

Fungistasis del aceite esencial extraído de una población de *Tagetes lucida* de Hidalgo, México

Edgar López López¹
Margarita Gisela Peña Ortega¹
María Teresa Beryl Colinas León¹
Francisco Díaz Cedillo²
Miguel Ángel Serrato Cruz^{1§}

¹Departamento de Fitotecnia-Universidad Autónoma Chapingo. Carretera México-Texcoco km 38.5, Chapingo, Estado de México. CP. 56230. Tel. 01(595) 9521500, ext. 6390. (e.lopez-87@hotmail.com; mgise@excite.com; lozcol@gmail.com). ²Departamento de Química Orgánica-Escuela Nacional de Ciencias Biológicas-Instituto Politécnico Nacional. Prolongación de Carpio y Plan de Ayala s/n, Casco de Santo Tomás 11340, Ciudad de México, México. (fdiazc@ipn.mx).

§Autor para correspondencia: serratocruz@gmail.com.

Resumen

La especie *T. lucida* conocida como ‘pericón’, es un recurso natural de México cuyo aceite esencial tiene propiedades antifúngicas, aunque no en todos los hongos fitopatógenos se ha explorado el efecto que puede ocasionar esta sustancia vegetal. De una población recolectada en Atotonilco el Grande, Hidalgo, México se obtuvo aceite esencial por hidrodestilación con rendimiento de 0.2%; mediante la técnica CG-EM se identificaron ocho componentes diferentes en el aceite, pero los abundantes fueron: estragol (48%) y anetol (35%). También se evaluó la actividad antimicótica *in vitro* del aceite esencial contra *Aspergillus niger*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium janthinellum* y *Rhizoctonia solani* mediante la técnica de difusión en agar, realizando dos experimentos: el primero ensayando concentraciones de 0, 0.1 y 1% y en el segundo 0, 2 y 3%. La concentración de 1% redujo el crecimiento micelial 46% para *F. oxysporum*, 39% en *R. solani*, 21% en *A. niger* y 16% en *P. janthinellum*; sin embargo, en concentraciones altas de aceite, como 3%, solo en *R. solani* se observó la mayor la reducción del crecimiento micelial (72%).

Palabras clave: *Tagetes lucida*, aceite esencial, actividad antimicótica, composición química.

Recibido: febrero de 2018

Aceptado: marzo de 2018

Introducción

El género *Tagetes* (*Asteraceae*) se conforma de aproximadamente 56 especies distribuidas en el continente americano, la mayoría se localiza en México (Soule, 1996). Estas plantas tienen propiedades biológicas contra organismos dañinos a cultivos de importancia: bacterias, hongos, nematodos, insectos y malezas (Serrato y Quijano, 1993). Tales propiedades de *Tagetes* son por la presencia de metabolitos secundarios como alcoholes, éteres, ésteres, aldehídos, cetonas, flavonoides y tiofenos que actúan como defensas químicas contra plagas y enfermedades (Duke, 2008).

En forma natural, estos compuestos químicos pueden ser liberados por volatilización, exudados radiculares, lixiviación y por descomposición de residuos (Halbrendt, 1996). Mediante manejo de material vegetal se ha logrado obtener sustancias vegetales como polvos, extractos (acuosos o con solventes) y aceites esenciales que se han evaluado por su efecto contra hongos. En el caso de algunas especies de *Tagetes*, los extractos vegetales presentan efectos antifúngicos; por ejemplo, extractos acuosos, polvos de hojas, flores y raíces de *T. erecta* tienen efecto fungicida contra *Drechslera oryzae*, *Pyricularia oryzae* y *Uromyces phaseoli* (Grainge y Ahmed, 1988) y extractos de hojas y flores de *T. patula* son fungistáticos en *Monilia* spp. (Teodorescu *et al.*, 2009); no obstante, son pocos los estudios toxicológicos al respecto, particularmente bioensayos con aceites esenciales (Serrato-Cruz *et al.*, 2007).

Entre algunos hongos fitopatógenos de importancia económica, por el daño que causan a diversos cultivos, se encuentran: *Fusarium oxysporum* (Ascomiceto), causante de enfermedad en cultivos como sorgo (*Sorghum bicolor*), maíz (*Zea mays*) y alfalfa (*Medicago sativa*) en sus diferentes etapas fenológicas, así como en árboles frutales y forestales (Singh *et al.*, 2007), *Penicillium* spp. (Ascomiceto) causa pudriciones en postcosecha de granos básicos (Lemmen, 1999); *Aspergillus* spp. (Ascomiceto) en condiciones de alta humedad en postcosecha produce moho en hortalizas como lechuga, jitomate y acelgas (Raper y Fennell, 1965) y *Rhizoctonia solani* (Basidiomiceto) provoca la pudrición de semillas en poscosecha de numerosas especies hortícolas (Anderson, 1982).

Como parte del control de estos hongos, se ha recurrido al empleo de sustancias de origen vegetal, entre ellas, los aceites esenciales de cebolla (*Allium cepa*) o de ajo (*Allium sativum*) que, evaluados *in vitro* contra *A. niger*, *F. oxysporum* y *Penicillium cyclopium* no se observó un efecto antifúngico para la primera especie, pero en las demás, se presentó una actividad fungistática (Benkeblia, 2004). Contra los mismos hongos, el aceite esencial de orégano (*Origanum syriacum*) también produce fuerte acción inhibitoria (Daouk *et al.*, 1995). Hasta ahora no se ha evaluado el efecto del aceite esencial de *Tagetes* contra estos hongos, aunque se tienen resultados sobre otras especies; por ejemplo, el aceite de *T. patula* usado contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium digitatum* en condiciones *in vitro* inhibe el crecimiento de micelio a dosis de 10 $\mu\text{L mL}^{-1}$ y 1.25 $\mu\text{L mL}^{-1}$, respectivamente.

Refiere (Romagnoli *et al.*, 2005), el aceite esencial de hojas de *T. erecta* en 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$ inhibe completamente el crecimiento de *Pythium aphanidermatum* (Kishore y Dwivedi, 1991) y los aceites de *T. minuta* y *T. filifolia* tienen actividad antifúngica contra *Sclerotium cepivorum*, *Colletotrichum coccodes* y *Alternaria solani* inhibiendo el crecimiento micelial (Zygadlo *et al.*, 1994). Considerando que más de 50% de las especies de *Tagetes* se distribuyen en México, la realización de estudios sobre posibles actividades biológicas contra organismos patógenos en la agricultura puede resultar valiosos (Serrato-Cruz, 2014).

La especie *Tagetes lucida* Cav., conocida como ‘pericón’, se encuentra distribuida en los principales sistemas montañosos de México en clima templado y transicional (Turner, 1996), es una planta herbácea, perenne, de hasta 1 m de altura, con fuerte olor a anís al estrujarse (Villarreal, 2003). El extracto metanólico de esta planta inhibe el crecimiento de bacterias como *Escherichia coli*, *Salmonella* sp. y *Shigella* sp., así como en las especies del género *Fusarium* debido a la acción de los componentes dimetoxi-fenólicos presentes en el extracto, como la escoparona (6,7-dimetoxicoumarina) responsable de presentar una alta inhibición sobre el crecimiento micelial de *Fusarium* en dosis de hasta 250 $\mu\text{g mL}^{-1}$ (Céspedes *et al.*, 2006).

Otros estudios, como el de Barajas *et al.* (2011), muestran la actividad fungitóxicas que tiene el aceite de *T. lucida* contra los hongos *Monilina fruticola* y *Sclerotium rolfsii* a concentraciones 0.1 y 2 $\mu\text{L mL}^{-1}$, reduciendo la producción de esclerocios. En el aceite esencial de *T. lucida* se ha determinado la presencia de metil eugenol (Bicchi *et al.*, 1997) y de metil chavicol o estragol (Marotti *et al.*, 2004), compuestos a los que se atribuye diferentes características con potencial de ser explotados como insecticidas o bactericidas, y en general, como plaguicidas botánicos (Koul *et al.*, 2008). No obstante, se desconoce sobre la variabilidad del contenido de aceites esenciales de poblaciones de *T. lucida* de México (Serrato-Cruz *et al.*, 2007) y son escasos los trabajos sobre sus propiedades antifúngicas.

La caracterización del perfil de aceite esencial de poblaciones de *T. lucida* y su evaluación toxicológica contra hongos fitopatógenos de importancia económica como *F. oxysporum*, *P. janthinellum*, *A. niger* y *R. solani* es un paso necesario para el aprovechamiento de recursos naturales locales en estrategias de control orgánico para la producción agrícola. En el estado de Hidalgo se distribuyen ocho especies de *Tagetes* (Villavicencio *et al.*, 2010) y por las características climáticas de la entidad (INEGI, 2007), la presencia de *T. lucida* es importante (Serrato-Cruz, 2014). En el presente trabajo se determinó el contenido de aceite esencial de *T. lucida* proveniente de una población de Atotonilco, Hidalgo, México y se evaluó su actividad biológica *in vitro* contra los hongos antes referidos.

Materiales y métodos

Material vegetal

El 26 de octubre de 2014 se recolectó la parte aérea de plantas de *T. lucida* (Figura 1) en etapa fenológica de floración terminal en la localidad de Tiltepec (20° 18' 47" latitud norte y 98° 40' 58" longitud oeste y 2 000 msnm), perteneciente a la población de Atotonilco el Grande, Hidalgo (Figura 2), de clima predominante templado semifrío C(E)(f) (INEGI, 2007). Las semillas acondicionadas se ingresaron al Banco de Germoplasma Salvador Miranda Colín de la Universidad Autónoma Chapingo con código de acceso ELL-001-2016, también se ingresaron ejemplares herborizados al Herbario CHAP perteneciente a la División de Ciencias Forestales de la UACH (voucher 67732). Los tallos florales se cortaron en trozos de 4 a 5 cm utilizando cuchillo de cocina. Desde la recolecta del material hasta la realización de la destilación transcurrieron alrededor de 2 h.



Figura 1. *T. lucida* en floración (fotografía: Edgar López López).

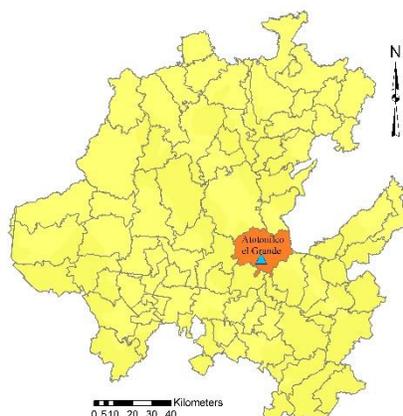


Figura 2. Atotonilco el Grande, Hidalgo y punto de colecta de *T. lucida*. Escala 1:250 000.

Extracción, rendimiento de aceite e identificación de compuestos

La extracción del aceite esencial se llevó a cabo mediante hidrodestilación en dos modalidades: a nivel laboratorio en un destilador de cristal modelo italiano de 6 L de capacidad (área de usos múltiples en invernaderos del Instituto de Horticultura, en la Universidad Autónoma Chapingo, UACH) y a nivel piloto mediante destilador de acero inoxidable con capacidad de 50 kg (planta piloto de extracción de aceites esenciales en el Campo Experimental de Fitotecnia de la UACH).

Para realizar la extracción (repetición) a nivel laboratorio, se utilizó 1.5 kg de material vegetal fresco para una destilación realizando cuatro repeticiones, el periodo de la destilación fue de 45 min. Para la extracción a nivel piloto se utilizaron 46 kg de material fresco, el tiempo de hidrodestilación fue de 3 h a partir de la precipitación. Del destilado se obtuvieron dos fases (acuosa y aceitosa), la parte aceitosa fue separada y conservada en frascos ámbar conservados en cuarto oscuro a temperatura de 18 ± 2 °C. El rendimiento de aceite esencial se obtuvo referido en biomasa fresca.

Para la identificación de los componentes del aceite esencial, se utilizó el extracto óleo de la destilación a nivel piloto y se analizó mediante cromatografía de gases con detector de masas (Adams, 2001). Cromatógrafo modelo CG 7890A (Agilent Technologies, USA) acoplado a un detector selectivo de masas 5975C Inert MSD con un detector triple eje (Agilent Technologies, USA) con ionización por impacto eléctrico (IE) de 70 eV. Se utilizó una columna HP-5ms[®] (California, USA), empacada con 5% difenil- 95% dimetilpolisiloxano. Las temperaturas del inyector y del detector se mantuvieron a 250 y 280 °C, respectivamente y se alcanzaron a una velocidad de 10 °C min⁻¹.

La temperatura inicial del horno fue de 70 °C, durante 1 min y posteriormente se programó para alcanzar las temperaturas y la velocidad antes señaladas. La velocidad de flujo del gas acarreador (helio) se mantuvo a 1 mL min⁻¹. Las muestras se diluyeron (1/100) en acetona (v/v) de 1 µL y posteriormente se inyectaron en el equipo en modo “Split” automático mediante un inyector 7683D (Agilent Technologies, USA), se realizaron tres repeticiones. Los datos de abundancia relativa se obtuvieron a partir del porcentaje de área de los picos cromatográficos. Como compuestos mayoritarios se consideraron aquellos con más de 5% de abundancia relativa. El intervalo de masas detectado fue de 35-500 m z⁻¹.

Los compuestos n-alcenos, n-octano (C₈ H₁₈) y n-octadecano (C₁₈ H₃₈), se usaron como referencias en el cálculo de los índices de Kovats. La identificación de los componentes se realizó por comparación de los índices de retención relativa, más los espectros de masas comparados con la base de datos NIST 05 del sistema GC-MS (National Institute of Standard and Technology) y con los datos espectrales publicados por la Carol Stream Corp., USA (Adams, 2001).

Evaluación de efectos antifúngicos

Las cepas de los hongos *A. niger*, *R. solani*, *F. oxysporum* y *P. janthinellum*, provenientes de cultivos del Campo Agrícola Experimental de la UACH, se aislaron e identificaron en el Laboratorio de Micología Agrícola del Departamento de Parasitología de la UACH. Para reproducir cada una de las cepas, a partir del inóculo inicial establecido en caja Petri (100×15 mm) con medio PDA (200 g papa, 20 g dextrosa, 20 g agar), se realizaron cortes de PDA-micelio para transferir a medio de cultivo fresco en cajas Petri del mismo tipo, las cuales se incubaron a 28 °C durante 72 h, posteriormente se transfirieron a cajas Petri con cada uno de los tratamientos, mismos que se bioensayaron en dos experimentos.

Experimento 1. La preparación de las placas de papa dextrosa agar con los tratamientos se hizo de la siguiente manera. El aceite esencial en concentraciones de 1 mL L⁻¹ (0.1%) y 10 mL L⁻¹ (1%) se disolvió por separado en PDA, para disolver el aceite en el medio de cultivo se utilizó Tween[®] 20 como emulsificante en 1 mL L⁻¹ en todos los tratamientos. El fungicida comercial Benomil[®] (butilcarbamoil benzimidazol-2-ilcarbamoato de metilo) al 1% se utilizó como testigo positivo o referencial además de incluir un testigo absoluto sin aceite esencial.

El experimento constó de 16 tratamientos generados de la combinación de los factores de estudio concentración de aceite (0, 1 y 10 mL), fuente de hongos (cuatro especies) y testigo referencial (para cada uno de los hongos), tratamientos que se distribuyeron siguiendo el diseño de bloques al azar con cuatro repeticiones. Cada repetición estuvo conformada por cuatro unidades experimentales, cada unidad experimental correspondió a una caja Petri (placa) de 100×15 mm.

De las cajas Petri con el inóculo micelial se hicieron cortes de agar con micelio de 1 cm² y se trasladaron al centro de la caja Petri que contenía el extracto del PDA y los tratamientos respectivos. Experimento 2. Con las mismas condiciones del primer experimento, se ensayaron concentraciones de 20 mL L⁻¹ (2%) y 30 mL L⁻¹ (3%), y como testigo referencial Benomil (1%). El experimento consistió de 16 tratamientos, cada uno repetido cuatro veces.

En ambos experimentos, las placas o cajas se incubaron a una temperatura de 28 °C y se observó el desarrollo micelial hasta el crecimiento límite del hongo. La actividad del aceite esencial se evaluó considerando la prueba de crecimiento micelial (Ríos *et al.*, 1988); para el registro del crecimiento micelial se midieron dos diámetros que se cruzaron perpendicularmente, sumando y dividiendo en dos para calcular el diámetro medio de crecimiento del área del inóculo inicial a intervalos de 24 h. Con los datos de diámetro de crecimiento se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial con respecto al tratamiento testigo (RRT) mediante la fórmula:

$$RRT (\%) = \frac{TCT - TCt}{TCT} \times 100$$

Donde: TCT= tasa de crecimiento en el testigo y TCt= tasa de crecimiento del tratamiento.

El análisis de varianza sobre el diámetro del micelio en los dos experimentos se hizo como un factorial 3×4 utilizando el modelo lineal general y la comparación de medias mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$) con el paquete estadístico SAS versión 9 (SAS Institute, 2004).

Resultados y discusión

Rendimiento de aceite esencial e identificación de compuestos

El rendimiento promedio de aceite esencial a nivel de matraz y a nivel piloto fue de 0.28% con respecto al peso de tejido fresco (Cuadro 1), resultado por debajo de lo reportado para esta especie (0.3 y 0.4%) (Cáceres *et al.*, 1998) y muy inferior comparado contra otras especies como el hinojo (Sellam *et al.*, 2015). Las características del hábitat en el que se desarrolla la población de *T. lucida* seguramente debe ser importante en la respuesta de productividad natural; al respecto, Haslam (1986) propone que factores como el suelo y el clima son los principales factores que influyen en el rendimiento y calidad del aceite esencial.

Cuadro 1. Biomasa de referencia y rendimiento de aceite esencial de plantas de la población de *T. lucida* de Atotonilco el Grande, Hidalgo.

Tipo	Biomasa (kg) peso fresco, PF	Biomasa (kg) peso seco, PS	Aceite esencial extracto (mL)	Rendimiento (%) mL 100 g ⁻¹ PF	Rendimiento (%) mL 100 g ⁻¹ PS
Matraz	1.4075	1.054	4.04	0.2869	0.3832
Piloto	46	35	130	0.2826	0.3714
Piloto ^z (1 ha)	2 000	1 513	5 600	0.28	0.3701

^z= Extrapolación del ensayo piloto a 1 hectárea.

En cuanto a la identificación de compuestos se determinaron nueve, separados en tiempos de retención de 3.9 a 17 min los cuales se presentaron en la secuencia siguiente: β -mirceno (3.93 min), 3,7-dimetil-1,3,6-octatrieno (4.60 min), 3,7-dimetil-1,6-octadieno-3-ol (5.30 min), estragol (6.67 min), 4-metoxibenzaldehído (7.43 min), 1-metoxi-4-(1-propenil) benceno (7.86 min), 1, 2-dimetoxi-4-(2-propenil) benceno (9.32 min), óxido de cariofileno (11.72 min) y ácido trans-13-octadecanoico (17.09) (Cuadro 2, Figura 3).

Cuadro 2. Composición química del aceite esencial de *T. lucida* de Atotonilco el Grande, Hidalgo.

Pico	Compuesto	Tiempo de retención (min)	Área	(%)
1	β -mirceno	3.93	1 336 863	2.32
2	3, 7-dimetil-1, 3, 6-octatrieno	4.6	425 990	0.74
3	3, 7-dimetil-1, 6-Octadieno-3-ol	5.3	808 900	1.4
4	Estragol	6.67	28 073 041	48.84
5	4-metoxibenzaldehido	7.43	742 814	1.29
6	1-metoxi-4-(1-propenil) benceno (anetol)	7.86	20 569 878	35.78
7	1, 2-dimetoxi-4-(2-propenil) benceno	9.32	1 300 116	2.26
8	Óxido de cariofileno	11.72	836 063	1.45
9	Ácido trans-13-octadecanoico	17.09	3 384 380	5.88

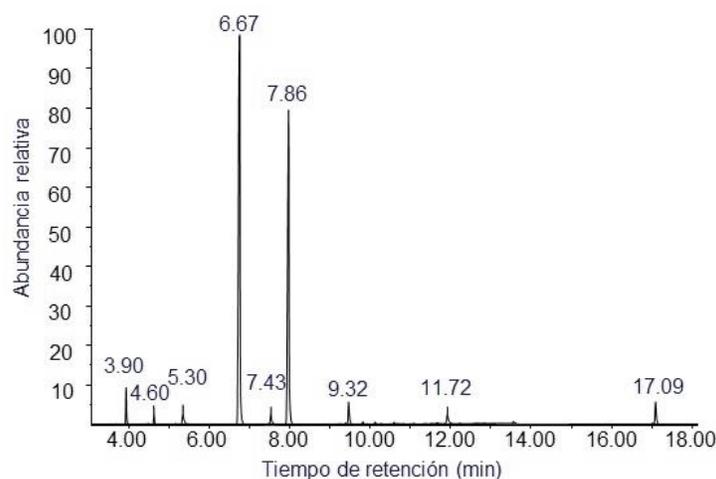


Figura 3. Cromatograma de los componentes del aceite esencial de *T. lucida*.

Los componentes mayoritarios fueron: estragol (1-alil-4-metoxibenceno) (48%) y anetol (1-metoxi-4-(1-propenil) benceno) (35%) (Picos 2 y 4 del Cuadro 2), los cuales se han registrado con anterioridad para la especie en cuestión (Bicchi *et al.*, 1997; Marotti *et al.*, 2004). Estos compuestos químicos son fenilpropanoides que se distinguen por ser isómeros de posición reportados en otras especies de *Tagetes* (Serrato *et al.*, 2008), éstos metabolitos secundarios tienen efecto biológico contra diversas especies de insectos y de hongos (Koul *et al.*, 2008; Sellam *et al.*, 2015). Cabe señalar, que el anetol como componente mayoritario combinado con otras moléculas en el aceite esencial de *T. filifolia*, tiene una mayor actividad biológica que en estado puro (Camarillo *et al.*,

2009), evidencia que sugiere un efecto de sinergismo (Koul *et al.*, 2008). El anetol y el estragol se encuentran en otras especies aromáticas como estragón (*Artemisia dracuncululus*), albahaca (*Ocimum basilicum*), hinojo (*Foeniculum vulgare*), anís (*Pimpinella anisum*) y anís estrella (*Illicium verum*) (Freire *et al.*, 2005; Rietjens *et al.*, 2005).

Evaluación de la actividad antifúngica

En los dos experimentos, las características morfológicas que presentaron los hongos fueron como sigue. En *A. niger*, la macromorfología de las colonias mostraba al principio una coloración blanca que se torna amarilla y a partir de las 72 h se va obscureciendo desde color café hasta llegar a negro y con aspecto lanoso; *F. oxysporum* mostró colonias blancas al inicio y posteriormente se tornaron color púrpura, de aspecto algodonoso y produjeron un pigmento púrpura que se difundió en el medio de cultivo; *P. janthinellum* presentó colonias de coloración verde grisáceo, de forma plana, aterciopeladas y fasciculadas, conforme crecía, era notoria una notable producción de exudados, probablemente metabolitos secundarios; *R. solani* desarrolló colonias de color café pardo y planas al inicio de su crecimiento, posteriormente presentó aspecto algodonoso de color blanco, al finalizar su crecimiento, se observó una pigmentación verde oscuro. Las características morfológicas de los hongos coincidieron con lo reportado para estas especies en sus diferentes fases con un crecimiento limitado, pero sin cambios aparentes (Agrios, 1995).

En el experimento 1, el diámetro inicial del micelio en el medio de cultivo con Benomil® se mantuvo sin cambio en los diferentes momentos de registro de esta variable, es decir, no hubo crecimiento significativo al término de la evaluación (1.5 mm, $p \leq 0.05$) (Cuadro 3), respuesta que coincide con otros resultados como el de Villa *et al.* (2015) donde se reporta un efecto fungicida del Benomil® (testigo de referencia) con valores superiores al 95% de actividad. Por el contrario, en el testigo absoluto, el crecimiento del micelio tuvo el mayor diámetro (9 mm) (Cuadro 3). La concentración del aceite esencial, la especie fúngica y su interacción influyeron ($p \leq 0.05$) el crecimiento micelial de los hongos fitopatógenos estudiados (Cuadro 3). Considerando el factor concentración del aceite, el diámetro de la zona de crecimiento de los hongos fue disminuyendo proporcionalmente al aumentar la concentración (Cuadro 3), este efecto se ha observado en trabajos previos de evaluación de extractos de *Tagetes* en hongos (Céspedes *et al.*, 2006).

La tendencia observada en la disminución del crecimiento micelial permite suponer que con mayores concentraciones de aceite se podría lograr la inhibición total de crecimiento y quizá la muerte del hongo, tal consideración motivó plantear el segundo experimento que se comentará más adelante. En cuanto al crecimiento del diámetro del micelio y su relación con las diferentes especies de hongos (Cuadro 3), se encontró que los ascomicetos *A. niger* y *P. janthinellum* respondieron de manera similar (8-8.1 mm), con crecimiento mayor ($p \leq 0.05$) comparado con el del basidiomiceto *R. solani* y el ascomiceto *F. oxysporum*, ambos de crecimiento micelial parecido (6.7-7.1 mm); estas diferencias se podrían atribuir a la naturaleza genética de estos organismos.

En cuanto al efecto de interacción, destacó que con 0.1 y 1% de aceite de *T. lucida* aplicados a las cuatro especies de hongos se logró menor diámetro micelial ($p \leq 0.05$) con respecto del testigo absoluto (Cuadro 3), confirmando el efecto antifúngico del aceite. También fue notorio que con 0.1% de aceite, el diámetro del micelio de *F. oxysporum* y de *R. solani* fue menor ($p \leq 0.05$) (4.86.8 mm) que el de *A. niger* y de *P. janthinellum* (7.4-7.9 mm) (Cuadro 3), respuesta que confirma cierta especificidad entre el tipo de hongo y la naturaleza química del aceite. Al respecto,

agentes fungitóxicos en ascomicetos impiden el crecimiento del hongo en condiciones *in vitro*, afectan su capacidad de esporulación, y la germinación de conidios (Castellanos *et al.*, 2011), en hongos basidiomicetos, el mecanismo de acción antifúngica está dado por compuestos flavonoides de efecto biocida (Céspedes *et al.*, 2006). Finalmente, en cada especie de hongo las dos concentraciones de aceite no influyeron con significancia estadística el diámetro del micelio (Cuadro 3), resultado que tendría implicaciones económicas favorables de aplicar la concentración de 0.1%.

Cuadro 3. Efecto antifúngico del aceite esencial de *T. lucida* sobre el crecimiento micelial de *A. niger*, *F. oxysporum*, *P. janthinellum* y *R. solani* *in vitro* durante 15 días. Experimento factorial 1.

Aceite <i>T. lucida</i> (%) y testigo	Diámetro (mm) e inhibición del crecimiento micelial (%)				
	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. janthinellum</i>	<i>R. solani</i>	Factor aceite (C)
Comparación de promedios de la interacción de factores (HxC)					
0	9.1 ±0.2 a ^z (0)	9 ±1.1 a (0)	9.1 ±0.3 a (0)	9.1 ±0.5 a (0)	9 ±0.5 A (0)
0.1	7.9 ±0.8 b (13.1)	6.3 ±1.2 c (30)	7.8 ±0.9 b (14.2)	6.8 ±0.6 c (25.2)	7.2 ±0.9 B (20.6)
1	7.1 ±1.1 bc (21.9)	4.8 ±0.2 cd (46.6)	7.4 ±0.1 bc (16.6)	5.5 ±0.7 c (39.5)	6.2 ±0.6 C (31.1)
Factor especie (H)	8 ±0.4 A (11.6)	6.7 ±0.8 B (25.5)	8.1 ±0.5 A (10.2)	7.1 ±0.6 B (21.5)	
Benomil® 1	1.5 ±0.5 d (83.5)	1.4 ±0.6 d (84.4)	1.5 ±0.8 d (83.5)	1.5 ±0.3 d (83.5)	1.5 ±0.5 D (83.7)

^z= Valores con la misma letra minúscula o mayúscula dentro de la columna o mayúscula dentro de fila son iguales estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

La reducción de la tasa de crecimiento micelial de los cuatro hongos expuestos al aceite de ‘pericón’ de Atotonilco el Grande, desde 23 hasta 46% (Cuadro 3), es indicador de un efecto fungistático de este extracto vegetal que contiene ocho compuestos químicos distintos, con abundancia de estragol y anetol (Cuadro 2). Este efecto fungistático causado por el aceite de *T. lucida* se había detectado previamente contra *Sclerotium rolfsii* y *Monilinia fruticola*, hongos importantes en postcosecha de productos agrícolas (Barajas *et al.*, 2011). Para los ascomicetos (*A. niger* y *P. janthinellum*), la tasa de reducción de micelio de 13 a 21%, comparada con la registrada para el basidiomiceto *R. solani* (25 a 39%) y el ascomiceto *F. oxysporum* (30 a 46%), es indicadora de que la actividad biológica del aceite de la población Atotonilco en las concentraciones ensayadas no parece tener alcances promisorios contra los ascomicetos en este experimento.

En el experimento 2, el micelio en el medio de cultivo con Benomil® no presentó un incremento significativo (1.5 mm) ($p \leq 0.05$) al término del experimento (Cuadro 4), mientras que el micelio del testigo absoluto tuvo el mayor diámetro (9 mm, Cuadro 3). El tamaño del micelio de los hongos fitopatógenos, al igual que en el Experimento 1, resultó influido ($p \leq 0.05$) por la especie fúngica (Cuadro 4): los fitopatógenos no esporulantes (*F. oxysporum* y *R. solani*) resultaron menos afectados que los esporulantes (*A. niger* y *P. janthinellum*). Por otra parte, no hubo efecto de concentración en el diámetro micelial, aunque éste fue relativamente menor comparado con lo observado en el primer experimento (Cuadro 4).

Cuadro 4. Efecto antifúngico del aceite esencial de *T. lucida* sobre el crecimiento micelial de *A. niger*, *F. oxysporum*, *P. janthinellum* y *R. solani* *in vitro* durante 15 días. Experimento factorial 2.

Aceite <i>T. lucida</i> (%) y testigo	Diámetro (mm) e inhibición del crecimiento micelial (%)				
	<i>A. niger</i>	<i>F. oxysporum</i>	<i>P. janthinellum</i>	<i>R. solani</i>	Factor aceite (C)
Comparación de promedios de la interacción de factores (HxC)					
0	9 ±0.3 a (0)	9.1 ±0.4 a (0)	8.9 ±0.4 a (0)	9.1 ±0.5 a (0)	9 ±0.4 A (0)
2	6.6 ±0.6 b (26.6)	4.7 ±0.2 c (48.3)	6.8 ±0.6 b (23.6)	3.9 ±0.6 c (57.1)	5.5 ±0.5 B (38.9)
3	6.4 ±0.7 b (28.8)	4.2 ±0.6 c (53.8)	6.7 ±0.3 b (24.7)	2.8 ±0.5 cd (72.5)	5 ±0.5 B (44.9)
Factor especie (H)	7.3 ±0.5 A (18.4)	6 ±0.4 B (34)	7.5 ±0.4 A (16.1)	5.3 ±0.5 C (43.2)	
Benomil® 1**	1.6 ±0.6 d (82.2)	1.4 ±0.5 d (84.6)	1.6 ±0.3 d (82)	1.5 ±0.1 d (83.5)	1.5 ±0.4 C (83.7)

^z= Valores con la misma letra minúscula o mayúscula dentro de la columna o mayúscula dentro de fila son iguales estadísticamente (Tukey, $p \leq 0.05$).

Considerando el efecto de interacción, se observó que 2 y 3% de aceite de *T. lucida* presenta menor diámetro y mayor porcentaje de reducción micelial en *F. oxysporum* (4.7-4.2 mm; 48 y 53%) y en *R. solani* (3.9-2.8 mm; 57 y 72%), con respecto del testigo absoluto (9.0-9.1 mm) y en comparación con *A. niger* (6.6-6.4 mm; 26-28%) y *P. janthinellum* (6.8-6.7; 23-24%) (Cuadro 4). Estos resultados coinciden parcialmente con lo reportado por Castellanos *et al.* (2011) quienes indican que el micelio de *R. solani* resulta inhibido por extractos metanólicos de *T. lucida* en dosis de 240 µg/mL. La poca inhibición de las especies *A. niger* y *P. janthinellum* se debe a su actividad esporulante, ya que los conidios pueden ser más resistentes ante algunos agentes antifúngicos (Barajas *et al.*, 2011); por lo tanto, la actividad biológica del aceite de esta población de *T. lucida* en los ascomicetos estudiados no es promisoría, como se señaló anteriormente.

En general, los fenilpropanoides como el estragol y el anetol que se encuentran en el aceite esencial de la población Atotonilco, son metabolitos secundarios que también están presentes en otras especies vegetales como el hinojo (*Foeniculum* spp.) o el anís (*Pimpinella anisum*) cuyo aceite posee actividad fungistática o fungicida (Freire *et al.*, 2005; Rietjens *et al.*, 2005; Sellam *et al.*, 2015). En el caso de la actividad biológica del Benomil®, el mecanismo está dado por la acción inhibitoria de la síntesis de ergosterol, que es un componente estructural de la membrana de los hongos, causando deformaciones y proliferación anormal de tubos germinativos (Pérez *et al.*, 1983).

La aplicación de sustancias sintéticas o naturales contra hongos fitopatógenos debe valorar las implicaciones al ambiente y al humano, así como su viabilidad técnica-económica, en este último sentido, la extrapolación del rendimiento de biomasa y de aceite de la población de *T. lucida* en condiciones de secado en Atotonilco, Hidalgo, así como el destacado efecto fungistático evaluado contra los hongos *F. oxysporum* y *R. solani*, permiten estimar que con un rendimiento de 2 000 kg de biomasa fresca por hectárea obtenido por recolección en las áreas naturales de Atotonilco y con un rendimiento de aceite esencial de 0.28%, se podrían obtener cerca de 5.6 L de aceite esencial

(Cuadro 1), con lo cual se podrían formular más de 1000 L de biopesticida al 1% y más de 10 000 L al 0.1%. Por lo tanto, este recurso natural de Atotonilco, Hidalgo puede tener buenas perspectivas en agricultura ecológica contra tales hongos; su evaluación en campo resultará conveniente, a la vez que fomentar el manejo agroecológico de la población de ‘pericón’ para aumentar el número de plantas por unidad de superficie.

Conclusiones

La productividad en aceite esencial de la población natural de *T. lucida* de Atotonilco, Hidalgo no fue alta y los componentes mayoritarios en el aceite fueron anetol y estragol. Las pruebas de evaluación *in vitro* contra los hongos fitopatógenos bioensayados evidenciaron un efecto fungistático del aceite, especialmente contra el hongo *R. solani* en la condición de alta concentración del aceite.

Literatura citada

- Adams, R. P. 2001. Identification of essential oils components by gas chromatography/quadrupole. Mass Spectroscopy. Allured Publishing Corporation. USA. 468-572 pp.
- Agrios, G. N. 1995. Fitopatología. 2^{da} ed. Uthea. México. 838 p.
- Anderson, N. A. 1982. The genetics and pathology of *Rhizoctonia solani*. Annual Review of Phytopathology. 20(1):329-347.
- Barajas, J. S.; Montes, R.; Castrejón, F.; Flores, H. E. y Serrato, M. A. 2011. Propiedades antifúngicas en especies del género *Tagetes*. Rev. Mex. Micol. 34:85-91.
- Benkeblia, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). LWT-Food Sci. Technol. 37(2):263-268.
- Bicchi, C.; Fresia, M.; Rubiolo, P.; Monti, D.; Franz, C. and Goehler, I. 1997. Constituents of *Tagetes lucida* Cav. ssp. *lucida* essential oil. Flavour and Fragrance J. 12:47-52.
- Cáceres, A.; López, B.; González, S.; Berger, I.; Tada, I. and Maki, J. 1998. Plants used in Guatemala for the treatment of protozoal infections. I. Screening of activity to bacteria, fungi and American trypanosomes of 13 native plants. J. Ethnopharmacol. 62(3):195-202.
- Camarillo, G. A.; Ortega, L. D.; Serrato, M. A. y Rodríguez, H. C. 2009. Actividad biológica de *Tagetes filifolia* (Asteraceae) en *Trialeurodes vaporariorum* (Hemiptera: Aleyrodidae). Rev. Colomb. Entomol. 35(2):177-184.
- Castellanos, L.; Muiño, B. L.; Lorenzo, M. E.; Rodríguez, A. y Gómez, M. 2011. Efecto *in vitro* de siete fungicidas químicos sobre *Beauveria bassiana* (Bals.) Vuil. Fitosanidad. 15(1):31- 38.
- Céspedes, C. L.; Avila, J. G.; Martínez, A.; Serrato, B.; Calderón, J. C. and Salgado, R. 2006. Antifungal and antibacterial activities of Mexican tarragon (*Tagetes lucida*). J. Agric. Food Chem. 54(10):3521-3527.
- Daouk, R. K.; Dagher, S. M. and Sattout, E. J. 1995. Antifungal activity of the essential oil of *Origanum syriacum* L. J. Food Protec. 58(10):1147-1149.
- Duke, J. A. 2008. Duke's handbook of medicinal plants of Latin America CRC Press. USA. 685- 693 pp.
- Freire, R. S.; Morais, S. M. and Catunda-Junior, F. E. 2005. Synthesis and antioxidant, anti-inflammatory and gastroprotector activities of anethole and related compounds. Bioorganica Medical Chem. 13(13):4353-4358.

- Grainge, M. and Ahmed, S. 1988. Handbook of plants with pest-control properties. 1st edition. John Willey and Sons. USA. 470 p.
- Halbrendt, J. M. 1996. Allelopathy in the management of plant parasitic nematodes. *J. Nematol.* 28:8-14.
- Haslam, E. 1986. Secondary metabolism- fact and fiction. *Natural Product Reports.* 3:217-249.
- INEGI (Instituto Nacional de Estadística, Geografía e Informática). 2007. Anuario estadístico. Hidalgo. Tomos I, II. Aguascalientes, México. 1156 p.
- Kishore, N. and Dwivedi, R. S. 1991. Fungitoxicity of the essential oil of *Tagetes erecta* L. against *Pythium aphanidermatum* Fitz. the damping-off pathogen. *Flavour and Fragrance J.* 6(4):291-294.
- Koul, O.; Walia, S. and Dhaliwal, G. S. 2008. Essential oils as green pesticides: potential and constraints. *Biopesticides International.* 4:63-84.
- Lemmen, C. 1999. Moulds: occurrence, health risks, protective measures. Springer Verlag. Berlin. Germany. 192 p.
- Marotti, M.; Piccaglia R.; Biavati B. and Marotti I. 2004. Characterization and yield evaluation of essential oils from different *Tagetes* species. *J. Essential Oil Res.* 16(5):440-444.
- Púrez, L.; Moa, V. T. y Mauri, F. 1983. Lucha contra *Mycosphaerella musicola*, agente causal de la Sigatoka en el plátano con fungicidas sistémicos derivados de triazol. *Ciencia y Técnica en la Agricultura. Protección de Plantas.* 6(4):87-98.
- Raper, K. B. and Fennell, D. I. 1965. The genus *Aspergillus*. Baltimore, Williams & Wilkins Co. USA. 686 p.
- Rietjens, I. M.; Boersma, M. G. and Van Der Woude, H. 2005. Review: flavonoids and alkenylbenzenes: mechanisms of mutagenic action and carcinogenic risk. *Mutation Res.* 574(1):124-138.
- Ríos, J.; Recio, M. and Villar, A. 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity. *J. Ethnopharmacol.* 23(2-3):127-149.
- Romagnoli, C.; Bruni, R.; Andreotti, E.; Rai, M. K.; Vicentini, C. B. and Mares, D. 2005. Chemical characterization and antifungal activity of essential oil of *capitulum* from wild Indian *Tagetes patula* L. *Protoplasma.* 225(1-2):57-65.
- Sellam, K.; Bammou, M.; Ramchoun, M.; Bouhlali, E. D. T.; J'aiti, F.; Nassiri, L. and El-Rhaffari, L. 2015. Antifungal potential of the seed and leaf *Foeniculum vulgare* Mill essential oil in liquid and vapor phase against phytopathogenic fungi. *J. Appl. Pharmaceutical Sci.* 5(11):50-54.
- Serrato, C. M. A. 2014. El recurso genético cempoalxóchitl (*Tagetes* spp.) de México (Diagnóstico). Universidad Autónoma Chapingo (UACH). SINAREFI-SNICS-SAGARPA. México. 182 p.
- Serrato, M. A. y Quijano M. L. 1993. Usos de algunas especies de *Tagetes*: revisión bibliográfica (1984-1992). *In: memorias I Simposio Internacional y II Reunión Nacional sobre Agricultura Sostenible: importancia y contribución de la agricultura tradicional.* CEICADAR, Puebla. México. 228-238 pp.
- Serrato, C. M. A.; Barajas, P. J. S. y Díaz, C. F. 2007. Aceites esenciales del recurso genético *Tagetes* para el control de insectos, nematodos, ácaros y hongos. *In: agricultura sostenible Vol. 3 Sustancias naturales contra plagas.* López-Olguín, J. F.; Aragón-García, A.; Rodríguez, H. C. y Vázquez, G., M. (Eds.). Montecillo, Texcoco, Estado de México, México. 142-200 pp.

- Serrato, C. M. A.; Díaz, C. F. y J. S. Barajas, P. J. S. 2008. Composición en el aceite esencial en germoplasma de *Tagetes filifolia* Lag. de la región centro-sur de México. *Agrociencia*. 42:277-285.
- Singh, G.; Chen, W.; Rubiales, D.; Moore, K.; Sharma, Y. R. and Gan, Y. 2007. Diseases and their management. *In: chickpea breeding and management*. Yadav, S. S.; Redden, R. J.; Chen, W. y Sharma, B. (Eds). CABI. 497-519 pp.
- Soule, J. A. 1996. Novel annual and perennial *Tagetes*. *In: progress in new crops*. Janick, J. (Ed.). American Society for Horticultural Science Press, Arlington, Virginia. USA. 546-551 pp.
- Statistical Analysis System (SAS Institute). 2004. SAS/GRAPH user's guide Version 9.1 SAS Institute. Cary, NC, USA 359 p.
- Teodorescu, G.; Sumedrea, M.; Marin, F. and Murariu, F. 2009. Use of vegetal extracts in control of *Monilia* spp. *Inter. Soc. Hortic. Sci.* 825:363-370.
- Turner, B. L. 1996. The comps of México- a systematic account of the family Asteraceae. *In: Adams, R. P. and Turner, B. L. (Eds.). Tageteae and Anthemideae. Phytologia Memoirs. Texas. Chapter 6. 10:1-93.*
- Villa, A.; Pérez, R.; Morales, H. A.; Basurto, M.; Soto, J. M. and Martínez, E. 2015. Current situation of *Fusarium* spp. in the control and evaluation of the antifungal activity on vegetables extracts. *Acta Agron.* 64(2):194-205.
- Villarreal, J. A. 2003. Familia Compositae. Tribu Tageteae. Flora del Bajío y de regiones adyacentes. Fascículo 113. Instituto de Ecología AC. Pátzcuaro, Michoacán. México. 85 p.
- Villavicencio, M. A.; Pérez, B. E. y Gordillo, A. J. 2010. Plantas tradicionalmente usadas como plaguicidas en el Estado de Hidalgo, México. *Polibotánica.* 30:193-238.
- Zygadlo, J. A.; Guzmán, C. A. and Grosso, N. R. 1994. Antifungal properties of the leaf oils of *Tagetes minuta* L. and *T. filifolia* Lag. *J. Essential Oil Res.* 6(6):617-621.