la plánta, puede atacar las plantas en su follaje, raíces y se ha reportado que se han detectado en semillas de especies forestales en vivero, provocando una gran cantidad de síntomas, dañando el desarrollo de la plántula o bien matando a la semilla (Figueroa-Rivera *et al.*, 2010; Buechel, 2018). De hecho, las especies de *Fusarium* causantes del mal de almacigo o damping off poseen una serie de pasos a seguir para la infección; estos penetraran por la raíz, buscando colonizar el tallo de la planta y así poder utilizar el sistema vascular, *F. oxysporum* penetra por la raíz de forma asintomática; y proseguirá colonizando el tejido vascular, lo que iniciara el debilitamiento, necrosis y clorosis de las partes aéreas de la plántula en cuestión (Ma *et al.*, 2013).

En los viveros, las plantas son afectadas por una amplia variedad de especies de *Fusarium* spp; debido a que es uno de los géneros más comunes pero siendo de los más dañinos por su amplia capacidad de infección la gran adaptación en su desarrollo; A nivel nacional se ha reportado un alto porcentaje de muertes en viveros forestales, hasta el punto que se reportado una pérdida desde el 30% al 100 % de la producción (Cibrián 2008); además, provoca morbilidad en la plantas dejándolas gravemente afectadas, provocando que las plantas salgan de los viveros con infecciones en raíces, tallos y puntas, derivando en un menor desarrollo inferior al necesario para poder sobrevivir, derivando en que esta planta tendrá una menor

probabilidad de supervivencia en campo y afectando considerablemente los estándares necesarios para la producción en viveros (Rueda-Sánchez, 2014). Las especies de *Fusarium* con mayor incidencia en pino son: *Fusarium oxysporum*, *F. aquaeductuum*, *F. longipes*, *F. rigidiuscula*, *F. solani*, *F. chlamydosporum*, *F. culmorum*, *F. lateritium* y *F. moniliforme* (Guarneros, 1998).

Para el cuidado y control de las múltiples enfermedades que acechan a los cultivos diariamente, se busca aplicar múltiples agentes antimicrobianos como lo son los plaguicidas, estos plaguicidas pueden ser cualquier sustancia o mezcla de sustancias destinadas a prevenir, destruir o en algunos casos controlar cualquier plaga o agente dañino para los cultivos; El uso de plaguicidas se recomienda cuando se requiere realizar una acción preventiva o curativa de la enfermedad y debe ser implementada por personal capacitado en la aplicación de dicho compuesto (Vázquez C, 1981); sin embargo el manejo de productos químicos genera un riesgo, ya que son sustancias tóxicas que deben ser manejados y aplicados con las medidas de seguridad necesarias y por personal capacitado, debido a la alta probabilidad de problemas en la salud del personal, a su vez cabe la posibilidad de generar problemas ambientales e incluso dañar a las mismas plantas que fueron tratadas (García, 2011).

Si bien se espera que las plántulas germinen en un tiempo determinado para valorar su desarrollo, es muy común que, a los pocos días de la germinación de la semilla, aparezca un micelio blanco que infecta el nuevo tejido (Vázquez Ruiz 2014). El micelio puede matar las hojas en formación e incluso puede bajar al cuello de la plántula e infectar nuevas áreas (Seminis, 2020). Es importante mencionar que una vez que se muestren signos de la infección, la planta y posiblemente todo el almácigo, se da por perdido, debido a la rápida expansión del hongo en la plántula (Velásquez-Valle *et al.* 2007) En este punto resalta la importancia de que se trate a la semilla con un buen fungicida, como el Tiabendazol, en dosis de 1 gramo por cada litro de agua (Cibrián, 2008). Si bien es necesario controlar el complejo del mal de almacigo o Damping-off de manera rápida y efectiva, muchas veces los hongos llegan a presentar una gran resistencia a estos agentes antifúngicos por lo que se deben buscar nuevas alternativas para su control (Martínez R, 2000; Cibrián, 2008). Dentro de las opciones que se tienen para el cuidado y control de las semillas están los antifúngicos como el Thiram, Tolclofos metil, Azoxystrobin, que han mostrado buen efecto protector y para el caso del

control del Damping-off en viveros se cuenta con Iprodione, Etridiazol Thiofanato, Fosetyl-A1, Ferbam, Metil isotiacinato, Propamocarb, Carboxin, pero todos ellos tienen la desventaja de que aunque su uso está permitido, conllevan un riesgo importante en la salud humana y en el medio ambiente y se deben de suministrar de forma precisa y con los cuidados necesarios (Martínez R, 2000; Cibrián, 2008). Mas aún, debido al rápido crecimiento, adaptación y distribución de *Fusarium* cada vez es más probable que estos fungicidas aumentan la resistencia de los agentes fitopatógenos frente a los efectos fungicidas (Agrios, 2005).

Dane y Dalgic (2005) encontraron que el genotóxico del benomil en raíces de *Allium cepa* (cebolla) donde observaron que al ser expuestas o tratadas a diferentes concentraciones del benomil, observaron anomalías, en las divisiones de las células meristemáticas, siendo que estas alteraciones fueron detectadas en el huso mitótico y diversas alteraciones de la cariocinesis sin citocinesis, demostrando que los fungicidas sintéticos pueden llegar a dañar a las plantas que se quieren proteger. A su vez, en Suecia se descubrieron uno de los efectos negativos reportados para la aplicación de agentes químicos de forma descontrolada, ya que se menciona que los antifúngicos influyeron considerablemente en la biodiversidad de las especies nativas, Jonsson *et al.* (1990) menciona que el uso de ciertos agentes químicos ha afectado indirectamente a la población de perdices suecas. En diversos estudios mencionan la influencia de los agentes químicos tiene un efecto sobre la fertilidad de los suelos, al afectar indirectamente en la inhibición de la nitrificación mermando la fijación de oxígeno por las plantas y a su vez influyen negativamente en el microbioma del suelo que son causantes de la degradación la materia vegetal y del aprovechamiento de los nutrientes de la tierra (Torstensson, 1990). Además, el uso indebido de estos productos químicos ha producido una disminución en su eficacia y han permitido que los a múltiples agentes fitopatógenos desarrollen resistencia, lo que empeora el problema infecciones por estos agentes (Rauf, 2000).

Extractos de plantas

Debido a la problemática antes expuesta, se han buscado alternativas para controlar la enfermedad del mal del almácigo, mediante la utilización de compuestos antifúngicos de origen natural (Mesa (2019)). Los extractos de plantas destacan en este sentido, ya que en

general las plantas tienen un largo historial en el tratamiento de diversas enfermedades tanto en humanos como en animales domésticos. Cabe destacar que las plantas medicinales han mostrado tener un gran potencial para ser utilizadas como antifúngicos en diferentes sectores de interés comercial (Ribeiro A, 2010). Las plantas se han utilizado en la agricultura desde antes de la implementación de los compuestos sintéticos a la mitad del siglo pasado. Los primeros agroquímicos utilizados fueron polvos o extractos de plantas tales como *Nicotiana tabacum* (tabaco), el *Chrysanthemum* (crisantemo) y la implementación de la rotenona donde fueron implementadas para el control y eliminación de plagas (Montes, 2009). La idea detrás del descubrimiento de fungicidas obtenidos de plantas, se basa en su capacidad para sintetizar diversos conjuntos de metabolitos o compuestos secundarios, que son útiles para defender la planta contra el ataque de bacterias, hongos e insectos (Ahmad I, 2001). Además, el uso de productos vegetales contra diferentes agentes fitopatógenos, puede inhibir el desarrollo de la resistencia adquirida debido al uso desmedido de compuestos antifúngicos de origen sintético (Calvo M.A, 2011).

Los productos naturales de plantas son una alternativa más segura que los antifúngicos sintéticos debido a que muestran baja toxicidad humana y son considerados ecológicos (Brinker F, 1998). Los fungicidas a base de plantas pueden obtenerse a partir de las hojas o de cualquier parte de la planta, incluso se pueden obtener compuestos de interés de los subproductos obtenidos del proceso de la misma planta. (Seepe HA, 2021). Como generalmente los compuestos fitoquímicos con actividad biológica están presentes como una mezcla de múltiples compuestos orgánicos, los agentes fitopatógenos pueden ser afectados de diferentes formas. (Montes, 2009). Sahin *et al.* (2004) buscaron determinar la estructura o combinación del aceite esencial del orégano (*Origanum vulgare* spp), obteniendo como resultado la identificación de 62 compuestos activos, los componentes del aceite esencial se implementaron en combinación con anfotericina B que es implementada para el tratamiento de micosis contra diversas especies del género *Fusarium* como *acuminatum*, *oxysporum* y *tabacinum*, observando un efecto inhibitorio en el crecimiento de las cepas de *Fusarium* spp. A su vez Jasso, *et al* (2007) investigaron las propiedades antifúngicas de diversos extractos etanólicos de tres especies del género *Flourensia*, también conocida como la maravilla de campo, pero dependiendo de la especie puede variar el nombre, probándola frente a *F. oxysporum*, donde el desarrollo del micelio fue inhibido en

más de un 90%. En otros estudios se ha comparado la efectividad de los fungicidas sintéticos, buscando nuevas alternativas, como expone Alkhail (2005), estudio diversos extractos en base de agua o acuosos por arrastre, algunos extractos etanólicos de *Allium sativum* (ajo), *Azardiachta indica* (sadao india), *Cymogopogon proxims* (zacate limon), *Carum carvi* (comino) y *Eugenia caryophyllus* (clavo) así con la implementación del fungicida benomilo siendo un agente químico ampliamente utilizado actualmente como agente antifúngico, contra *F. oxysporum*, donde los extractos acuosos destacaron con una eficacia considerable, reportando un efecto fungicida superior al 60%, pero el extracto de ajo fue el que presentó mayor actividad con casi 95% de inhibición, resultados comparables con los obtenidos con el benomilo. Lamentablemente actualmente se ha visto truncado el poder elaborar productos a base de plantas eficientes y costeables que logren rendir y logren brindar una protección efectiva a las plantas contra los diversos agentes fitopatógenos que hay actualmente, esto lo expone Akila *et al.*, (2011) donde probaron en *Musa* sp. (plátano) la eficacia de una formulación comercial a base a *Datura metel* también conocida como trompeta del diablo en viveros comerciales donde se había reportado una alta incidencia en las infecciones por *Fusarium* spp; la eficacia se evaluó mediante la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium* así como la ausencia del crecimiento del mismo. En la investigación, el extracto con metanol mitigo considerablemente el desarrollo del micelio en un 90% mientras que en campo la mezcla junto al agente químico y con cepas control, los extractos naturales, expusieron una importante efectividad al mermar el desarrollo en un 65% en la degradación y pudrición en *M. sapientum*, los resultados logran exponen que se logró superar la efectividad de cada uno por separado. Si bien no solo se han probado extractos para evitar la infección de las plantas con los múltiples agentes fitopatógenos, también se ha observado que algunos extractos naturales tienen la capacidad de inducir la síntesis de enzimas de la planta y permiten mejorar la respuesta defensiva contra los agentes fitopatógenos, Como demostró Usha (2009) investigaron la actividad antifúngica de dos mezclas siendo la mezcla 1 elaborada a partir de *Calotropis gigantea*, *Datura stramonium* (estramonio) y *Azardiachta indica* (margosa de la India) junto con estiércol de vaca; y la otra fue mezcla de extractos fue una combinación metanol-acuosos de las plantas anteriormente mencionadas, estas fueron puestas a prueba contra agente *F. mangiferae*. Durante la investigación se observó la efectividad de la mezcla 1, inhibiendo el crecimiento de *F. mangiferae* y a su vez se observó

una mejoría del porcentaje de frutos sanos y una mejor retención de los mismos, esto en comparación con los controles y la mezcla de extractos metanol-acuosos. Esto a su vez fue demostrado por Hanaa *et al.* (2011) donde implementaron extractos acuosos de *Azardiachta indica* y *Salix babylonica* también conocido como el sauce llorón, en plantas de tomate (*Solanum lycopersicum*); se observó una considerable reducción de la infección y propagación de la enfermedad causada por *F. oxysporum*, observando una disminución de hasta casi un 30%. Otra opción emergente son los aceites esenciales de plantas que son químicamente complejos por la gran cantidad de metabolitos que poseen, lo que aumenta su eficacia contra múltiples agentes microbiológicos debido a la sinergia entre los compuestos, como recientemente demostró Pawar y Thaker (2007) implementaron 75 aceites esenciales para tratamiento y control de *F. oxysporum*. los aceites más eficaces contra *F. oxysporum*, fueron el de *Cinnamomum zeylanicum* (canela), *C. cassia* (casia), *Syzygium aromaticum* (clavo de olor) y *Cymbopogon citratus* (zacate limon), los cuales, obtuvieron un alto efecto inhibitorio. Necha y Barrera (2009), observaron la actividad antifúngica varios aceites esenciales encontrando que de 6 de los 9 aceites esenciales poseían actividad frente a *Fusarium* spp. Los aceites evaluados fueron de *Telexys ambrosioides* (epazote), *Mentha spicata* (hierbabuena), *Ruta chalepensis* (ruda), *Thymus vulgaris* (tomillo), *Cinnamomum verum* (canela), *Syzygium aromaticum* (clavo de olor), *Allium sativum* (ajo), *Citrus aurantifolia* (limon) y *Eucalyptus globulus* (eucalipto); siendo que, el aceite de epazote, canela, ruda, tomillo, hierbabuena y clavo de olor, obtuvieron un alto porcentaje de inhibición; mientras que los aceites de eucalipto, ajo y limón no se observó que tuvieron la misma efectividad. también pueden inducir una respuesta de defensa de las plantas hospedantes que resulta en una reducción del desarrollo de enfermedades (Schneider y Ullrich, 1994). Badar *et al.* (2012) informo que varias plantas medicinales tenían actividad antifúngica contra hongos fitopatógenos, incluidos *Fusarium equiseti* y *F. oxysporum*. Farzaneh *et al.* (2006) probaron el aceite de artemisia contra cuatro hongos patógenos de plantas e informaron que el aceite era ligeramente efectivo contra *Tiarosporrella phaseolina*, *Fusarium moniliforme* y *F. solani*, mientras que contra *Rhizoctonia solani* exhibió una alta actividad antifúngica. Los extractos se pueden obtener a través de diferentes métodos: destilación con vapor-extracción con solvente, extracción con fluido supercrítico (Stashenko *et al.*, 2003).

3. JUSTIFICACIÓN

Uno de las principales problemáticas a las que se enfrentan hoy en día los programas de reforestación a nivel nacional son las enfermedades causadas por microorganismos fitopatógenos, ya que, durante la producción de plantas con utilidad forestal, se dan las condiciones óptimas para el desarrollo de este tipo de microorganismos. Una de las enfermedades más comunes que se presentan en viveros forestales es el mal del almacigo o Damping-off, la cual es causada por un complejo de hongos filamentosos entre ellos los del género *Fusarium*, esto representa un punto crítico para los proyectos de reforestación, debido a que causa severas pérdidas en la producción de pinos. El control y tratamiento de esta enfermedad se basa en el uso de fungicidas sintéticos los cuales pueden ocasionar problemas en la salud humana y afectar el medio ambiente, por lo que el uso de extractos naturales para el control de fitopatógenos es una opción viable, bajo el supuesto de que los extractos naturales son amigables con la salud del ser humano y el medio ambiente. La importancia de este estudio es establecer la efectividad de los extractos de *M. indica* y *D. fragrans* contra cepas de *Fusarium*, *in vitro* y en condiciones simuladas de vivero y ofrecer una alternativa para asegurar la calidad de las plantas utilizadas en los proyectos de reforestación.

4.- HIPOTESIS

Los extractos de la semilla de mango (*Mangifera indica*), y palo de Brasil (*Dracaena fragrans*), golondrina (*Chelidonium majus*) y sosa (*Solanum chrysotrichum*) presentaran efecto antifúngico sobre hongos de importancia forestal.

5.- OBJETIVOS DE TRABAJO

OBEJTIVO GENERAL

Evaluar la actividad antifúngica de los extractos de *M. indica*, *D. fragrans*, *C. majus* y *S. chrysotrichum*

OBEJTIVO PARTICULARES

1. Obtener los extractos de *M. indica*, *D. fragrans*, *C. majus* y *S. chrysotrichum* por el método de maceración con agitación constante y con diferentes solventes.
2. Determinar la actividad antifúngica mediante ensayos de difusión en placa.
3. Determinar la concentración mínima inhibitoria mediante la técnica de difusión en microplaca.
4. Determinar la concentración mínima fungicida mediante la técnica del goteo en placa.
5. Determinar el efecto de los extractos con actividad antifúngica en semillas inoculadas con *Fusarium* spp. en condiciones simuladas de invernadero.

6.- MATERIAL Y MÉTODOS

COLECTA DE PLANTAS

M. indica y *D. fragrans* se obtuvieron de manera comercial.

OBTENCIÓN DE EXTRACTOS

Las plantas fueron secadas a la sombra y a temperatura ambiente, posteriormente se trituraron con la ayuda de un molino pulverizador de alta velocidad SV-MOL-100. Las plantas trituradas se almacenaron en sobres de papel manila, en un lugar fresco y seco. Posteriormente, se pesaron 100 g de cada una de las plantas secas y trituradas los cuales fueron colocados en botellas Pyrex con tapa de rosca GL45, a los cuales se les agregaron 500 mL de hexano, cloroformo y metanol, por separado y de manera sucesiva en el mismo material vegetal, primero comenzando con el hexano, posteriormente el cloroformo y por último el metanol. Lo anterior se realizó para eliminar la mayor parte de los compuestos no polares presentes en la planta. Los frascos se dejaron en maceración estática y en penumbra durante 24 h, pasado este tiempo el extracto fue filtrado con ayuda de papel Whatman No. 1. El solvente recuperado se concentró con ayuda de un rotavapor YAMATO modelo BM100 a 40°C, este proceso se repitió 3 veces con el mismo solvente y con el mismo material vegetal. Después de realizar las tres extracciones con el hexano se procedió a repetir el procedimiento con cloroformo y por último con metanol. todos los extractos fueron almacenados a 4 °C y en la oscuridad hasta su uso (Gonzalez A., 2004).

CEPAS DE HONGOS

Las cepas fúngicas que se utilizaron en la presente investigación fueron obtenidas del cepario del Laboratorio de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Biológicas de la Universidad Autónoma de Nuevo León. Mismas que fueron aisladas de plántulas de pino que mostraban síntomas de la enfermedad del mal del almácigo, en una investigación independiente que fue realizada entre agosto del 2018 a marzo del 2019.

BIOENSAYOS PRELIMINARES DE ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA

Para los ensayos de inhibición preliminar se utilizaron cultivos fúngicos con 7 d de crecimiento en agar papa dextrosa (PDA). Después del periodo de incubación, se realizaron lavados de conidias, agregando 1 mL de amortiguador de fosfatos pH 7.2, adicionado con Tween 80 al 0.05%, posteriormente se realizaron conteos en una cámara de Newbauer para ajustar la suspensión conidial a una concentración de 3×10^6 conidias/mL. Posteriormente se tomó 1 mL de dicha suspensión ajustada la cual fue sembrada por extensión con la ayuda de una varilla de Drigalski, en cajas de Petri con PDA, posteriormente se realizaron los ensayos antifúngicos mediante la prueba de difusión del pozo en agar (Torres 2006).

En la prueba del pozo en agar se utilizó un tubo de ensaye de 10 x 75 mm, 3 mL invertido para perforar el PDA, los pozos fueron obtenidos retirando el agar de cada pozo con la ayuda de una micro-espátula estéril. A cada pozo se les agregaron 100 μ L de los extractos metanólicos, posteriormente, las placas Petri fueron incubadas a 28 °C durante un periodo de 5 a 7 d después de las cuales se observó si los extractos presentaron la actividad antifúngica, la cual fue evidenciada por la ausencia de crecimiento alrededor del pozo (Rodríguez Rico, 2019).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA INHIBITORIA

La determinación de la concentración mínima inhibitoria (CMI) de los extractos activos se realizó con base en el método de microdilución en placa, de acuerdo al protocolo M38-P de la NCCLS (NCCLS, 2002). En este caso, se utilizaron placas de 96 pozos las cuales se llenaron con 100 μ L de caldo para dextrosa, considerando que en la primera columna se utilizó el caldo a una concentración del 2X y el resto de la placa se llenó con caldo al 1X. Posteriormente las placas fueron inoculadas con 10 μ L de una suspensión de conidias previamente ajustadas a una concentración de 3×10^6 conidias/mL. Por último, los extractos fueron agregados a los pocillos de la primera columna, para realizar diluciones decimales hasta obtener una concentración de 0.010 mg/mL. Las placas fueron incubadas a una temperatura de 28°C durante 72 h, donde pasado el tiempo de incubación la CMI fue definida como la mínima concentración donde se apreció el crecimiento micelar de *Fusarium* (Santos 2005).

DETERMINACIÓN DE LA CONCENTRACIÓN MÍNIMA FUNGICIDA

La concentración mínima fungicida (CMF) fue determinada por la técnica de goteo en placa, con una adaptación del protocolo implementado por Mattei (2013) en la cual se tomaron 25 μ L de los pocillos donde no se observó el crecimiento micelial, para ser sembrados por goteo en una placa con medio de cultivo PDA. Las placas fueron incubadas a 28 °C durante 3 a 5 d y luego como determinó cual era la concentración mínima fungicida al observar la ausencia del crecimiento de micelio y a su vez se determinó que al apreciar el crecimiento de micelio en todas las concentraciones se tomara como fungistático (Neyra Espinoza 2018).

RETO ANTIFÚNGICO EN CONDICIONES DE INVERNADERO

En este ensayo fueron utilizadas semillas de la especie *P. engelmannii*, recolectadas en enero del 2022, de las cuales se tomaron 100 semillas por ensayo a estas se las dejaron remojando en un vaso de precipitado de 500 mL con agua destilada por 24 h. Posteriormente fueron desinfectadas con cloro al 10 % durante 15 min, transcurrido este tiempo, las semillas fueron lavadas con abundante agua destilada para eliminar residuos de cloro. Las semillas lavadas, se secaron durante 10 min a temperatura ambiente y en una campana de flujo laminar en la mesa de trabajo. Una vez secas, las semillas fueron sumergidas durante una hora en una suspensión de conidias (3×10^6 conidias/mL) ajustada de la manera previamente descrita, posteriormente, las semillas inoculadas se pusieron en contacto con el extracto durante 10 min, por último, fueron sembradas en contenedores de polietileno rígido de 160 mL, llenos con una mezcla de sustrato esteril de peat-moss y perlita expandida, en una proporción de 60/40 respectivamente (García Díaz, S. E. 2017).

La duración de este ensayo fue de 18 d durante los cuales se registró diariamente el tiempo que tardó la semilla en germinar, además de la aparición de signos y síntomas de la enfermedad, además, las plántulas enfermas fueron extraídas de los contenedores para colocarlas en placas con PDA y corroborar la presencia de *Fusarium* (García Díaz, S. E. 2017).

ANÁLISIS ESTADÍSTICO

Se realizó un análisis estadístico de normalidad y homogeneidad de varianzas. En el caso de no cumplir con los análisis de varianza se realizó una prueba de t de Student.

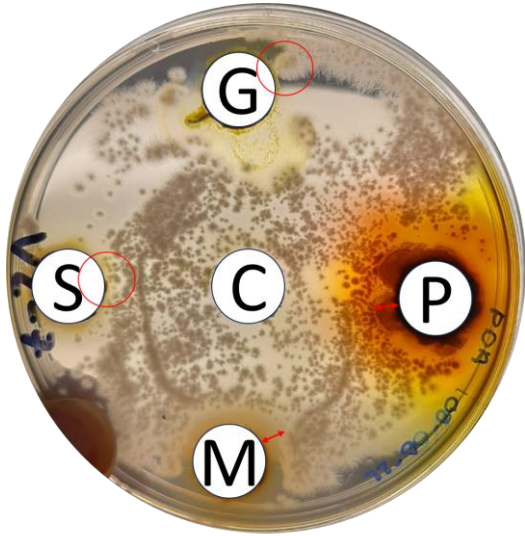
7.- RESULTADOS:

Bioensayos preliminares

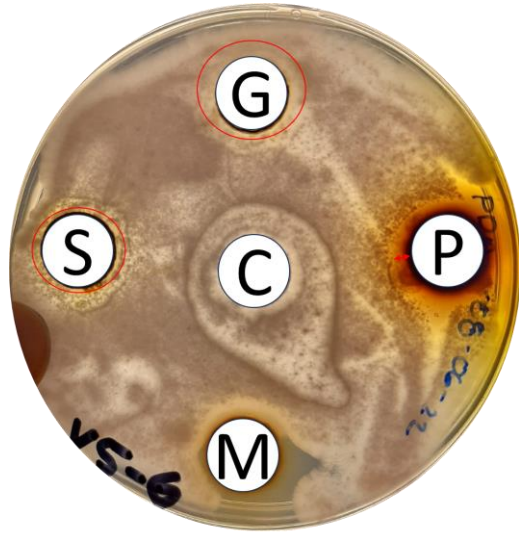
La actividad de los extractos fue bastante distintiva y muy variada dependiendo de la cepa utilizada, los extractos metanólicos de *M. indica* y *D. fragrans* fueron los que presentaron actividad antifúngica, mientras que los extractos de *Chelidonium majus* y *Solanum chrysotrichum* no presentaron actividad alguna (Tabla 1). Como se puede observar en la Figura 1, el extracto de *M. indica* tuvo halos de inhibición bastante notorios frente a la mayoría de las cepas de *Fusarium*, teniendo un halo de inhibición bastante claro. Por otro lado, *D. fragrans* también presentó actividad contra la mayoría de las cepas, sin embargo, los halos de inhibición fueron algo menores. Y como se puede apreciar en los círculos rojos presentes en la figura 1, estos en marcan los puntos de contactos de las cepas de *Fusarium* con los pozos como se observa en los extractos de *C. majus* y *S. chrysotrichum* además los márgenes de *M. indica* y *D. fragrans* están señalados con fechas rojas, es importante mencionar que en algunos casos solo se observó una disminución en el crecimiento de algunas cepas de *Fusarium*, sin obtener un halo de inhibición destacable, las cepas más sensibles fueron la V4-3 y V2-7 donde en general se obtuvieron buenos halos de inhibición con los extractos de *M. indica* y *D. fragrans*. Por otro lado, la cepa más resistente a los extractos fue la V2-1 presentando halos de inhibición de 1.75 ± 0.5 mm para *M. indica* y de 1.5 ± 0.58 mm para *D. fragrans*.

Tabla 1: Halos de inhibición de los extractos metanólicos frente a *Fusarium* spp.

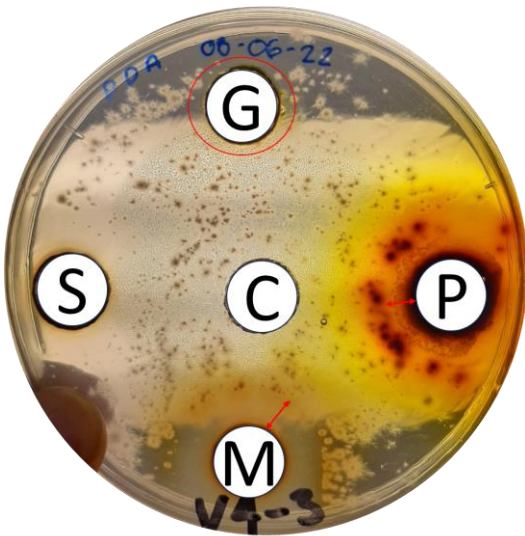
Cepa <i>Fusarium</i> spp.	Inhibición de los Extracto (mm)			
	<i>C. majus</i>	<i>S. chrysotrichum</i>	<i>M. indica</i>	<i>D. fragrans</i>
V2-1	NI	NI	1.75 ± 0.5	1.5 ± 0.58
V2-7	NI	NI	3.75 ± 0.5	4.0 ± 0.82
V2-10	NI	NI	2.75 ± 0.5	3.75 ± 0.96
V4-3	NI	NI	4.5 ± 0.58	3.5 ± 0.58
V5-4	NI	NI	3.75 ± 0.96	2.25 ± 0.5
V5-5	NI	NI	3.75 ± 0.96	2.5 ± 0.58
V5-6	NI	NI	2.75 ± 0.5	1.75 ± 0.5



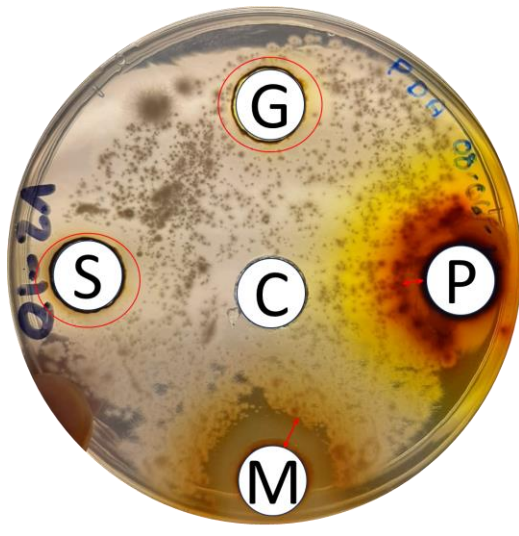
V2-7



V5-6



V4-3



V2-10

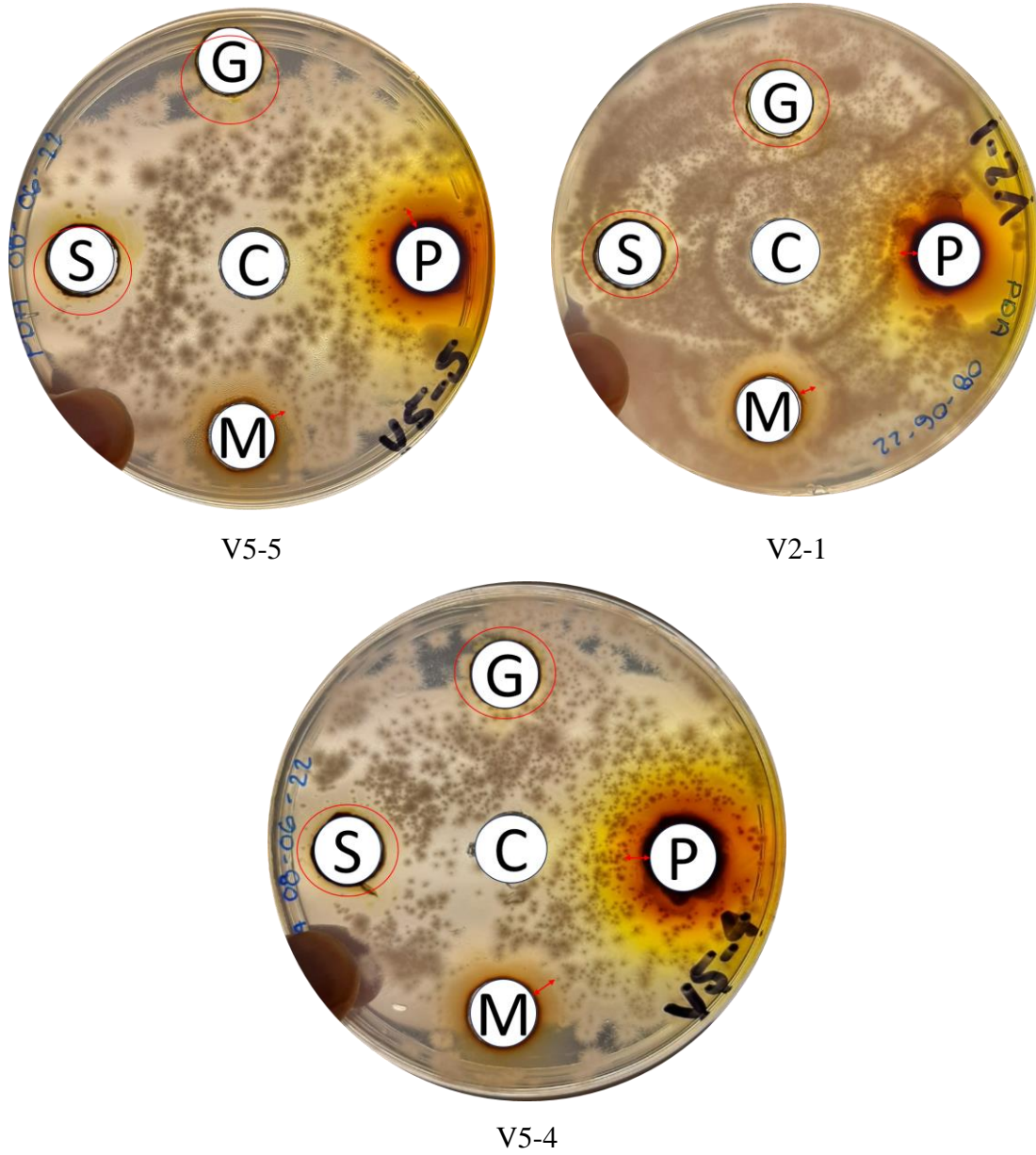


Figura 1. Inhibición del *Fusarium* spp. de los extractos metanólicos de M: *Mangifera indica*, P: *Dracaena Fragrans*, G: *Chelidonium majus*, S: *Solanum chrysotrichum*, C: Control (metanol).

Concentración Mínima Inhibitoria (CMI) y Concentración Mínima Fungicida (CMF)

En los ensayos de la CMI se observó que en promedio el extracto de *M. indica* presentó una concentración $\leq 62.5 \pm 25$ mg/mL en la mayoría de las cepas de *Fusarium* spp, solo observando que las cepas V5-6, V5-5 y V2-1 fueron las que presentaron una concentración mayor a 62.5 ± 25 mg/mL. En contraste, los resultados de los ensayos de CMF, observamos que el extracto de semilla de mango obtuvo una actividad fungistática frente las cepas V5-4 obteniendo una concentración de 75.0 ± 28.87 mg/mL, V4-3 de 87.5 ± 25 mg/mL y V2-10 con 52.5 ± 25 mg/mL, debido a que todas las concentraciones sembradas de la CMI presentaron crecimiento en la placa de PDA, mientras que las otras 4 cepas se obtuvo una actividad fungicida. Por otro lado, para el extracto de *D. fragrans* se obtuvieron concentraciones de 35.0 ± 13.69 mg/mL a >100 mg/mL, contra las cepas de *Fusarium*, con la observación que la cepa V4-3 fue la sepa que presento menor resistencia al extracto de *D. fragrans* debido a que obtuvo un valor de 35.0 ± 13.69 mg/mL. Pero a diferencia del extracto de mango, *D. fragrans* tuvo una actividad fungicida en la mayoría de las cepas presentes solamente la cepa V2-10 presento una actividad fungistática (Tabla 2).

Tabla 2. CMI y CMF de los extractos activos (mg/mL)

CEPAS	<i>Mangifera indica</i>		<i>Dracaena fragrans</i>	
	CMI (mg/mL)	CMF (mg/mL)	CMI (mg/mL)	CMF (mg/mL)
V2-1	87.25±25	150±57,74	66.67±15.85	90.0±22.36
V5-4	62.5±25	75.0±28.87	66.67±15.85	133.33±31.64
V4-3	62.5±25	87.5±25	35.0±13.69	70.0±27.39
V2-10	>50	52.5±25	58.33±10.41	66.67±15.82
V2-7	62.25±25	87.5±25	>100	133.33±41.64
V5-6	>100	150.0±57.74	91.67±10.1	166.67±51.64
V5-5	125.0±25	175.0±50	>100	166.67±51.64

RETO ANTIFÚNGICO EN CONDICIONES DE INVERNADERO.

En los ensayos de preemergencia se observó una baja tasa de germinación en las semillas tratadas con metanol absoluto donde se obtuvo un promedio de germinación del 55%, esto en comparación con el blanco (semillas sin tratamiento) donde se observó una tasa de germinación del 97%. Por otro lado, las semillas tratadas con los extractos presentaron tasas de germinación relativamente buenas, ya que el porcentaje de germinación para *M. indica* fue del 83.32% y para *D. fragrans* fue del 70.24% (Tabla 3).

En la figura 5 se aprecia el efecto de pudrición blanda o damping off característico de la sintomatología de *Fusarium* en plántulas de pino.

En cuanto al porcentaje de mortalidad de las plántulas de pino frente a las cepas de *Fusarium* en semillas sin tratamiento, se observaron diferencias importantes, ya que las cepas V2-10 y V5-5 presentaron el mayor índice mortalidad con un porcentaje de 100 % y mientras que la cepa V5-6 fue la que presentó el menor índice de mortalidad con un 56% (Figura 2).

Por su parte en las semillas tratadas con el extracto de *M. indica* se observó una disminución considerable en la mortalidad de las plántulas de pino, ya que las cepas V5-6, V2-10, V4-3 y V2-1 no causaron daño, ni en la semilla, ni en la plántula, obteniendo un nulo índice de mortalidad (Figura 2). En las semillas tratadas con este extracto no se observó crecimiento micelar a diferencia de las semillas no tratadas (Figura 4).

Para el extracto de *D. fragrans* se observa un comportamiento similar al de *M. indica*, disminuyendo a cero la mortalidad de las cepas V2-1, V2-10, V5-5 y V5-4 (Figura 3), destacando el efecto sobre la cepa V2-1, ya que esta es una de las cepas que mostró mayor mortalidad en los ensayos control (Figura 1). En este caso también podemos observar que las plántulas provenientes de semillas tratadas con el extracto no mostraron signos ni síntomas de la enfermedad, en comparación con las plántulas no tratadas con el extracto (Figura 6).

Tabla 3. Porcentajes de germinación obtenidos sobre plantulas de *Pinus engelmannii*.

<i>M. Indica</i>	Porcentaje de Germinación	Porcentaje sin Germinar	<i>D. Fragrans</i>	Porcentaje de Germinación	Porcentaje sin Germinar
Blanco	95.63 %	4.37 %	Blanco	92.3 %	7.74 %
Tratamiento	83.32 %	16.68 %	Tratamiento	70.24 %	29.76 %
Control metanol	56.28 %	43.72 %	Control metanol	54.84 %	45.16 %

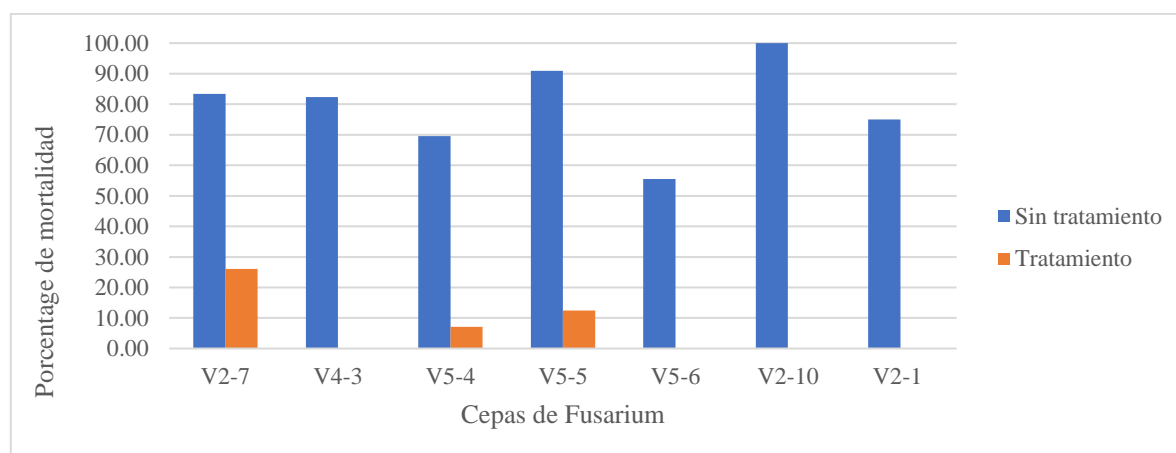


Figura 2. Porcentaje de mortalidad en semillas inoculadas después de 18 días de incubación, sobre las semillas sin tratar y tratadas con extracto de *Mangifera indica*.

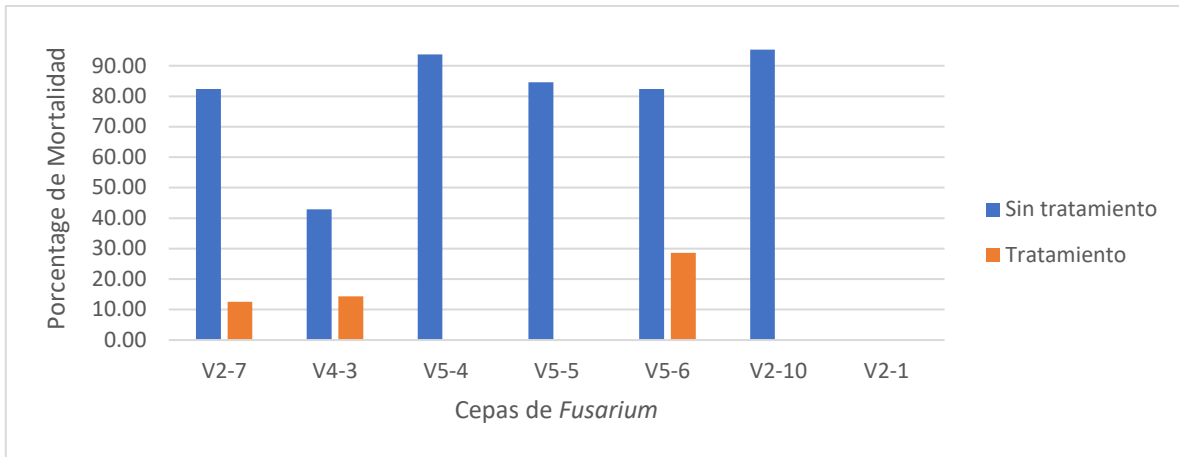


Figura 3. Porcentaje de mortalidad en semillas inoculadas después de 18 días de incubación, sobre las semillas sin tratar y tratadas con el extracto de *Dracaena fragrans*.



Figura 4: Imagen A plantulas de semillas tratadas con el extracto de *Mangifera indica*, imagen B plantulas de semillas no tratadas e inoculadas con las cepas de *Fusarium*.



Figura 5: Efecto de pudrición blanda en plántula de *Pinus engelmannii*.



Figura 6: Imagen A plantulas semillas tratadas con el extracto de *Dracaena fragrans*, imagen B plantulas semillas no tratadas e inoculadas con las cepas de *Fusarium*.

8.- DISCUSIÓN:

Los resultados observados en las pruebas de actividad antifúngica preliminar mostraron que el extracto metanólico de *Mangifera indica* presentó efecto inhibitorio contra la mayoría de las cepas de *Fusarium*. Con respecto a esto, se ha observado que la resistencia y patogenicidad de las especies de *Fusarium* varía de acuerdo al hospedero y la zona geográfica donde se encuentra como lo menciona (Rangel-Castillo, 2017); esto también lo menciona Figueroa-Rivera (2010) quién reporta diferentes grados de patogenicidad en aislados de *Fusarium* de plantas de maíz infectadas que mostraban la sintomatología de pudrición blanda y sequedad en raíz.

Cabe mencionar que la actividad del extracto de *M. indica* contra las cepas de *Fusarium* se ha reportado en diversos estudios. Ávila & Villanueva, 2018 reportaron que los extractos hexánicos y etanólicos de la semilla de mango a una concentración de 1000 µg/mL, arrojó un porcentaje de inhibición inferior al 50%, además determinaron el potencial antifúngico de los mismos extractos contra *Rhizopus* spp, reportando un porcentaje de inhibición del 87 % y al 89.6 % con un efecto dosis respuesta. En otro estudio, El-Gied *et al* (2012) lograron obtener halos de inhibición de 12 mm, al utilizar una concentración de 5mg/mL.

Por su parte, Dorta *et al.* (2014) mencionaron que la semilla de mango es un subproducto con un alto contenido de compuestos bioactivos, especialmente compuestos fenólicos tales como ácidos fenólicos y flavonoides. En un estudio similar Dorta, *et al* 2016, demostraron una relación directa entre la actividad antifúngica y una alta concentraciones de fenoles. Como expone. Además, podemos mencionar que, al ser una fuente rica en compuestos bioactivos ha mostrado una gran actividad frente a un diverso número de microorganismos como *Candida albicans*, *Escherichia coli*, *Vibrio vulnificus* y *Staphylococcus aureus* (Mutua *et al.*, 2017). así como la presencia de flavonoides que permiten la inhibición de hongos filamentosos (Kanwal, *et al*, 2010). Es importante mencionar que la semilla, la cascara, así como la pulpa son utilizadas en diversas culturas no solo como una fuente de alimento si no también en la medicina tradicional para el control de caspa dolencias estomacales (Lapenna *et al.*, 2005).

Por su parte, el extracto metanólico de *Dracaena fragrans* fue capaz de inhibir a todas las cepas probadas de *Fusarium*, la literatura menciona que las especies del género *Dracaena* se

utilizan ampliamente en la medicina tradicional en diversas culturas asiáticas para tratar diferentes enfermedades, como hemorroides, infecciones estomacales, infecciones cutáneas e inflamación; este género posee un amplio catálogo de metabolitos secundarios como esteroides, flavonoides, estilbenos y saponinas (Silva, 2011). Con respecto a esto, en diversos estudios presentados por Rezgui (2015) se demostró una importante actividad antimicrobiana y antifúngica atribuida a las saponinas que contenía la especie *D. fragrans*, dicha actividad antifúngica se reportó contra levaduras patógenas como *Cryptococcus neoformans* y *Candida albicans*.

En los ensayos de la concentración mínima inhibitoria (CMI) se observó que el extracto de *M. indica* presentó una concentración $\leq 62.5 \pm 25$ mg/mL frente a las cepas de *Fusarium* spp. En contraste, los resultados de los ensayos de concentración mínima fungicida, observamos que obtuvo una actividad fungistática frente a las cepas V5-4 obteniendo una concentración de 75.0 ± 28.87 mg/mL, V4-3 de 87.5 ± 25 mg/mL y V2-10 con 52.5 ± 25 mg/mL. esto se ve apoyado en los estudios de Reyes *et al* (2017) donde al utilizar el extracto etanólico de *M. indica* frente a varias especies de *C. albicans*, se reportó actividad fungicida en un periodo de incubación de 48 h, utilizando diluciones del extracto etanólico de *M. indica* determinaron que a una concentración del 15% al 20% inhibió el crecimiento de *Candida albicans*. En otro estudio se menciona la inhibición de *Candida* spp, las cuales fueron aisladas de lesiones cutáneas en perros, reportando una CMI de 1.25 mg/mL al emplear aceite esencial de mango (Fontenelle 2017).

Mientras que en el extracto de *Dracaena fragrans* se obtuvieron concentraciones de 35.0 ± 13.69 mg/mL a >100 mg/mL en la mayoría de las cepas. A diferencia del extracto de mango, *D. fragrans* tuvo una actividad fungicida en la mayoría de las cepas presentes, esto concuerda con los resultados de Rezgui A. (2015) donde el compuesto prosapogenina A que es una saponina, encontrada en la especie *D. fragrans* posee una gran actividad antimicrobiana y antifúngica obteniendo concentración mínima inhibitoria de 2 μ g/mL para tratamiento de *Candida albicans*. las saponinas presentes en este género le han permitido una rápida adaptación y uso en diversas culturas, así como una alta actividad antifúngica contra *Candida* spp. y a su vez permite una mejora en la identificación taxonómica de la especie *D. fragrans* (Thu ZM, 2021).

En los ensayo de preemergencia se observó una baja tasa de germinación en las semillas tratadas con metanol, obtuvimos una germinación del 55% esto en comparación con el blanco donde se obtuvo una germinación del 97%; esto indica que el metanol tiene un efecto en el factor de germinación, esto lo corrobora Solari (2004) en un estudio comparando el metabolismo de plantas C3 y C4, observando que las plantas C3 podía procesar rápidamente el metanol pero dependiendo de la forma en que se aplicase, variarían los efectos sobre esta, obteniendo que la aplicación de metanol afecta directamente la fotorrespiración reduciendo en algunos casos los factores de crecimiento y respiración; si bien se observó una germinación del 83% y 70% en las semillas tratadas con los extractos también hubo considerable disminución en el porcentaje de mortalidad ya que por lo general presentaron altos índices de muerte o daños en el desarrollo de las plántulas, los altos índices de daño se ven reflejados en las pruebas hechas por García-Díaz (2017) donde en la infección por *Fusarium* reduce significativamente los porcentajes de germinación, obteniendo un valor menor al 43%- además las plantas que lograron germinar se observó hasta un 98% de estas con signos de *F. circinatum*; En nuestro caso, los tratamientos con *M. indica* y *D. fragrans* afectaron considerablemente el crecimiento de *Fusarium* en las plantas, obteniendo bajos índices de infección y daños mínimos en el desarrollo de *P. engelmannii* y en algunos casos mejoro considerablemente el desarrollo de estas, Hanaa *et al.* (2011) mencionaron que el uso de extractos acuosos de *Azadirachta indica* (neem) y *Salix babylonica* (sauce), reducen la incidencia de *Fusarium oxysporum* en un 30%, debido a un aumento en las defensas naturales de las semillas tratadas con los extractos, observando un aumento en la efectividad de las enzimas defensivas, las enzimas antioxidantes segregadas por la planta, como la enzima peroxidasa, la enzima catalasa y la enzima súper-óxido-dismutasa. En nuestros resultados de los ensayos de preemergencia en condiciones simuladas de invernadero los extractos de *M. indica* y *D. fragrans* se obtuvo una clara inhibición del desarrollo de las cepas de *Fusarium* debido al bajo porcentaje de mortalidad de las semillas de *P. engelmannii* a los 18 días de cultivo, a pesar de ser una prueba donde se simula las condiciones de un invernadero, esto no limito la efectividad de los extractos. D. Suteu *et al.*, 2020 menciona que los extractos de plantas tienen beneficios como acción múltiple porque hay por la cantidad de compuesto bioactivos además de poseer baja toxicidad para los organismos que no son el objetivo, tales como las plantas, insectos y el medio ambiente. En un estudio similar, Akila *et al.*,(2011)

utilizó extractos metanólicos hoja de *Datura metel*, logrando reducir el crecimiento micelial de *F. oxysporum* en un 90%, mientras que en campo, utilizó un mezcla del extracto junto con el agente químico Wanis, reportando un reducción de hasta un 65% en la marchitez plátanos. Con respecto a esto, Jasso *et al.* (2007) investigaron las propiedades fungicidas de extractos etanólicos de *Flourensia* spp (hojasen) contra *F. oxysporum*, donde su desarrollo fue inhibido en más de un 90%, comparando la inhibición con diversos fungicidas sintéticos, demostrando que el control y tratamiento de estos agentes químicos no es exclusivo de los fungicidas sintéticos. Un problema observado en los ensayos de preemergencia es la disminución en la germinación en plantas tratadas con los extractos, siendo un punto relevante para los viveros forestales. Gurjar *et al.*, (2012) menciona que el problema actual de los compuestos orgánicos es la falta de métodos de extracción estandarizados y eficaces, la rápida degradación de ciertos compuestos bioactivos y la disponibilidad limitada de formulaciones, siendo estas las barreras adicionales para el uso de extractos de plantas en el manejo de enfermedades de las plantas.

9.- CONCLUSIONES

1. Se logro determinar que los extractos metanolicos de *Mangifera indica* y *Dracaena fragrans* poseen potencial antifúngico contra las cepas de *Fusarium* utilizadas en este estudio.
2. Los resultados de CMI y CMB no fueron los ideales, ya que estuvieron por arriba de 50 mg/mL, lo cual es considerado como una concentración no óptima.
3. Sin embargo, al evaluar los extractos en condiciones simuladas de invernadero, los resultados son prometedores, ya que en algunos casos se redujo considerablemente la infección de *Fusarium*, resultando en plántulas sin signos ni síntomas de la enfermedad.
4. Se observaron diferentes grados de patogenicidad entre las cepas de *Fusarium* utilizadas en este estudio, siendo la cepa mas patógena la V2-10, cabe mencionar que se logró la inhibición total de esta cepa con ambos extractos.
5. Los resultados obtenidos en este trabajo pueden ser a una opción viable en el control del mal del almácigo en viveros forestales.

10.- BIBLIOGRAFÍAS

- Abdalla, A. E. M., Darwish, S. M., Ayad, E. H. E., & El-Hamahmy, R. M. (2007). Egyptian mango by-product 2: Antioxidant and antimicrobial activities of extract and oil from mango seed kernel. *Food Chemistry*, 103(4), 1141–1152. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.10.026>.
- Abdel-Monaim, M. F., Abo-Elyousr, K. A. M., & Morsy, K. M. (2011). Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). *Crop protection*, 30(2), 185-191.
- Agrios, G. 2005. *Plant Pathology*. 5ed. Nueva York. Elsevier Academic Press. 922 p.
- Aguilar, V. F. (1990): This thesis explores soil disinfection and planting methods in onion seedbeds (*Allium cepa* L.).
- Ahmad I., Beg A.Z. (2001): This study focuses on the antimicrobial and phytochemical properties of 45 Indian medicinal plants against multi-drug resistant human pathogens.
- Akila, R.; Rajendran, L.; Harish, S.; Saveetha, K.; Raguchander, T., y Samiyappan, R. 2011. Combined application of botanical formulations and biocontrol agents for the management of *Fusarium oxysporum* f. sp. *Cubense* (Foc) causing Fusarium wilt in banana. *Biological Control*, 57(3), 175-183.
- Alburqueque Andrade, D., & Gusqui Mata, R. (2018). Eficacia de fungicidas químicos para el control in vitro de diferentes fitopatógenos en condiciones controladas. *Arnaldoa*, 25(2), 489-498.
- Alkhail, A. A. 2005. Antifungal activity of some extracts against some plant pathogenic fungi. *Pak. J. Biol. Sci.* 8(3), 413-417.
- Ansari MM, 1995. Control of sheath blight of rice by plant extracts. *Indian Phytopathol*, 48: 268-70.
- Ávila Rodríguez, Y. C., & Villanueva Báez, P. X. (2018). Aprovechamiento integral de la semilla de *Mangifera indica* L. de cuatro variedades cultivadas en el departamento del Tolima.
- Ávila-Flores IJ, Hernández-Díaz JC, González-Elizondo MS, Prieto-Ruíz JÁ, Wehenkel C (2016) Degree of Hybridization in Seed Stands of *Pinus*

engelmannii Carr. In the Sierra Madre Occidental, Durango, Mexico. PLoS ONE 11(4): e0152651. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0152651>.

- Badar KV, RB Kakde, SM Pawar and AM Chavan, 2012. Bioactivity of plants gums against pathogenic fungi. *Inter Multidisc Res J*, 2: 9-12.
- Brinker, F. (1998). *Herb Contraindications and Drug Interactions* (2nd ed.). Sandy, Oregon: Eclectic Medical Publications.
- Buechel T. 2018. Perfil de las enfermedades radiculares: Fusarium. En línea: <https://www.pthorticulture.com/es/centro-deformacion/perfil-de-las-enfermedadesradiculares-fusarium>.
- Burney, O., A. Aldrete, R. Álvarez R., J. A. Prieto R., J. R. Sánchez V. and J. G. Mexal. 2015. México-Addressing challenges to reforestation. *Journal of forestry* 113(4): 404-413. Doi:10.5849/jof.14-007.
- Calvo, M.A., Arosemena, E.L., Shiva, C., & Adelantado, C. (2011). Antimicrobial activity of plant natural extracts and essential oils. In A. Méndez-Vilas (Ed.), *Science against Microbial Pathogens: Communicating Current Research and Technological Advances* (pp. 1179-1185). Barcelona, Spain: FORMATEX.
- Camporota, P., & Perrin, R. (1998). Characterization of Rhizoctonia species involved in tree seedling damping-off in French forest nurseries. *Applied Soil Ecology*, 10(1), 65-71.
- Cetina, A.V.M., González H., V.A., Ortega D., M.L., Vargas H., J.J., & Villegas M., A. (2002). Supervivencia y crecimiento en campo de *Pinus greggii* Engelm., previamente sometidos a podas o sequía en vivero. *Agrociencia*, 36, 233-241.
- Cibrián, D., García, D.S., & Macías, B. (2008). *Manual identificación y manejo de plagas y enfermedades en viveros forestales*. Zapopan, Jalisco, México.
- Cisneros, L.M.E. (2004). *Fusarium verticillioides* (Sacc) Nirenberg en híbridos y progenitores de sorgo tolerantes al frío (Tesis de maestría). Colegio de Posgraduados, Montecillos, Texcoco, Edo de México.
- Comisión Nacional Forestal (Conafor). (2001). *Programa estratégico forestal para México 2025*.
- Comisión Nacional Forestal (Conafor). (2019). *Estado que guarda el sector forestal en México*.

- CONAFOR. (2013). Bosques, cambio climático y REDD+ en México. Guía Básica.
- D. Suteu, L. Rusu, C. Zaharia, M. Badeanu, G.M. Daraban. (2020). Challenge of utilization vegetal extracts as natural plant protection products, *Appl. Sci.* 10 (24) 1–21, <https://doi.org/10.3390/app10248913>.
- Dorta, E., González, M., Lobo, M. G., & Laich, F. (2016). Antifungal activity of mango peel and seed extracts against clinically pathogenic and food spoilage yeasts. *Natural Product Research*, 30(22), 2598–2604.
- Dorta, E., González, M., Lobo, M. G., Sánchez-Moreno, C., & de Ancos, B. (2014). Screening of phenolic compounds in by-product extracts from mangoes (*Mangifera indica* L.) by HPLC-ESI-QTOF-MS and multivariate analysis for use as a food ingredient. *Food Research International*, 57, 51-60.
- El-Gied, A. A. A., *et al.* (2012): The research investigates the antimicrobial activities of seed extracts of mango (*Mangifera indica* L.).
- Farzaneh M, H Ghorbani-Ghouzhd, M Ghorbani and J Hadian, 2006. Composition and antifungal activity of essential oil of *Artemisia sieberi* Bess. On soil born phytopathogens. *Pak J Biolog Sci*, 9: 1979-1982.
- FDTA-Valles (Fundación para el Desarrollo Tecnológico Agropecuario Valles). (2002). Manual de cebolla. Oruro: Editorial Enflex Ltda.
- Figueroa-Rivera MG, Rodríguez-Guerra R, Guerrero-Aguilar BZ, González-Chavira MM, Pons-Hernández JL, Jiménez-Bremont JF, Ramírez-Pimentel JG, Andrio-Enríquez E, Mendoza-Elos M. 2010. Caracterización de Especies de *Fusarium* Asociadas a la Pudrición de Raíz de Maíz en Guanajuato, México. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(2), 124134.
- Fontenelle, R. O. D. S., *et al.* (2017): This research examines the effect of essential oils from different cultivars of *Mangifera indica* (mango) on the antifungal susceptibility of *Candida* spp. strains isolated from dogs.
- García Díaz, S. E. (2017). Especies de *Fusarium* asociadas a la secadera y pudrición de raíz de pino en viveros forestales del centro de México: patogenidad y biocontrol.
- García, J. M., & Portilla, F. (2011). Mecanismo de acción de los fungicidas. *Revista ventana al campo*, 193-202.

- García-Díaz, S. E., et al. (2017): The study investigates the effect of *Fusarium circinatum* on the germination and growth of *Pinus greggii* seedlings in three substrates.
- Gernandt, D. S. , & Pérez-de la Rosa, J. A. (2014). Biodiversidad de Pinophyta (coníferas) en México. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 85(1): S126-S133. doi: 10.7550/rmb.32195
- Gonzalez, V.A.A. 2004. Obtención de aceites esenciales y extractos etanólicos de plantas de las amazonas. Tesis de Licenciatura. Universidad Nacional de Colombia. Manizales.
- GORDON, T. R.; SWETT, C. L.; and WINGFIELD, M. J. Management of *Fusarium* diseases affecting conifers. *Crop Protection*, v.73, p. 28-39, 2015.
- Guarneros, C., R. E. (1989). Comprobación de la patogenicidad de una cepa de *Alternaria Nées* y una de *Fusarium oxysporum* (Schl.) em. Snyder and Hans., como causante del mal de semilleros en *Pinus montezumae* Lamb. y *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw. (Tesis de licenciatura). Escuela Nacional de Estudios Profesionales Iztacala, UNAM.
- Guirado López, C. O. (2011). Factores de desarrollo de la industria forestal maderable en el Estado de Quintana Roo (1990-2005).
- Hanaa, R. F.; Abdou, Z. A.; Salama, D. A.; Ibrahim, M. A., y Srour, H. A. M. 2011. Effect of neem and willow aqueous extracts on *Fusarium* wilt disease in tomato seedlings: Induction of antioxidant defensive enzymes. *Annals of Agricultural Sciences*, 56(1), 1-7.
- INEGI, S. (1983). Carta de uso del Suelo y Vegetación. *F14-3, escala, 1(250)*, 000.
- Jasso, D.; Hernandez, C. D.; Angulo, S. J. L.; Rodríguez, G. R.; Villarreal, Q. J., y Lira S., R. 2007. Antifungal activity in vitro of *Flourensia* spp. extracts on *Alternaria* sp., *Rhizoctonia solani*, and *Fusarium oxysporum*. *Industrial Crops and Products*, 25(2), 111-116.
- Jonsson, E., Emmerman, A., y Norberg, H. (1990). Problemområden i yttremiljön vid kemisk bekämpning – förslag till åtgärder. Rapport utarbetad av lantbrukistyrelsens arbetsgrupp "Yttre miljö – Kanjoner" Lantbrukistyrelsens rapport 1991:2, Jonkoping, Sverige. (As reported in WWF, 1992).

- Kacprzak, M., Asiegbu, F. O., Daniel, G., Stenlid, J., Manka, M., & Johansson, M. (n.d.). Resistance reaction of conifer species European larch, Norway spruce, Scots pine to infection by selected necrotrophic damping-off pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 107(2), 191-207.
- Kanwal, Q., Hussain, I., Latif Siddiqui, H., & Javaid, A. (2010). Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *Natural Product Research*, 24(20), 1907-1914.
- Lapenna, E.A., Medina-Ramírez, G.E., Diaz, L., Aguillon, K. y Marín, H. 2005. Actividad bactericida y fungicida de algunas plantas utilizadas en medicina tradicional venezolana. *Revista del Instituto Nacional de Higiene Rafael Rangel* 34:6-9.
- Leslie JF, Summerell BA. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Ames, Iowa, USA: Blackwell Publishing. 387 p.
- M.S. Gurjar, S. Ali, M. Akhtar, K.S. Singh. (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management, *Agric. Sci.* 3 (3) 425–433, <https://doi.org/10.4236/as.2012.33050>.
- Ma, L. J.; Geiser, D. M.; Proctor, R. H.; Rooney, A. P.; O'Donnell, K., Trail, F. y Kazan, K. 2013. *Fusarium* Pathogenomics. *Annual review of microbiology*, 67, 399–416.
- Magaña, O. (2007). Evaluación externa de los apoyos de reforestación, obras y prácticas de conservación de suelos y sanidad forestal. *Ejercicio Fiscal 2006. Universidad Autónoma de Chapingo y Grupo GSP, Estado de México*.
- Martínez, R. A. (2000). *Fusarium oxysporum* Schl. como agente causal del estrangulamiento del tallo de *Pseudotsuga macrolepis* Flous y *Pinus ayacahuite* var. *veitchii* Shaw en plantas de vivero. (Tesis de Licenciatura). Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, Estado de México.
- Martínez-Salvador, M. and J.Á. Prieto-Ruíz. 2011. Determinación de áreas potenciales para el establecimiento de plantaciones comerciales forestales en la región norte de México. Folleto técnico núm. 47. Campo experimental Valle del Guadiana, CIRNOC.INIFAP. Durango, Dgo. 36 p.

- Mattei, A. S., Alves, S. H., Mario, D. A., Watte, G., Severo, C. B., da Silva Guazzelli, L., ... & Severo, L. C. (2013). Sensibilidad de aislamientos de *Candida albicans* de hemocultivos a 3 fármacos: estudio retrospectivo en Rio Grande do Sul, Brasil, 1999 a 2009. *Revista Iberoamericana de Micología*, 30(4), 243-247.
- Mendoza, E.M., López, B.A.O., Oyervides, G.A., Martínez, Z.G., De León, C., Moreno, M.E. 2003. Herencia genética y citoplásmica de la resistencia a la pudrición de la mazorca de maíz (*Zea mays* L.) causada por *Fusarium moniliforme* Sheld. *Revista Mexicana de Fitopatología* 21: 267–271.
- Mesa, V. A. M., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., & Monsalve, Z. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *RIA. Revista de investigaciones agropecuarias*, 45(1), 23-30.
- Montes B. R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, 29, 73-82.
- Mutua, J. K., Imathiu, S., & Owino, W. (2017). Evaluation of the proximate composition, antioxidant potential, and antimicrobial activity of mango seed kernel extracts. *Food Science and Nutrition*, 5(2), 349–357. <https://doi.org/10.1002/fsn3.399>
- Naeini, A.; Ziglari, T.; Shokri, H., y Khosravi, A. R. 2010. Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology*, 20(3), 174-178.
- Necha, L. L. B., y Barrera, L. J. G. 2009. Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). *Revista UDO Agrícola*, 8 (1), 33-41.
- Neyra Espinoza, L. C. J., & Armas Gálvez, N. M. (2018). Evaluación in vitro de la actividad fungicida y fungistática del extracto metanólico de la *minthostachys mollis* (muña) sobre cepa de *candida albicans* ATCC® 1023.
- NMX-AA-170-SCFI-2014.
- Pawar, V. C. y Thaker, V. S. 2007. Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp cicer and anti- *Alternaria porri* effects of some essential oils. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 23(8), 1099-1106.
- Pérez Olvera, C. D. L. P., & Ceja-Romero, J. (2019). Anatomía de la hoja de seis especies de *Pinus* del estado de Durango, México. *Madera y bosques*, 25(1).

- Rangel-Castillo, A. E., Valadez-Moctezuma, E., & Lozoya-Saldaña, H. (2017). Caracterización molecular y patogénesis de *Fusarium* asociado al amarillamiento del trigo. *Revista Fitotecnia Mexicana*, 40(4), 439-450.
- Rauf, B. A. (2000). Seed-borne disease problems of legume crops in Pakistan. *Pakistan Journal of Scientific and Industrial Research*, 43(4), 249-254.
- Reyes, D., et al. (2017): The study evaluates the antimicrobial effect of the leaf extract of mango (*Mangifera indica* L. cv. Bocado) on clinically relevant microorganisms.
- Rezgui, A., Mitaine-Offer, A. C., Miyamoto, T., Tanaka, C., & Lacaille-Dubois, M. A. (2015). Spirostane-type saponins from *Dracaena fragrans* "Yellow Coast". *Natural product communications*, 10(1), 37–38.
- Ribeiro, A., Romeiras, M. M., Tavares, J., & Faria, M. T. (2010). Ethnobotanical survey in Canhane village, district of Massingir, Mozambique: Medicinal plants and traditional knowledge. *Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine*, 6, 33.
- Rodríguez Rico, D., Mena Favela, A., Marszalek, J. E., & De la Fuente-Salcido, N. M. (2019). Determinación preliminar del potencial bioterapéutico de nanopartículas de quitosano plus extracto de *Prosopis* contra *Candida albicans*.
- Rodríguez-Trejo, D.A. 2008. Indicadores de calidad de planta forestal (1 Ed) Mundi Prensa México. México. D.F. 156 p.
- Rueda-Sánchez, A., Benavides-Solorio, J. D. D., Saenz-Reyez, J., Muñoz Flores, H. J., Prieto-Ruiz, J. Á., & Orozco Gutiérrez, G. (2014). Calidad de planta producida en los viveros forestales de Nayarit. *Revista mexicana de ciencias forestales*, 5(22), 58-73.
- Şahin, F.; Güllüce, M.; Daferera, D.; Sökmen, A.; Sökmen, M.; Polissiou, M., y Özer, H. 2004. Biological activities of the essential oils and methanol extract of *Origanum vulgare* ssp. *Vulgare* in the Eastern Anatolia region of Turkey. *Food Control*, 15(7), 549-557.
- Santos, D. A., & Hamdan, J. S. (2005). Evaluation of broth microdilution antifungal susceptibility testing conditions for *Trichophyton rubrum*. *Journal of Clinical microbiology*, 43(4), 1917-1920.

- Schneider S and WR Ullrich, 1994. Differential induction of resistance and enhanced enzyme activities in cucumber and tobacco caused by treatment with various abiotic and biotic inducers. *Physiol Mol Plant Pathol*, 45: 291-304
- Secretaría de Economía. (2016). Norma Mexicana NMX-AA-170-SCFI-2014: Certificación de Operación de Viveros Forestales. *Diario Oficial de la Federación*, 194-194.
- Seepe, H. A., Nxumalo, W., & Amoo, S. O. (2021). Natural Products from Medicinal Plants against Phytopathogenic Fusarium Species: Current Research Endeavours, Challenges and Prospects. *Molecules*, 26(21), 6539
- Seminis, 2020. Podredumbre de cuello y raíces por Fusarium. Bayer Cross Design and Seminis.
- Silva, B. M., Santos, R. P., Mendes, L. S., de Pinho, P. G., Valentão, P., Andrade, P. B., ... & Carvalho, M. (2011). *Dracaena draco* L. fruit: Phytochemical and antioxidant activity assessment. *Food research international*, 44(7), 2182-2189.
- Solari, M., et al. (2004): This research examines the effect of foliar applications of methanol on the yield of lettuce (*Lactuca sativa* L.).
- Soldevilla, C. (1995). Marras de origen fúngico (Damping-off) en plantas del género *Pinus* sp. cultivadas en invernadero. *Bol. San. Veg. Plagas*, 21(1), 87-109.
- Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante in vitro de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia Verbenaceae. *Rev. Acad. Colomb. Cienc*, 27(105), 579-597.
- Thu ZM, et al. (2021): The study investigates the structures and bioactivities of steroidal saponins isolated from *Dracaena* and *Sansevieria* genera.
- Torres, D., & Capote, T. (2004). Agroquímicos un problema ambiental global: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental. *Revista Ecosistemas*, 13(3), 2-6.
- Torres, J., Romero, H., Santiago, A., & Aritz Castro, R. (2006). Susceptibilidad in vitro de *Histoplasma capsulatum* al ajoene usando los métodos de difusión en agar con discos y pozos. *Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología*, 26(1), 42-47.

- Torstensson, L. (1990). Bekämpningsmedel i den yttre miljön. Forekomst, spridning, effecter. Naturvaardsverket rapport 3536. Solan, Sverige (segun iformacion del WWF, 1992).
 - Usha, K.; Singh, B.; Praseetha, P.; Deepa, N.; Agarwal, D. K.; Agarwal, R., y Nagaraja, A. 2009. Antifungal activity of *Datura stramonium*, *Calotropis gigantea* and *Azadirachta indica* against *Fusarium mangiferae* and floral malformation in mango. *European journal of plant pathology*, 124(4), 637-657.
 - Vázquez C., I. y R. R. Sanchez. 1981. Identificación y control químico de damping-off en el vivero forestal “Lázaro Cárdenas”. *Ciencia Forestal* 30: 3-22.
 - Velásquez-Valle, R. y Amador-Ramírez, M. D. 2007. Análisis sobre la investigación fitopatológica de chile seco (*Capsicum annum* L.) realizada por el Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias en los estados de Aguascalientes y Zacatecas, México. *Revista Mexicana de Fitopatología* 25:80-84.
- Zaker M and H Mosalanejad, 2010. Antifungal activity of some plant extracts on *Alternaria alternata*, the causal agent of *Alternaria* leaf spot of potato. *Pak J Biolog Sci*, 13: 1023-1029.
- NCCLS. 2002. Reference method! for broth dilution antifungal susceptibility testing of filamentous fungi. Approved standard. National Committee for Clinical Laboratory Standars. Wayne, Pa.