



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

**Centro Interdisciplinario de Investigación
para el Desarrollo Integral Regional
CIIDIR IPN UNIDAD MICHOACÁN**

**EXTRACTOS CRUDOS DE RUDA (*Ruta graveolens*) PARA EL
CONTROL IN VITRO DE HONGOS CAUSANTES DE
ENFERMEDADES DEL MAÍZ CRIOLLO**

T E S I S
QUE PARA OBTENER EL GRADO DE:
MAESTRA EN CIENCIAS EN
PRODUCCIÓN AGRÍCOLA SUSTENTABLE

PRESENTA:
MARÍA GUADALUPE SILVA RAMOS

DIRECTORES:
DR. LUIS FERNANDO CEJA TORRES
DR. SIGIFREDO LÓPEZ DÍAZ

JIQUILPAN DE JUÁREZ, MICHOACÁN, MÉXICO, DICIEMBRE 2021



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 12:00 horas del día 17 del mes de diciembre del 2021 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Posgrado del CIIDIR IPN Unidad Michoacán para examinar la tesis titulada:

Extractos crudos de ruda (*Ruta graveolens*) para el control *in vitro* de hongos causantes de enfermedades del maíz criollo del (la) alumno (a):

Apellido Paterno:	Silva	Apellido Materno:	Ramos	Nombre (s):	María Guadalupe
-------------------	-------	-------------------	-------	-------------	-----------------

Número de registro: B 1 9 0 9 9 9

Aspirante del Programa Académico de Posgrado: Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Una vez que se realizó un análisis de similitud de texto, utilizando el software antiplagio, se encontró que el trabajo de tesis tiene 31 % de similitud. **Se adjunta reporte de software utilizado.**

Después que esta Comisión revisó exhaustivamente el contenido, estructura, intención y ubicación de los textos de la tesis identificados como coincidentes con otros documentos, concluyó que en el presente trabajo SI NO SE CONSTITUYE UN POSIBLE PLAGIO.

JUSTIFICACIÓN DE LA CONCLUSIÓN:

El porcentaje de similitud se localiza principalmente en las metodologías, las cuales se encuentran adecuadamente planteadas y descritas en el documento de tesis. Asimismo, parte de las similitudes cuentan con sus respectivas citas de los autores.

****Es responsabilidad del alumno como autor de la tesis la verificación antiplagio, y del Director o Directores de tesis el análisis del % de similitud para establecer el riesgo o la existencia de un posible plagio.**

Finalmente y posterior a la lectura, revisión individual así como el análisis e intercambio de opiniones, los miembros de la Comisión manifestaron **APROBAR** **SUSPENDER** **NO APROBAR** la tesis por **UNANIMIDAD** o **MAYORÍA** en virtud de los motivos siguientes:

Se cumplió con los objetivos y apartados establecidos en el proyecto de investigación, referidos a la utilización de extractos de ruda para el control de hongos fitopatógenos que afectan el cultivo de maíz.

COMISIÓN REVISORA DE TESIS

Dr. Luis Fernando Ceja Torres
Director de Tesis
Nombre completo y firma

Dr. José Luis Montañez Soto
Nombre completo y firma

M. en C. Ernesto Oregel Zamudio
Nombre completo y firma

Dr. Sigifredo López Díaz
2º Director de Tesis (en su caso)
Nombre completo y firma

Dr. José Roberto Medina Medrano
Nombre completo y firma

Dra. María Valentina Angoa Pérez
Nombre completo y firma





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de México, D.F. el día 15 del mes de Diciembre del año 2021, la que suscribe María Guadalupe Silva Ramos alumno(a) del Programa de Maestría en Producción agrícola Sustentable, con número de registro B190999, adscrito(a) al **C.I.I.D.I.R I.P.N Unidad Michoacán**, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) **Dr. Luis Fernando Ceja Torres y Dr. Sigifredo López Díaz** cede los derechos del trabajo titulado **Extractos crudos de ruda (*Ruta graveolens*) para el control in vitro de hongos causantes de enfermedades del maíz criollo**, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones lfceja@ipn.mx, slopezd@ipn.mx, msilvar1900@alumno.ipn.mx. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

María Guadalupe Silva Ramos

AGRADECIMIENTOS

Manifiesto un profundo agradecimiento al Instituto Politécnico Nacional y al CIIDIR Unidad Michoacán, por darme la oportunidad de expandir mis conocimientos y desarrollarme en el ámbito científico, así como el crecimiento profesional obtenido; de la misma manera, el apoyo económico que se me otorgó por parte del Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), ya que sin el no sería posible este logro.

Un agradecimiento especial para mis asesores de tesis el Dr. Luis Fernando Ceja Torres, por todo su apoyo académico y toda la paciencia del mundo al guiarme en este corto lapso del desarrollo de la tesis y al Dr. Sigifredo López Díaz por todo su conocimiento en esta área.

Para finalizar agradezco a mis amigos y familia por el apoyo moral, ya que han aportado mucha de la motivación a lo largo de este camino.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis en especial a mi amiga Lidia Martínez Contreras por creer en mí siempre y hasta el final de este proyecto y darme el apoyo emocional necesario y en todo momento, te agradezco de todo corazón por ayudarme a mi aporte de tesis, tu ayuda fue fundamental.

ÍNDICE GENERAL

	Página
Índice de tablas.....	iii
Índice de figuras.....	iv
RESUMEN	vi
ABSTRACT	vii
I. INTRODUCCIÓN	1
II. ANTECEDENTES	4
2.1. Importancia del maíz en la Meseta Purépecha.....	4
2.2. Problemática por el uso de agroquímicos.....	5
2.3. Extractos naturales, una alternativa biofungicida.....	6
2.4. Principales enfermedades fungosas del maíz de importancia económica	8
2.5. <i>Ruta graveolens</i> y sus componentes.....	9
2.6. Metabolitos secundarios.....	12
2.7. <i>Ruta graveolens</i> y su acción antifúngica.....	13
2.8. Quitosano y extractos vegetales con acción antifúngica.....	15
III. JUSTIFICACIÓN	18
IV. OBJETIVOS	20
4.1. Objetivo general.....	20
4.2. Objetivos específicos.....	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS	21
5.1. Obtención de plantas de ruda y tejido enfermo del maíz.....	21
5.2. Aislamiento de hongos fitopatógenos del maíz.....	21
5.3. Extracto etanólico de ruda.....	22
5.4. Extracción de aceite esencial de ruda (AER).....	22
5.5. Obtención de nanopartículas de quitosano.....	22
5.6. Actividad inhibitoria de extractos de ruda.....	23
5.7. Identificación de metabolitos secundarios del aceite de ruda.....	23
5.8. Variables en estudio.....	23
5.9. Análisis estadístico.....	24

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	25
6.1 Mancha de asfalto ó complejo de la mancha de asfalto (CMA).....	25
6.2. Tizón foliar.....	27
6.3. Pudrición de raíces.....	29
6.4. Inhibición de hongos “ <i>in vitro</i> ”.....	31
6.4.1. Porcentaje de inhibición del hongo <i>Coniothyrium phyllachorae</i>	31
6.4.2. Porcentaje de inhibición del hongo <i>Exserohilum turcicum</i>	36
6.4.3. Porcentaje de inhibición del hongo <i>Fusarium oxysporum</i>	40
6.5. Composición química del aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i>	41
VII. CONCLUSIONES	47
VIII. BIBLIOGRAFÍA	48

ÍNDICE DE TABLAS

	Página
Tabla 1. Composición química del aceite esencial de <i>Ruta graveolens</i> L.....	11
Tabla 2. Estudio comparativo de aceites esenciales de <i>Ruta graveolens</i> con resultados previos.....	12
Tabla 3. Actividad antifúngica del extracto etanólico y aceite esencial de ruda (AER) contra el hongo <i>Coniothyrium phyllachorae</i>	32
Tabla 4. Actividad antifúngica del extracto etanólico y aceite esencial de ruda (AER) contra el hongo <i>Exserohilum turcicum</i>	36
Tabla 5. Actividad antifúngica del extracto etanólico y aceite esencial de ruda (AER) contra el hongo <i>Fusarium oxysporum</i>	40

ÍNDICE DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Síntomas de mancha de asfalto, a) manchas cloróticas redondas al inicio del síntoma, b) unión de las manchas en el tejido foliar, en estado avanzado de la enfermedad.....	26
Figura 2. <i>Coniothyrium phyllachorae</i> , a) cepa de coloración verde grisácea, b) estructuras fúngicas.....	27
Figura 3. Síntomas de tizón foliar, a) lesiones alargadas de coloración café, b) deficiente llenado de grano, en estado avanzado de la enfermedad.....	28
Figura 4. <i>Exserohilum turcicum</i> , a) cepa de color verde grisácea, b) estructuras fúngicas.....	29
Figura 5. Raíces necróticas afectadas por <i>Fusarium oxysporum</i> (a), planta marchita provocada por el mismo hongo (b).....	30
Figura 6. <i>Fusarium oxysporum</i> , a) cepa de color blanco con bordes y fondo de color purpura, b) estructuras fúngicas con micro y macro conidios.....	31
Figura 7. Actividad antifúngica del extracto etanólico de ruda con 10 µL, contra <i>Coniothyrium phyllachorae</i> (a, b, c, d), con fungicida benomilo (e), etanol (f) y hongo testigo (g).....	33
Figura 8. Actividad antifúngica del aceite esencial de ruda con 3 µL, contra <i>Coniothyrium phyllachorae</i> (a, b, c, d), con fungicida benomilo (e) y hongo testigo (f).....	33
Figura 9. Actividad antifúngica del quitosano + aceite esencial de ruda contra <i>Coniothyrium phyllachorae</i> (a, b, c, d), quitosano (f, g, h, i) y hongos testigos (e, j).....	35
Figura 10. Actividad antifúngica del extracto etanólico de ruda con 10 µL, contra <i>Exserohilum turcicum</i> (a, b, c, d), con fungicida benomilo (e), etanol (f) y hongo testigo (g).....	37

Figura 11. Actividad antifúngica del aceite esencial de ruda con 3μL, contra <i>Exserohilum turcicum</i> (a, b, c, d), con fungicida benomilo (e) y hongo testigo (f).....	38
Figura 12. Actividad antifúngica del quitosano + aceite esencial de ruda, contra <i>Exserohilum turcicum</i> (a, b, c, d), quitosano ((f, g, h, i) y hongos testigo (e, j).....	39
Figura 13. Actividad antifúngica del extracto etanólico de ruda, contra <i>Fusarium oxysporum</i> (a, b, c, d), con fungicida benomilo (e), etanol (f) y hongo testigo (g).....	41
Figura 14. Actividad antifúngica del aceite esencial de ruda con 3 mL, contra <i>Fusarium oxysporum</i> (a, b, c, d), con fungicida benomilo (e) y hongo testigo (f).....	41
Figura 15. Actividad antifúngica del quitosano + aceite esencial de ruda, contra <i>Fusarium oxysporum</i> (a, b, c, d), quitosano (f, g, h, i) y hongos testigo (e, j).....	42
Figura 16. Cromatogramas del aceite esencial de ruda, empleando UHPLC-ESI.....	44

RESUMEN

El estado de Michoacán es parte del centro de origen y domesticación del maíz, el cual cuenta con amplia diversidad genética de maíces criollos, que fueron adaptados a ambientes húmedos. En la localidad de Cherán, Michoacán, el maíz criollo representa un soporte económico, social y religioso de alto impacto, el cual ha sufrido pérdidas en el rendimiento a causa de enfermedades fungosas. El método de control más utilizado es el químico; pero se corre el riesgo de que los hongos involucrados puedan crear resistencia a estos productos. Por lo que se ha sugerido el extracto de ruda (*Ruta graveolens*), como una alternativa sustentable para el control de hongos que afectan el maíz. Por esta razón, se realizaron ensayos “*in vitro*”, para determinar el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial, por efecto de los extractos de *R. graveolens* obtenidos por maceración, así como su aceite esencial obtenido mediante la técnica de arrastre por vapor. Con éste último, también se formó un compósito en nanopartículas de quitosano grado industrial. El aceite esencial se caracterizó empleando espectrometría de masas con el cromatógrafo de Líquidos de Ultra Alta Resolución con ionización por electrospray (UHPLC-ESI). Los hongos que se aislaron e identificaron a partir de plantas enfermas de maíz fueron: *Coniothyrium phyllachorae* que causa la mancha de asfalto, *Exserohilum turcicum* que ocasiona el tizón foliar y *Fusarium oxysporum* que provoca la pudrición de raíz y tallo. La ruda obtuvo mejor actividad inhibitoria contra los 3 hongos al utilizar únicamente el aceite esencial, obteniendo resultados de 100% contra *C. phyllachorae*, 96 – 100% contra *E. turcicum* y 86 – 100% en el caso de *F. oxysporum*. El fungicida benomilo fue bueno para inhibir *C. phyllachorae* y *F. oxysporum*, pero no contra *E. turcicum*; mientras que al utilizar quitosano con aceite esencial, la inhibición en el desarrollo micelial de los hongos fue de 58% – 100%. Estos resultados abren nuevas perspectivas a la utilización de la *Ruta graveolens*, para el control de este tipo de fitopatógenos causantes de enfermedades del maíz. El principal componente y mayoritario del aceite esencial de *R. graveolens*, obtenida de la región de la meseta tarasca, es el Cinnamoyl chromone (nombre IUPAC: 2-(3-fenilprop-2-enoil)cromen-4-ona).

Palabras clave: *Ruta graveolens*, maíz, extractos, hongos, quitosano

ABSTRACT

The state of Michoacán is part of the center of origin and domestication of corn, which has a wide genetic diversity of Native maize, which was adapted to humid environments. In the Cherán Michoacán community, creole corn represents a high impact economic, social and religious support, which has suffered yield losses due to fungal diseases. The most commonly used control method is the chemical one; but there is a risk that the fungi involved can create resistance to these products. Therefore, rue extract (*Ruta graveolens*) has been suggested as a sustainable alternative for the control of fungi that affect corn. For this reason, "in vitro" tests were carried out to determine the percentage of inhibition of mycelial growth, due to the effect of *R. graveolens* extracts obtained by maceration, as well as its essential oil obtained by the steam dragging technique. With the latter, a composite was also formed in industrial-grade chitosan nanoparticles. The essential oil was characterized using mass spectrometry with the Ultra High Resolution Liquid Chromatograph with electrospray ionization (UHPLC-ESI). The fungi that were isolated and identified from diseased corn plants were: *Coniothyrium phyllachorae*, which causes tar spot, *Exserohilum turcicum*, which causes leaf blight of maize, and *Fusarium oxysporum*, which causes root and stem rot. Rue obtained better inhibitory activity against the 3 fungi when using only the essential oil, obtaining results of 100% against *C. phyllachorae*, 96 – 100% against *E. turcicum* and 86 – 100% in the case of *F. oxysporum*. The fungicide benomyl was good at inhibiting *C. phyllachorae* and *F. oxysporum*, but not against *E. turcicum*; while when using chitosan with essential oil, the inhibition in the mycelial development of fungi was 58% – 100%. These results open new perspectives to the use of *Ruta graveolens*, for the control of this type of phytopathogens that cause maize diseases. The main and majority component of the essential oil of *R. graveolens*, obtained from the Tarascan plateau region, is Cinnamoyl chromone (IUPAC name: 2-(3-phenylprop-2-enoyl)cromen-4-one).

Keywords: *Ruta graveolens*, corn, extracts, fungi, chitosan.

I. INTRODUCCIÓN

El maíz además de ser el grano con mayor consumo entre los mexicanos representa en términos económicos un tema relevante, tanto para los participantes del mercado, como para el agricultor que lo utiliza como autoconsumo. La relación entre los mexicanos y el maíz es milenaria y está íntimamente asociada a la evolución de las civilizaciones mesoamericanas; desde su domesticación ha constituido la base de nuestra alimentación, su uso se diversifica desde granos y forraje, los cuales constituyen la base para la elaboración de bastos alimentos, hasta la industria farmacéutica y manufacturera. Se estima que existen más de 4 mil productos asociados al maíz (Venegas, 2016).

Las plantas de maíz pueden ser infectadas a lo largo de su ciclo de vida o en el almacenamiento por diversos agentes externos tales como de insectos y enfermedades que pueden dañar sus diferentes partes y, de este modo, interferir con su desarrollo normal y reducir los rendimientos y la calidad del grano. Sin embargo, a pesar de que hay un gran número de especies de insectos que atacan a la planta de maíz, son relativamente pocos los que causan daños de importancia económica, sobre todo se intensifica la plaga si se cuenta con monocultivos (FAO, 2001).

Actualmente las estrategias de control disponibles se basan prácticamente en el uso exclusivo del control químico, aunque se está investigando alternativas que considere el uso del control mecánico, biológico y cultural, como es el uso de hongos entomopatógenos, de variedades de plantas resistentes, de plantas tóxicas o atractivas, el uso de feromonas de cubanoides, etc. (Zerbino & Fassio, 1995).

En México, la agricultura campesina e indígena ha venido practicando el sistema de cultivo milpa, que integra al maíz, frijol, calabaza, chile y haba, en razón de que ha demostrado una alta capacidad de resistencia a condiciones adversas, así como de aseguramiento de las familias para su alimentación y de los animales, y el aumento de nutrientes de los suelos donde lo han implementado cada cultura a su manera ,

de acuerdo a sus saberes y tradiciones, selecciona las plantas y las combinan de forma personal a la milpa, con su sello particular, en la selección de las variedades, manejo del sistema agrícola y procesamiento de productos, así como en la organización social en torno a los cultivos (Gómez *et al.*, 2018).

Según (Alieri & Toledo, 2010) para mantener un entorno agroecológico se menciona que una de las bases para lograrlo es precisamente el conjunto de conocimientos y técnicas que desarrollaron estos agricultores a partir de sus procesos de experimentación y el rescate de saberes tradicionales, así como los procesos sociales basados en la participación de la comunidad.

En la mayoría de los sistemas agrícolas Purépechas, son personas mayores de edad generalmente con un nivel de educación básica, los cuales mantienen otra actividad además de la agricultura, por ejemplo, la ganadería, producción artesanal o forestal, sin embargo, hay muy pocos que cuentan con educación superior. Estos agricultores han mantenido la misma semilla de los 10 a 50 años, lo que muestra la gran protección hacia su riqueza en sus variedades de maíz. En los Andes se evidenció que los agricultores con arraigo cultural indígena mayor invariablemente conservan agrobiodiversidad mayor en sus campos (Orozco *et al.*, 2017).

De acuerdo con Alarcón (2009), menciona que los indígenas Michoacanos poseen alrededor de 50 variantes distintas de maíz, resultado de la variabilidad climática, cuyo sistema de clasificación del maíz de este grupo indígena, el primer nivel está relacionado al origen de la semilla y los ciclos de vida. El segundo nivel es con base al color del grano. Además, las diferentes partes de la planta del maíz tienen su nombre al igual que sus diferentes estadios de desarrollo. Los P´urhepechas siembran en diferentes momentos del ciclo anual y diferentes espacios geográficos por lo que se permite contar con grano en todo el año. Por otro lado, los bosques escasean y la producción de maíz es cada vez más dependiente de los insumos agroindustriales llevándolo paulatinamente al abandono debido a los bajos rendimientos.

En este caso una de las alternativas para dar una solución más amigable con el medio ambiente, se planea extraer y posteriormente aplicar un extracto natural de ruda (*Ruta graveolens*) que es una planta herbácea perenne de 50-90 cm de altura, con tallos redondos y follaje verde azulado. Es frecuentemente usada por sus propiedades medicinales; y se pretende utilizarla para el manejo y control de enfermedades del maíz criollo específicamente en la comunidad Indígena de Cherán, Michoacán.

En los cuatro barrios en que se divide la localidad de Cherán, las personas son conocedoras de la gastronomía auténtica indígena, y es precisamente donde se utiliza el maíz, considerado como sagrado, ya que se bendice y se utiliza como principal adorno para las imágenes que se veneran en la población, al grado de que es común la expresión de la gente “Teniendo maíz, todo está resuelto” (Ángeles, 2008).

II. ANTECEDENTES

2.1. Importancia del maíz en la Meseta Purépecha

En gran medida el cuidado de la agricultura Purépecha se debe a su fuerte identidad y trabajo colectivo en diversas formas culturales suplementarias, simbólicas y rituales, que refuerzan los atributos puestos en juego al momento de definir la identidad: desde los ostensibles, tales como la vestimenta y la comida, entre otros, hasta la participación en las obligaciones de la vida cívico-religiosa y, por supuesto, el ser purépecha por compartir expresiones más sutiles de comunitarismo, como un sentimiento o sentido de solidaridad y un determinado comportamiento, regulado por la sociedad, que da contenido vital a la comunidad agraria: “el costumbre”. Se entiende así que los emigrantes purépechas retornen a su comunidad con propósitos de actuación ritual cuando menos una vez por año. El lazo que une a la comunidad es tan fuerte que su forma de organización ha persistido a través de los años. Además de que culturalmente es algo más que la tierra confirmada o restituida a la comunidad por la legalidad agraria (Vázquez, 2003).

En el área Purépecha la característica es forestal en sus partes altas y montañosas, y agrícola en las tierras planas o de pendientes suaves. En efecto, la producción de alimentos en el área purépecha tradicionalmente se ha basado en el uso múltiple de los ecosistemas y en la complementariedad ecológica de cultivos. Sin embargo, estas estrategias han confrontado desde hace varias décadas los efectos del desarrollo regional promovido por la monitorización creciente de la economía, la elevación demográfica y la destrucción de los recursos naturales.

El maíz es el principal cultivo en los pueblos serranos; en algunos pueblos como San Lorenzo y Capacuaro la gente conoce catorce variedades de maíz adaptadas a diferentes tipos de suelos y altitudes, así como a especialidades culinarias y usos ceremoniales. Algunos otros intercalados son los frijoles, calabazas y el trigo. En efecto la agricultura de la Meseta conserva varios saberes tradicionales, en donde la producción se basa en los ecuaros o del mercadeo local de productos, con siembras de hasta 3 diferentes variedades del maíz (Tapia, 1989).

2.2. Problemática por el uso de agroquímicos

A través de los años y la transformación de la vida humana al sedentarismo y al cambio del cultivo en gran producción que transformo a la agricultura en monocultivos desde los años 60s por la revolución verde (Ceccon, 2008), surge el problema del uso de químicos para el control de plagas y enfermedades. En la actualidad, este uso irracional de químicos para la protección de varios cultivos de interés agrícola que son atacados por diversos patógenos; propicia la contaminación del medio ambiente. Por ejemplo, los hongos fitopatógenos y otros microorganismos, están involucrados en las enfermedades comunes de las plantas y estos patógenos se han tratado con diversos fungicidas tales como hidroxianilidas, anilino pirimidinas y azoles, entre otros; sin embargo, el uso irracional ha provocado la resistencia a las mismas (Jiménez *et al.*, 2018).

El abuso indiscriminado de químicos ha ocasionado que los residuos de estos tóxicos ingresen a fuentes hídricas con tal velocidad, que excede la capacidad que tiene el ecosistema para regenerarse; en consecuencia, dicha contaminación se asocia a las mutaciones por la exposición a dosis pequeñas y en ocasiones inician un proceso carcinogénico (Tobón y López, 2011).

Es cierto que los cultivos de maíz son fundamentales en la producción agropecuaria para la alimentación directa y los derivados de sus granos, en donde se identificaron que los residuos de químicos pueden estar incluidos en los granos de maíz ya en almacenamiento (Strada *et al.*, 2012), por lo tanto, se puede decir que la inocuidad de los alimentos se está viendo afectada por los químicos inclusive después de su cosecha.

2.3. Extractos naturales, una alternativa biofungicida

En busca de una agricultura sostenible se ha encontrado una estrategia para la producción de alimentos inocuos, una de ellas es la elaboración de biopreparados, para potenciar sus principios activos sin generar desequilibrios en los agroecosistemas en los que se aplican, los agricultores pueden utilizarlo en sus casas o huertas utilizando ingredientes y materiales disponibles, preferentemente en su entorno, o de bajo costo y fácil adquisición (FAO, 2010).

De igual manera se ha mejorado en la obtención de extractos naturales que actúan como insecticidas y/o plaguicidas, con fines de mantener un control sobre el cultivo ante las plagas; un caso específico es la aplicación de los diversos extractos de plantas como candidatos para el control integrado de la mosquita blanca incluida el extracto etanólico de la ruda obteniendo resultados efectivos como insecticida, esto como alternativa a los productores (Romero *et al.*, 2015).

Diversos estudios han demostrado que las plantas poseen componentes capaces de inhibir el crecimiento de algunos hongos fitopatógenos. Los extractos de estas plantas contienen diversos compuestos que pueden ser tóxicos y que se conservan en las vacuolas de las células vegetales, estos compuestos secundarios de las plantas dependerán del ambiente en que se desarrolle y los patógenos a los cuales se ha expuesto (Jiménez-Reyes *et al.*, 2019). Por tal motivo, se han ido desarrollando estudios con diversos extractos para combatir hongos fitopatógenos.

Uno de los patógenos más comunes en las plantas, hortalizas y frutas es un hongo que forma un moho gris *Botrytis cinerea* causante de la pudrición. En el combate de este hongo un estudio realizado con el extracto de *L. cuneifolia* NADES probada “in vitro” e “in vivo” en uva comercial. Se obtuvo una alta inhibición de *Botrytis cinerea* de hasta un 70% y 80% en relación con el tratamiento químico, siendo los tratamientos eficientes a una concentración “in vitro” al 2% y al 10% (Boiteux *et al.*, 2019).

En otro estudio se evaluó el efecto fungicida *in vitro* del gel de aloe vera contra el hongo fitopatógeno *Mycosphaerella fijiensis*, causante de la enfermedad foliar Sigatoka negra en cultivos de banano; en este caso se utilizaron 2 controles comerciales para su comparación, un fungicida químico comercial (Propiconazol, PC) y un biofungicida comercial (*Trichoderma sp.*). En los resultados el gel mostró ser medianamente efectivo, inhibiendo el 44.84% en cuanto al testigo químico de 73.10%; por lo tanto, según Jaramillo *et al.* (2017) es un extracto vegetal adecuado para el control de la enfermedad Sigatoka negra.

Entre otros análisis de múltiples plantas, se evaluaron diferentes pruebas "*in vitro*" de extractos metanólicos de moringa, gobernadora, aguacate, cola de caballo, boldo, gordolobo, prodigiosa, romero y costumate contra *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, los cuales se incorporaron 500 µL de cada extracto al medio PDA y se midió el crecimiento micelial cada 24 horas. Los resultados indicaron que, de los 9 extractos utilizados, la gobernadora (*Larrea tridentata*), resultó la más efectiva contra los 3 hongos, seguida del extracto del romero. Por lo que se puede asumir, que los extractos vegetales tienen efecto fungicida para combatir algunos patógenos de interés agrícola (Rodríguez *et al.*, 2020).

Mientras tanto los principales resultados de la evaluación de efecto biofungicida del estudio realizado por Fajardo-Franco (2020) con *Azadirachta indica*, *Melaleuca alternifolia* y la combinación de *Bacillus subtilis* con *A. indica* y *Syzygium aromaticum* para el control de la roya del café causada por *Hemileia vastatrix*; arrojaron resultados positivos sobre la disminución de la infección del hongo en un 20.9 % de incidencia y un 35.4 % en severidad a dos aplicaciones en comparación con el testigo en condiciones de campo del biofungicida a partir de *Melaleuca alternifolia*.

Los extractos vegetales como los aceites esenciales, metabolitos secundarios y componentes activos de las plantas y sus derivados se han evaluado en diferentes modelos "*in vitro*" e "*in vivo*", al igual que el proceso de obtención es variable; entre ellas las técnicas con arrastre de vapor, extracción de soxhlet al igual que la utilización de diferentes solventes. Hasta la fecha según Mesa *et al.* (2019)

mencionaron que se han explorado alrededor de 6000 especies de plantas; de ellas, 2500 especies son un potencial activo en contra de algún tipo de enfermedades y plagas.

En consecuencia, debido a que los resultados de las diversas investigaciones en su mayoría son resultados positivos contra los patógenos seleccionados de cada estudio, se considera que los extractos naturales pueden ser una alternativa de adopción sustentable que sustituya en un futuro a los fungicidas químicos. Por otra parte, es fundamental no solo la sustitución de químicos sino la capacitación y sensibilización del personal a cargo y un manejo integrado del control de fitopatógenos. También, es necesario la realización de investigaciones posteriores sobre los efectos del compuesto de los diferentes extractos naturales para la determinación e identificación de los competentes activos que inciden sobre los patógenos para el desarrollo de biofungicidas eficaces.

2.4. Principales enfermedades fungosas del maíz, de importancia económica

Las manchas foliares en las hojas del maíz causadas por la mancha de asfalto y tizón foliar por diferentes fitopatógenos reducen la fotosíntesis, producidas por las condiciones ambientales tales como la alta humedad, exceso de nitrógeno y continuos ciclos de cultivos; la compilación de estos factores reduce la productividad del maíz afectando el llenado de grano (Román *et al.*, 2018). La enfermedad fúngica del tizón foliar puede tener mayores incidencias en condiciones favorables entre temperaturas de 18 y 25 °C y una humedad relativa del 50%, que pueden afectar al maíz en sus primeras etapas de desarrollo ya sean estas de temporal o de riego (Martínez *et al.*, 2019). En cuanto a la mancha de asfalto la cual es producida por la interacción sinérgica de tres hongos: *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y el hiperparásito *Coniothyrium phyllachorae*, se presenta mayormente en las zonas frescas u húmedas y suelos arcillosos en las que se acumule humedad, las plantas susceptibles a medida que estos 3 hongos se fusionen producirán una toxina que mata por completo el tejido vegetal de la planta llevándolo a una germinación temprana y poco llenado de grano, llegándose a perder más del 50% del rendimiento, y afectar cerca de 800,000 ha, siendo el estado de Michoacán una

entidad afectada económicamente por esta enfermedad, especialmente en la producción de grano y la calidad del forraje. Para esta enfermedad no existen maíces comerciales inmunes en el mercado, por lo que se les aplica fungicidas comerciales (Estrada, 2017).

Otra enfermedad de importancia económica es causada por *Fusarium* sp. un microorganismo con gran diversidad de especies, formas y razas que constituye un grupo de hongos filamentosos ampliamente distribuidas en el suelo colonizando, tanto partes aéreas y subterráneas, generando síntomas de amarillez, marchitez y finalmente pudrición hasta la muerte del cultivo, los cuales afectan poblaciones tanto comerciales como nativas de maíz. Este fitopatógeno sintetiza metabolitos secundarios denominados micotoxinas que son de alta toxicidad para la salud humana y animal (Velarde *et al.*, 2018).

2.5. *Ruta graveolens* y sus componentes

Es un arbusto leñoso de entre 30 - 60 cm de altura, de fuerte olor característico, con flores de color amarillo verdoso que forman pequeños ramilletes, cuenta con un fruto que es una especie de cápsula con cinco lóbulos. Esta especie pertenece a la familia Rutaceae. Antiguamente utilizado como medicina tradicional su lugar de origen es Europa meridional, Asia Menor; tiene un fruto capsula de color negro con numerosas semillas en forma arriñonada. Florece durante la primavera y en el verano las hojas son de color azul verdosa y su gusto es amargo, caliente y acre. Es una planta fácil de encontrar en tierras sin cultivo ya que no se requiere condiciones especiales para su reproducción (Sovová *et al.*, 2016).

El análisis cromatográfico de capa fina del extracto etanólico de *Ruta graveolens*, ha demostrado la presencia de fitoquímicos y antioxidantes fenólicos, flavonoides, saponinas y alcaloides con capacidad inhibitoria de 2 enzimas inflamatorias, utilizando los extractos etanol agua de las hojas de la *Ruta graveolens* con el método de yema de huevo y la inhibición de la lipoxigenasa (LOX) *in vitro* (Giresha *et al.*, 2015).

En un análisis realizado por Sovová *et al.* (2016) se obtuvo cierto contenido de cumarinas y ceras de las partes aéreas de la ruda común, mediante el método de Soxhlet, en el cual en análisis cromatográfico de gases se obtuvo que uno de los componentes con mayor porcentaje de contenido fue 2-undecanona, ruta marina, furanocumarinas psoraleno, xantotoxina y bergapten, y n-alcanos de cadena larga hentriacontano y tritriacontano en diferentes porcentajes individuales los cuales se almacenan en cavidades secretoras. Mientras que los componentes de las ceras cuticulares encontradas en las hojas, tallos y flores fueron detectados los alcanos de cadena larga hentriacontano y tritriacontano entre otros como ácidos grasos, esteroides y tocoferoles.

En una evaluación del contenido de compuestos fenólicos entre plantas silvestres y cultivadas de la *Ruta chalepensis* mostraron un alto contenido de polifenoles, flavonoides y taninos; sin embargo, en ambos casos no hubo diferencias significativas, por lo tanto, se puede decir que este no afecta sus composiciones químicas al ser domesticada. En cuanto a la identificación de compuestos fenólicos mediante el análisis de HPLC mostraron alrededor de 20 compuestos fenólicos, de los cuales fueron 12 ácidos fenólicos con tres ácidos hidroxicinámicos, nueve ácidos hidroxibenzoicos y siete flavonoides en donde predominan el ácido vanílico y la cumarina siendo similares en ambos casos (Ouerghemmi *et al.*, 2016).

Los componentes del aceite esencial de la *Ruta chalepensis* de tres diferentes regiones de palestina: Hebrón, Jerusalén y Jenin en donde los constituyentes eran similares, siendo las principales 2-undecanona y la 2-nonanona; mientras que en su actividad bacteriana y microbiana fueron un poco distintas, estas pudieron ser afectadas por la ubicación geográfica y el medio ambiente en donde se desarrollaron. Los resultados fueron que el aceite esencial de Jerusalén y Hebrón con un clima moderado a seco, tienen mayor actividad antibacteriana debido a su alto contenido de acetato de linalilo, mientras que el aceite esencial de Jenin de clima húmedo y caluroso fue mejor en la actividad antifúngica (Jaradat *et al.*, 2017).

En la composición de aceite esencial de los frutos de la *Ruta graveolens*, se identificaron 43 componentes obtenidas mediante hidrodestilación, de los cuales las

cetonas son las más abundantes en un 69.2%, en un periodo de tiempo de 30 a 60 min de tiempo óptimo. Las cetonas de las plantas utilizadas como feromonas e insecticidas naturales también poseen actividad antimicrobiana, en cuanto a *Ruta graveolens* se cree que todas sus partes contienen cetonas (Reddy y Al-Rajab, 2016).

Nagarjuna *et al.* (2016), utilizaron las partes áreas de la *Ruta graveolens* mediante hidrodestilación, en donde se determinaron los componentes químicos en el aceite esencial utilizando GC y GC-MS. En lo resultados obtenidos se caracterizaron un total de 13 constituyentes químicos (Tabla 1) de los cuales predominan en orden decreciente las cetonas alifáticas 2-undecanona (43,66%), 2-nonanona (16,09%), 2-tridecanona (2,59%), 2-decanona (2,58%) y 2-dodecanona (2,23%).

Tabla 1. Composición química del aceite esencial de *Ruta graveolens* L.

RRI	Chemical constituent	M.F	%
1096	2-Nonanone	C ₉ H ₁₈ O	16.09
1194	2-Decanone	C ₁₀ H ₂₀ O	2.58
1294	2-Undecanone	C ₁₁ H ₂₂ O	43.66
1303	2-Undecanol	C ₁₁ H ₂₄ O	2.19
1315	2-Acetoxy tetradecane	C ₁₆ H ₃₂ O ₂	14.49
1331	1-Methyl-5,6-divinyl-1-cyclohexene	C ₁₁ H ₁₆	3.38
1397	2-Dodecanone	C ₁₂ H ₂₄ O	2.23
1498	2-Tridecanone	C ₁₃ H ₂₆ O	2.59
1552	Nonyl cyclopropanecarboxylate	C ₁₃ H ₂₄ O ₂	9.22
1598	2,7-Dimethyl-3,6-dimethylene-1,7-octadiene	C ₁₂ H ₁₈	0.63
1828	Ethyl piperonyl acetate	C ₁₂ H ₁₄ O ₄	0.43
1866	1,5-Isobutyl-1,3-benzodioxole	C ₁₁ H ₁₄ O ₂	0.72
2016	Methyl-3-methylene-1,2,3,3a,4,4a,4b,5,6,10b-decahydrocyclopropa[3,4]cyclohepta[1,2a]naphthalen-8-yl ether	C ₁₈ H ₂₂ O	1.79
Total			100.0

Fuente: (Reddy y Al-Rajab, 2016).

De la misma manera se realizó una comparación de los porcentajes de la composición principal del aceite esencial de estudios anteriores, en los cuales se presentan resultados similares a los obtenidos por (Reddy y Al-Rajab, 2016) los cuales se presentan en la tabla 2.

Tabla 2. Estudio comparativo de aceites esenciales de *Ruta graveolens* con resultados previos.

Major compounds	Percentage (%)	Place	Reference
Undecanone-2, 2-Nonanone, 2-Acetoxy tetradecanone, Nonyl cyclopropanecarboxylate	43.66, 16.09	India	Present study
	14.49, 9.22		
2-Nonanone, Chalepentin, 2-Undecanone, Chalepin, Bergapten, Psoralen, Hexatriacontane	8.97, 7.11, 6.81, 6.66, 5.54, 5.32, 5.14	Colombia	Stashenko et al. (2000)
2-Undecanone, 2-Heptanol acetate, 1-Dodecanol, Geyrene, 2-Nonanone	33.9, 17.5, 11.0, 10.4, 8.8,	North of Iran	Soleimani et al. (2009)
2-Undecanone, 2-Nonanone, Pregeijerene	50.93, 16.85, 8.72	Mérida	Janne Rojas et al. (2011)
2-Undecanone, 2-Nonanone, Pregeijerene	37.80, 28.28, 6.8	Miranda states	
2-Undecanone 2-Nonanone	46.8, 18.8,	Italy	De Feo et al., 2002
2-Undecanone 2-Nonanone	55.4, 21.62	Algeria	Farah Haddouchi et al. (2013)
2-Undecanone 2-Nonanone, 2-Acetyl-tridecane	46.15, 27.01	China	Tang et al. (2011)
	12.73		
2-Undecanone 2-Nonanone, 2-Nonylacetate, Xanthotoxin	30.73, 18.06	Malaysia	Yaacob et al. (1989)
	11.03, 7.24		
2-Undecanone 2-Nonanone	49.20, 24.70	Egypt	Aboutabl et al. (1988)
2-Undecanone 2-Nonanone	43.0, 33.5	Mérida state	Meccia et al. (2008)
2-Undecanone 2-Nonanone	50.50, 17.47	Egypt	El-Sherbeny et al. (2007)
2-Nonanone, 2-Undecanone followed by 2-Nonanol, 2-Octyl acetate	38.66, 27.34, 12.25, 7.71	Tunisia	Fredj et al. (2007)
2-Undecanone 2-Nonanone	47.21, 39.17	Brazil	França Orlanda and Nascimento (2015)

Fuente: (Reddy y Al-Rajab, 2016).

2.6. Metabolitos secundarios

Las plantas producen diversos compuestos orgánicos o productos naturales, los cuales no tienen una función directa en los procesos de la fotosíntesis, la

respiración, transporte de solutos, o la formación y asimilación de algún nutriente. La función principal de los metabolitos secundarios es la protección de las plantas de la ingestión por herbívoros y la infección por patógenos microbianos; así mismo, contribuyen como atrayentes de polinizadores, dispensadores de semillas, y también participan en la competencia planta-planta. Estos compuestos se dividen en tres químicos: terpenos, fenoles y compuestos que contienen nitrógeno (Taíz y Zeiger, 2006).

Terpenos o terpenoides: son insolubles en agua, biosintetizados a partir de acetil CoA o de intermediarios glicotícos, se derivan de la unión de cinco carbonos, actúan como repelentes ante herbívoros y se almacenan en la pared celular.

Compuestos fenólicos: son compuestos biosintetizados con un grupo fenol, un grupo hidroxilo en un anillo aromático en diferentes rutas, la ruta del ácido malónico y la del ácido siquímico heterogéneos algunos solubles en solventes orgánicos y otros son ácidos carboxílicos y glucósidos solubles en agua.

Compuestos que contienen nitrógeno: biosintetizados a partir de aminoácidos comunes, los metabolitos que contienen nitrógeno son los alcaloides, glucósidos cianogénicos, glucosinatos y aminoácidos no proteicos, que son de interés debido a su toxicidad para el hombre y sus propiedades medicinales.

2.7. *Ruta graveolens* y su acción antifúngica

En un estudio comparativo del aceite de *Ruta graveolens* L. se comprobó que en su composición en su mayor porcentaje contenía 2- cetonas alifáticas, de las cuales las principales son 2-undecanona y 2-nonanona; sin embargo, el porcentaje de estas pueden ser afectados por el clima, genotipo, condiciones geográficas y tipo de suelo y el efecto de la luz en su composición del aceite. En cuanto a su actividad antifúngica *in vitro* demostró ser un potencial inhibidor de crecimiento en las cepas *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Aspergillus fumiga*, *Candida albican*, *Cladosporium herbarum* y *Fusarium oxysporum*, en aplicación en disco por papel

filtro con 10 μ L en comparación con la anfotericina B, un fármaco antifúngico sintético (Reddy y Al-Rajab, 2016).

Se han realizado diversas investigaciones para dar lugar a fungicidas naturales con extractos de aceites esenciales y compuestos activos o metabolitos secundarios. Estos compuestos activos provenientes a partir de las raíces, semillas, hojas y frutos podrían ser una alternativa al uso de químicos; algunas de estas plantas son tradicionalmente medicinales. Por ejemplo, el ajo y clavo inhiben el crecimiento micelial del hongo *Rhizopus stolonifer* de la fruta de papaya; y en cuanto a la ruda, se registra como un potente fungicida contra diversos hongos fitopatógenos tales como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum fragariae*, *Phomopsis obscurans* y *Phomopsis viticola* (Jiménez-Reyes *et al.*, 2019).

De acuerdo con Attia *et al.* (2018) en su análisis de aceites esenciales de *Ruta graveolens*, se determinó que la concentración mínima inhibitoria en cepas de *Candida albicans*, las plantas utilizadas fueron sometidas a estrés hídrico con ácido salicílico, las cuales contenían mayor porcentaje de metil cetonas de cadena larga (94,2%) que tuvieron mayor actividad antimicrobiana al igual que los compuestos 2-undecanona y 2-nonanona que tienen actividades antifúngicas similares del ketoconazol.

EL extracto acuoso vegetal de la ruda, se utilizó contra hongos de la pudrición de la madera (*gloeophyllum trabeum* y *pycnoporus sanguineus*), causantes de pérdidas forestales. En ese trabajo se realizaron tres tratamientos con cinco repeticiones del extracto, una al 50% y otra al 100%, mezclando el extracto con el medio (PDA), evaluándose el crecimiento micelial de los hongos cada 24 horas, durante 7 días. En el análisis de resultados los tratamientos con el 100% del extracto, obtuvieron mayor inhibición de ambos hongos que al 50%, confirmando así el efecto fungicida del extracto de la ruda, en el cual se pudo comprobar tanto visual como estadísticamente (Hüller *et al.*, 2019).

En un experimento realizado por Calixto (2019), el aceite de *R. chalepensis* mostró un efecto inhibitorio efectivo en el crecimiento de *Aspergillus* spp. y *Mucor* spp, a una concentración del 100% en comparación con el aceite de *M. piperita* con el cual obtuvo una mínima de inhibición del crecimiento del hongo en la misma concentración del 100%.

En otro estudio se utilizaron algas naturales *Ascophyllum nodosum* y *Ecklonia máxima* para potencializar el metabolismo de *Ruta graveolens* y se evaluó su bioactividad, encontrándose mejoras frente a células cancerígenas bacterias y hongos patógenos. Al mismo tiempo se favoreció la producción en el contenido de 2-undecanona y la 2-nonanona asociados a la inhibición de 6 hongos *Aspergillus flavus*, *Aspergillus ochraceus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium funiculosum*, *Penicillium ochrochloron* y *Candida albicans* (Mahmoud *et al.*, 2020).

La presencia de aproximadamente 26 fito componentes analizados en un estudio mediante GC-MS del extracto metanólico de la ruda fueron encontrados alcaloides, flavonoides, terpenoides, saponinas y polifenoles, los cuales han demostrado tener propiedades antimicrobianas que contribuyen a la pérdida de enzimas y proteínas de algunas células microbianas; en este estudio se obtuvo un alto poder inhibitorio de hasta 20mm a 200mg de extracto metanólico en contra de *Bacillus subtilis* (Azalework *et al.*, 2017).

2.8. Quitosano y extractos vegetales con acción antifúngica

En películas de quitosano a diferentes pesos moleculares; bajo, medio y alto, se incorporaron aceites esenciales de comino (*Cuminum cyminum* L.) y clavo (*Eugenia caryophyllata*) contra bacterias de *Escherichia coli*, *Salmonella typhimurium*, *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Listeria monocytogenes*, en donde se obtuvo mejor inhibición con el aceite esencial de clavo más el quitosano de alto peso molecular (Hernández *et al.*, 2011).

También se evaluó el efecto antifúngico *in vitro* e *in situ* del quitosano y la combinación de quitosano con 3 diferentes aceites esenciales de canela, clavo y

tomillo contra *Rhizopus stolonifer* en tomate de la variedad “*Saladette*”, en donde la mezcla del quitosano con los 3 aceites inhibieron totalmente la producción de esporas *in vitro*. En cuanto al estudio *in situ* la mayor efectividad la obtuvo el quitosano, en este caso los aceites no funcionaron como se esperaba, debido a su naturaleza al contener compuestos volátiles que pudieron dispersarse, lo que pudo haber ocasionado la disminución de la capacidad inhibitoria (Alvarado *et al.*, 2011).

En otro estudio se utilizaron nanopartículas de quitosano con aceite esencial de limón y tomillo para determinar la actividad antibacteriana en el desarrollo de *Pectobacterium carotovorum*; la eficiencia en la inhibición del halo bacteriano en PDA fue mejor con el uso de nanopartículas de quitosano y tomillo a una concentración de 2.8%, comparado con el uso del quitosano solo y el de limón (Sotelo-Boyás *et al.*, 2015).

Otro estudio señala que fueron utilizadas ciertas nanopartículas para hacer biocompositos de aceite esencial de hojas de árbol de pimienta (*Schinus molle*) con quitosano para la inhibición antifúngica *in vitro* contra esporas de *Aspergillus parasiticus*; en este estudio, se comprobó el acoplamiento efectivo del aceite de árbol de pimienta y el quitosano formando bionanocompositos, los cuales son eficaces en la disminución de la cantidad de esporas viables. También se conservan mejor las propiedades de ambos componentes, disminuyendo el efecto de volatilización del aceite esencial (Luque-Alcaraz *et al.*, 2016).

En un estudio para evaluar las propiedades físicas de quitosano con aceites de tomillo y romero, para la elaboración de películas y su actividad antimicrobiana contra cepas de *E. Coli*, *S. enteritidis*, *S. aerus*, *L. monocytogenes* y *B. cereus*, aumentó el diámetro de inhibición al mezclar los aceites esenciales, mejorando la capacidad de inhibición de cepas bacterianas (Bohórquez *et al.*, 2016).

También se utilizó el quitosano para la encapsulación de aceites esenciales de romero y té de árbol para la creación de una película; en este caso, para cuestiones de salud en protección del eritrocito humano, la cual mostró mejor reducción de

solubilidad y baja capacidad antioxidante y alto efecto protector del eritrocito humano (Quihui-Cota *et al.*, 2017).

El aceite esencial de zacate de limón (*Cymbopogon citratus*), en conjunto con el quitosano a bajo peso molecular para la realización de películas a dos concentraciones (1% y 3%), obtuvo mayor espesor, menor humedad y alta resistencia a la tensión y elongación. Asimismo, mostró un efecto significativo en concentraciones de 200 y 400 ppm de aceite esencial (Vázquez & Guerrero, 2017).

También el quitosano- ácidos grasos en bioensayos *in vitro* e *in vivo* sobre el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* en frutos de fresa postcosecha, el quitosano inhibió el crecimiento en un 100% en las concentraciones de 10,12.5 y 15 mg/mL *in vitro*, mientras que los mejores resultados *in vivo* fueron en los que se utilizó el compósito de quitosano y octanoato de sodio al 12.5/0.49 y 15/0.49 mg/mL (Sandoval *et al.*, 2018).

También se ha probado el quitosano y el aceite esencial de canela y eucalipto y su combinación para evaluar su actividad antifúngica *in vitro* contra dos patógenos *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* que fueron aislados del aguacate (*Persea americana* Mill). En este caso se menciona que la combinación del quitosano y el aceite esencial de canela fue la mejor combinación, al evitar el crecimiento micelial de ambos hongos al 100% (Chávez-Magdaleno *et al.*, 2019).

III. JUSTIFICACIÓN

El uso indiscriminado de químicos insecticidas ha provocado un deterioro ambiental sobre todo en los monocultivos como lo es el maíz, siendo este uno de los principales alimentos a nivel nacional.

El maíz criollo, es considerado como el principal cultivo y parte de la identidad cultural de la comunidad de Cherán, Michoacán. Sin embargo, presenta cierta susceptibilidad a enfermedades fúngicas como el tizón foliar, el complejo de la mancha de asfalto y la pudrición de raíces, entre otras; razón por la cual, se presentan pérdidas significativas en el cultivo. La ruda ha sido utilizada como planta medicinal a través de los años por las culturas para la cura de diversas enfermedades de las personas, por lo que es popular entre las pequeñas comunidades, además de ser una planta de fácil crecimiento para su posterior reproducción, y que puede ser una manera económica de controlar las enfermedades fúngica del maíz criollo. Esto como una alternativa a la utilización de numerosos fungicidas, que afectan gravemente al medio ambiente, y que además generan cierta resistencia por parte de las plagas y enfermedades a dichos productos, razón por la cual se plantea elaborar un extracto vegetal especialmente de la ruda (*Ruta graveolens*), como fungicida natural.

En este contexto, la ruda se conoce como una planta medicinal con numerosos beneficios; sin embargo, ahora se plantea utilizarla como extracto benéfico para el control de las enfermedades fúngicas anteriormente citadas. Cabe señalar que, en estudios anteriores se ha encontrado que la ruda contiene componentes químicos como las 2- cetonas alifáticas que podrían actuar como fungicidas; por lo tanto, se especula que puede ser de gran utilidad para los agricultores de la localidad de Cherán; debido a que para ellos es de gran importancia la producción del maíz, ya que este cultivo no sólo es importante como alimento y sustento económico, sino es un símbolo religioso y de gran valor. De igual manera, se visualiza la disminución del uso de insecticidas por parte de los productores de maíz, porque consideran que el uso de pesticidas, causan daños a plantas y animales, y contaminan el suelo, el aire y el agua.

Hipótesis

Los metabolitos secundarios de *Ruta graveolens* tendrán un efecto positivo en la inhibición de hongos fitopatógenos, procedentes de los maíces criollos de Cherán Michoacán.

IV. OBJETIVOS

4.1. Objetivo general

Evaluar *in vitro* el efecto antifúngico de los metabolitos secundarios de *Ruta graveolens*, sobre el crecimiento de diferentes hongos fitopatógenos de maíces criollos de Cherán, Michoacán.

4.2. Objetivos específicos

- Obtener extracto metanólico de *Ruta graveolens* mediante la técnica de macerado y evaluar su efecto antifúngico, sobre hongos que afectan maíz criollo.
- Obtener aceite esencial de *Ruta graveolens* mediante el método de arrastre de vapor con un equipo tipo Clevenger y evaluar su efecto antifúngico, solo y con nanopartículas de quitosano, sobre hongos que afectan maíz criollo.
- Identificar los metabolitos secundarios del aceite esencial de ruda, empleando espectrometría de masas con el cromatógrafo de Líquidos de Ultra Alta Resolución con ionización por electrospray (UHPLC-ESI).

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1. Obtención de plantas de ruda y tejido enfermo del maíz

Las plantas de ruda se colectaron en el municipio de Cherán, localizado en el centro del estado de Michoacán, en la región denominada como la Meseta Purépecha, en las coordenadas 19°41'15'' de latitud norte y 101°57'17'' de longitud oeste, a una altitud de 2 377 metros sobre el nivel del mar. Limita al noreste con el municipio de Zacapu, al sureste con el municipio de Nahuatzen, al sur y suroeste con el municipio de Paracho y al noroeste con el municipio de Chilchota (INEGI, 2017).

El material biológico enfermo, se recolectó de manera aleatoria en los lugares de siembra de maíz, cubriendo los 4 puntos cardinales de la comunidad de Cherán, Michoacán, específicamente en los siguientes sitios: Camino Viejo a Nahuatzen, Terupin, Cruciro, La Herradura, Jatsikurini y Zinguaminario.

5.2. Aislamiento de hongos fitopatógenos del maíz

Se recolectaron plantas enfermas de maíz y se llevaron al CIIDIR. En el Laboratorio de Fitopatología, se lavaron las plantas con agua corriente de llave y los órganos afectados de maíces (hojas y raíces) se dividieron en trozos pequeños en forma de cubos de aproximadamente 0.5 cm en el caso de las hojas, y trozos de 1 a 2 cm en el caso de las raíces. Los trozos infectados, se sumergieron en una solución de cloro al 2% durante 1 a 2 minutos. Enseguida se hicieron 3 enjuagues con agua esterilizada. Los tejidos enfermos se llevaron a la cámara de flujo laminar y se pasaron a toallas de papel estéril durante 5 minutos o hasta secarse. Las muestras desinfectadas y secadas se cultivaron en medio de cultivo PDA; de acuerdo con la técnica propuesta por Carrillo *et al.* (2014) con algunas modificaciones. Una vez sembradas las cajas Petri, se incubaron a 28 °C durante 4 a 8 días o el tiempo necesario hasta el crecimiento de las colonias fungosas.

5.3. Extracto etanólico de ruda

La obtención del extracto etanólico de ruda se realizó mediante el método de macerado, metodología propuesta por Bañuelos-Balenzuela *et al.* (2018) y Delgadillo *et al.* (2017) con algunas modificaciones. Se inició con el lavado vegetal con agua corriente, se secó a la sombra a temperatura ambiente durante 14 días, y se pulverizó la muestra deshidratada. A cada 10 g de muestra seca en polvo, se le agregaron 100 mL de etanol y agua en una relación 4:1. Posteriormente se dejó reposar durante 15 días, al cabo de los cuales se filtró mediante una membrana de 0.45 μm .

5.4. Extracción de aceite esencial de ruda (AER)

Se inició con el lavado del material vegetal con agua corriente, un secado a la sombra a temperatura ambiente durante 22 días hasta estar completamente deshidratado. Se realizó la extracción por arrastre de vapor mediante un aparato tipo Clevenger, utilizando solo las partes aéreas de la planta incluyendo (hojas y tallos). El tiempo de extracción fue de 2 h, posteriormente de la muestra obtenida, una se utilizó en los bioensayos y la otra parte se sometió a diferentes análisis cromatográficos. La técnica que se realizó, fue la propuesta por Díaz (2017) con algunas modificaciones.

5.5. Obtención de nanopartículas de quitosano

Mediante el método propuesto por Sotelo *et al.* (2015) y Luque-Alcaraz *et al.* (2012) con algunas modificaciones, se utilizó quitosano comercial a mediano peso molecular a 0.5 mg/mL en una disolución en ácido acético al 2% v/v disolviéndose mediante calor a 60°C y agitación magnética constante al obtener la fase disolvente se añadió el aceite de ruda en un 5%; la solución se mantuvo en movimiento magnético pasando mediante una bomba peristáltica hasta la formulación de nanopartículas, posteriormente la muestra se mantuvo bajo refrigeración a 4°C para su posterior utilización en los bioensayos.

5.6. Actividad inhibitoria de extractos de ruda

Los estudios relacionados con la actividad fúngica, se realizó en el laboratorio de Fitopatología del CIIDIR Unidad, Michoacán; en la campana de flujo laminar, bajo condiciones asépticas.

El extracto etanólico se evaluó con 5 µL y 10 µL, aceite esencial de ruda, quitosano y nanopartículas de quitosano con aceite esencial de ruda; cada uno con dos controles uno negativo y otro positivo con un fungicida comercial (benomilo) y en el caso del extracto etanólico se tuvo un tercer control con etanol. Mediante la técnica por contacto directo propuesto por *Duarte et al.* (2013), se colocó sobre el hongo, un disco de papel fieltro estéril de aproximadamente 5 mm de diámetro en cada placa con medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA). Enseguida cada uno de los tratamientos, fueron incubados entre 25 -28 °C en una incubadora marca Thermo, hasta que el testigo que contenía únicamente al hongo patógeno en PDA cubrió totalmente la superficie de la caja Petri o hasta cumplir las 192 horas de incubación. Se midió en cm, el crecimiento radial con una regla graduada cada 24 h en cada hongo. Se realizaron 4 repeticiones por tratamiento en un diseño completamente al azar.

5.7. Identificación de metabolitos secundarios del aceite de ruda

La identificación de los metabolitos secundarios del aceite esencial de ruda (AER) se realizó empleando espectrometría de masas con el cromatógrafo de Líquidos de Ultra Alta Resolución con ionización por electrospray (UHPLC-ESI) del Centro de Nanociencias y micro y nanotecnologías del IPN.

5.8. Variables en estudio

A partir de las 24 h hasta las 192 h de incubación, se midió el diámetro de inhibición en cm del crecimiento del micelio de cada hongo en cada tratamiento y se calculó el porcentaje de inhibición del crecimiento radial (PICR) con la siguiente fórmula de Abbott: $PICR = (R1 - R2) / R1 \times 100$; donde R1 es el radio del patógeno testigo y R2 es el radio del patógeno expuesto con tratamientos (*Duarte et al.*, 2013).

5.9. Análisis estadístico

Los tratamientos de los diferentes bioensayos se establecieron en un diseño completamente al azar. Con los datos obtenidos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) modelo útil para condiciones en que las unidades experimentales presentan homogeneidad (Pedroza & Dicovskyi, 2007), y una comparación de promedios mediante la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), utilizando el paquete estadístico SAS. Los datos obtenidos en porcentaje de inhibición se transformaron con el arco seno.

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1. Mancha de asfalto ó complejo de la mancha de asfalto (CMA)

La mancha de asfalto es ocasionada por la interacción sinérgica de 3 hongos; *Phyllachora maydis*, *Monographella maydis* y *Coniothyrium phyllachorae*. En la figura 1, se muestran los síntomas de la enfermedad, al inicio se observa en el follaje pequeñas manchas cloróticas, también conocidas como ojo de pesado, presentándose un área circular color marrón (Figura 1a); posteriormente las manchas iniciales se extienden hacia gran parte del follaje (Figura 1b), lo cual ocasiona que las plantas no realicen su proceso fotosintético adecuadamente, lo que repercute en el deficiente llenado de grano, germinación prematura y mazorcas livianas, sintomatología que corresponde a la interacción conjunta de los tres hongos, anteriormente citados; características que coinciden con las descritas por Ríos *et al.* (2017). Los períodos prolongados de humedad de las hojas por la noche y por la mañana, así como la producción continua de maíz en grandes territorios, favorecen la propagación de la enfermedad, mayormente si se trata de un monocultivo.

Para precisar, al inicio aparecen pequeños puntos negros brillantes, ligeramente elevados apariencia inducida por *Phyllachora maydis*; después de 3 días, las manchas negras y los halos de color marrón son causados por *Monographella maydis*. Cabe señalar que, en las lesiones jóvenes, es común encontrar a *Microdochium sp.*, anamorfo de *Monographella maydis*. Posteriormente las manchas de color marrón que llegan a unirse, forman el tejido vegetal muerto (Quiroga *et al.*, 2017), tal como se muestra en la figura 1b.

El tejido vegetal se necrosa por completo desde la parte superior de la hoja hacia su base y aquí aparece *Coniothyrium phyllachorae*, hiperparásito de los hongos anteriores. En el transcurso de las primeras dos a tres semanas de la aparición de puntos negros, las áreas de tejido muerto cubren por completo toda la hoja. Mientras

las hojas continúen afectadas la infección avanzara rápidamente hasta cubrir por completo el follaje de la planta y a todo el cultivo (Abdul *et al.*, 2018).



Figura 1. Síntomas de mancha de asfalto, a) manchas cloróticas redondas al inicio del síntoma, b) unión de las manchas en el tejido foliar, en estado avanzado de la enfermedad.

Al realizarse el aislamiento de los hongos, a partir de las hojas de maíz con los síntomas anteriormente descritos, se aisló a *Coniothyrium phyllachorae*, siendo éste el de mayor incidencia en los aislamientos. Debido a que *Phyllachora maydis*, uno de los patógenos involucrados en el complejo de la mancha de asfalto, es un parásito fúngico obligado, no se logró el aislamiento en PDA, lo que implica que debe aprovechar y estar en la planta huésped para completar su ciclo de vida (Abdul *et al.*, 2018).

En la figura 2 a), se muestra un micelio de color verde grisáceo del hongo *Coniothyrium phyllachorae*, el cual es de rápido crecimiento en medio PDA, expuesto a una temperatura entre 25 a 28 °C. En la figura 2 b), se observan los conidios que pueden tardar entre 5 a 8 días para su formación forma macro conidios

ovalados aceptada de color café oscuro, un picnidio oscuro, globoso, separado, una célula, ovoide a elipsoidal, parasítico a saprofitico (Barnett y Hunter, 1998).

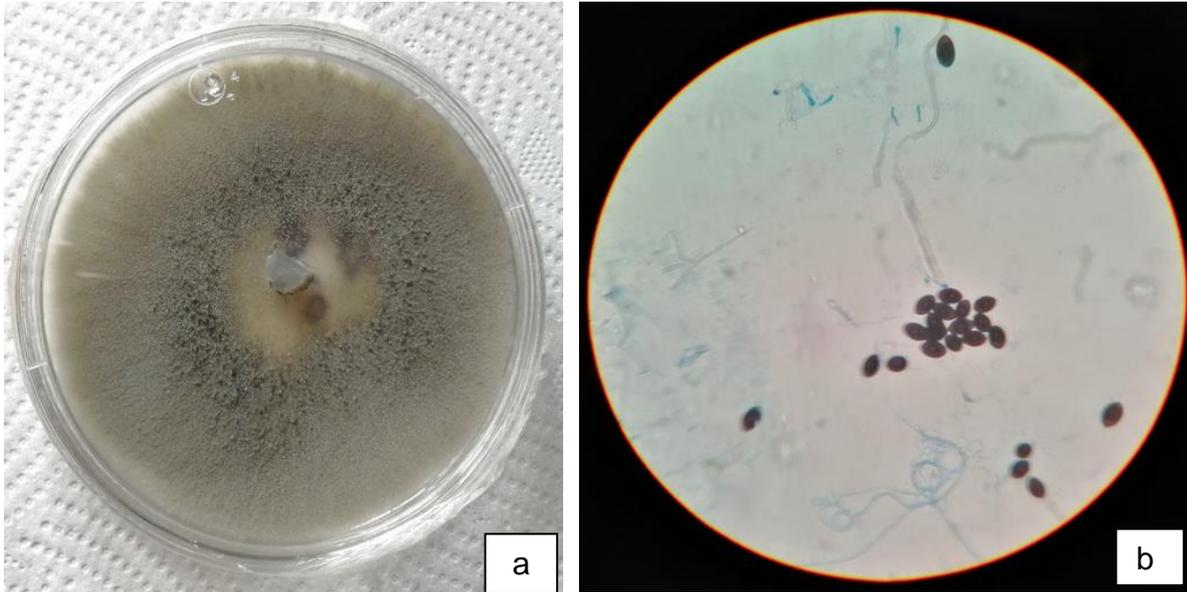


Figura 2. *Coniothyrium phyllachorae*, a) cepa de coloración verde grisácea, b) estructuras fúngicas.

6.2. Tizón foliar

En la figura 3 se pueden observar los síntomas del tizón foliar. Al inicio de la enfermedad, se observan lesiones de forma elíptica y alargada, dirigiéndose hacia las puntas de las hojas, con variaciones en los tamaños entre 2 a 15 cm e incluso algunas que cubren gran parte de la hoja. Las lesiones son de color gris verdoso al comienzo, hasta llegar a un tono verde grisáceo quebradizo o café claro (Figura 3a), aproximadamente 1- 2 semanas después de la infección (Singh *et al.*, 2017).

El tizón foliar causado por *Exserohilum turcicum*, se encuentra ampliamente distribuido por todo el mundo y es más frecuente en las zonas de alta humedad y temperaturas moderadas durante su periodo de crecimiento y desarrollo. Sí la infección se produce antes o durante la aparición de los estigmas, y si las

condiciones son óptimas, ésta puede ocasionar daños económicos considerablemente graves, causando bajas en los rendimientos principalmente de grano (Figura 3b) (CIMMYT, 2004).

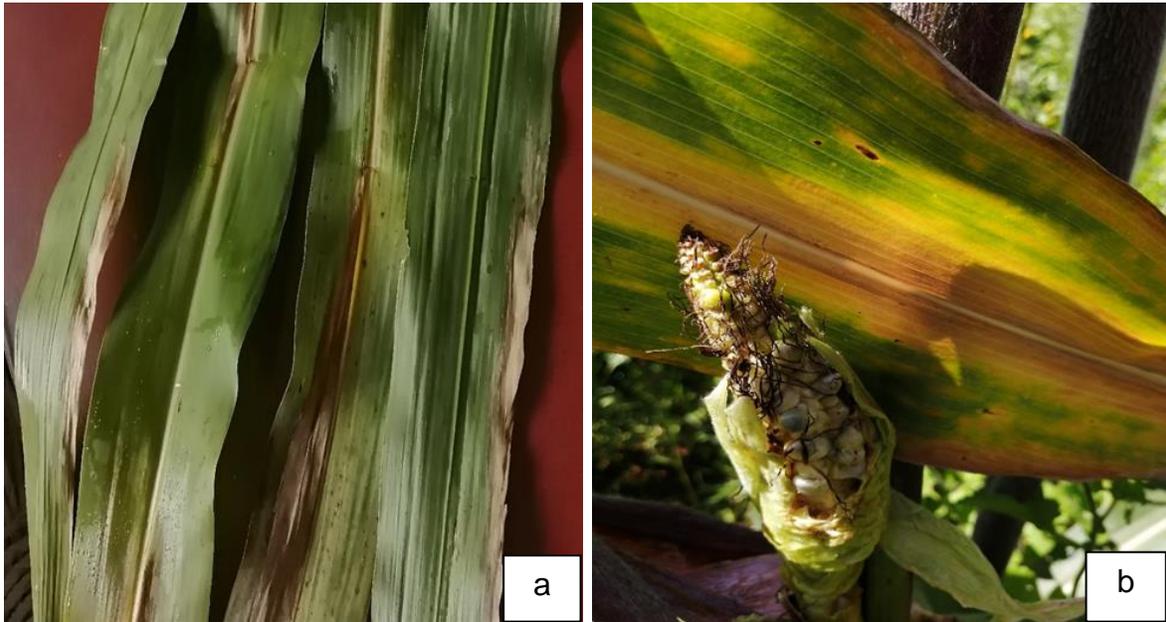


Figura 3. Síntomas de tizón foliar, a) lesiones alargadas de coloración café, b) deficiente llenado de grano, en estado avanzado de la enfermedad.

A partir del tejido vegetal enfermo, se aisló al hongo patógeno *Exserohilum turcicum* causante de la enfermedad del tizón, el cual se caracteriza por tener un micelio de color verde grisáceo oscuro esponjoso de textura semejante a la gamuza, floculada, con un reverso negro oliváceo (Figura 4a). Durante su incubación se notó que es un hongo de rápido crecimiento, aunque la formación de conidios se formó alrededor de 5 días posteriores a su incubación. En cuanto a su estructura fúngica, este fitopatógeno desarrolla conidióforos color café, lisos y geniculados, con células conidiógenas poliblasticas simpodiales. Los macro conidios son rectos a fusiformes (Figura 4b) que se forman apicalmente en un poro, multiseptados, con un hilum protruido; característica que suele ser relacionada con *Exserohilum rostratum* debido a su morfología similar (Cruz y Piontelli, 2020).

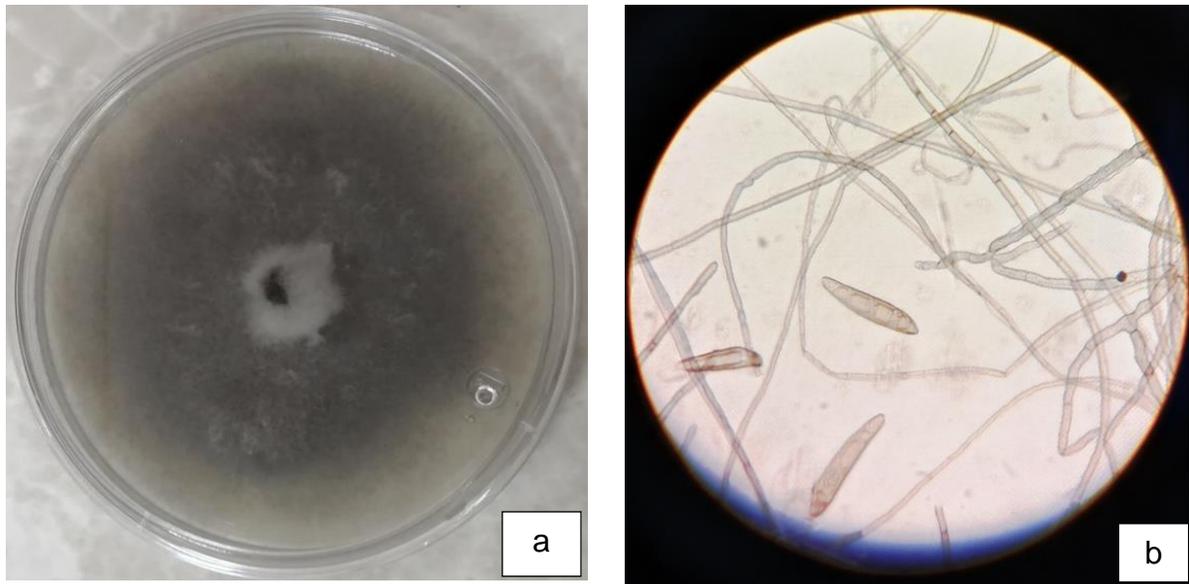


Figura 4. *Exserohilum turcicum*, a) cepa de color verde grisácea, b) estructuras fúngicas.

6.3. Pudrición de raíces

Las especies del género *Fusarium* ocasionan enfermedades de tipo vascular, produciendo pudriciones en diferentes áreas de la planta del maíz tales como tallos, raíces y granos de mazorca, hasta llegar a la muerte de la planta, los cuales se pueden apreciar a simple vista (Figura 5).

La Infección sistémica de las plantas puede ocurrir desde la germinación de la semilla, y a lo largo del desarrollo de la planta. El hongo *Fusarium* que es el que causa la infección, puede sobrevivir tanto en semilla, como en el suelo, y puede penetrar de forma directa al pericarpio de la semilla, hasta llegar a las células de la epidermis de la raíz. Entre 25 y 30 días aproximadamente, las raíces y el mesocotilo ya se hallan colonizados y pueden mostrar síntomas de pudrición (Figura 5a), esto dependerá tanto de los factores ambientales y la cantidad de inóculo; en el tallo puede no haber muchas hifas por lo que se considera una infección asintomática en ciertos tejidos, pero este puede llegar a trasladarse por el tallo a otras mazorcas nuevas en su desarrollo (Torre-Hernández *et al.*,2014). Cabe señalar que la

podrición conjunta o individual del tallo y las raíces provocan el secamiento de las plantas (Figura 5b).

Además de su comportamiento en su proceso de infección llegan a sintetizar metabolitos secundarios denominados micotoxinas, dentro de las cuales pueden ser zearalenona, tricotecenos y fumonisinas, entre muchas otras que son consideradas de alta toxicidad cuando se consumen los granos y que generan malestares al ser humano y animales en la salud (Velarde *et al.*, 2018).

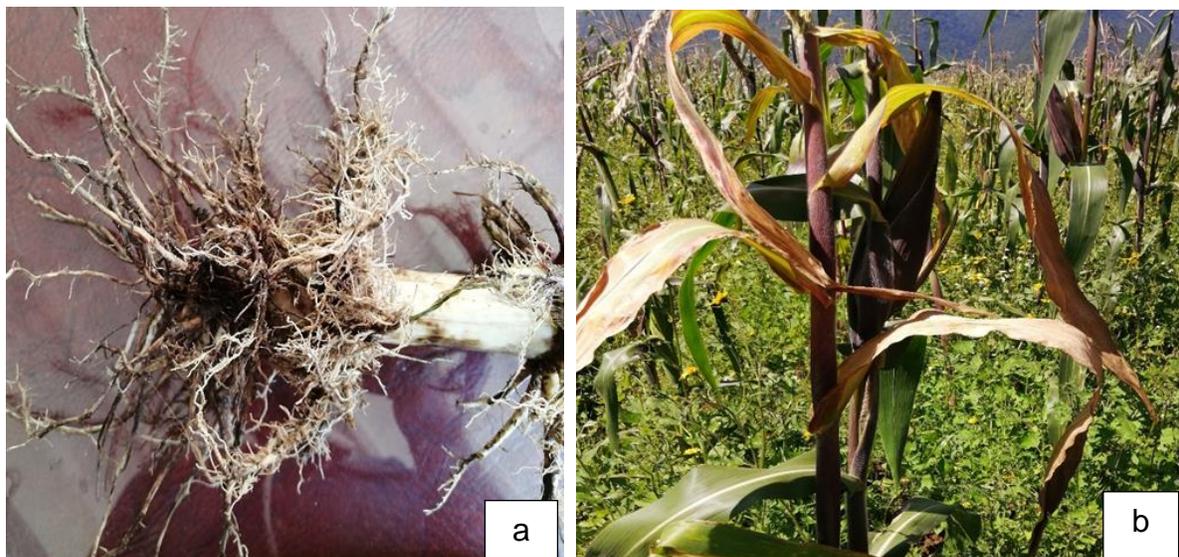


Figura 5. Raíces necróticas afectadas por *Fusarium oxysporum* (a), planta marchita provocada por el mismo hongo (b).

En cuanto a la cepa aislada, se observó una coloración blanca algodonosa al inicio tornándose de color entre rosado y violeta al final de su desarrollo (Figura 6a), se observó durante su incubación que es un hongo de lento crecimiento ya que tarda aproximadamente en llenar la caja Petri en 12 a 18 días y la formación de sus conidios son alrededor del día 12. El género *Fusarium* se caracteriza por la difícil identificación y definición de su taxonomía de especies a nivel morfológico, por lo que también se considera la caracterización patogénica y molecular. En este caso

algunas de las características de su estructura fúngica, es que mostraron macroconidios septados con forma recta a ligeramente curva y falcada y micro conidios (Figura 6b), dispuestos en falsas cabezas en monofiáides correspondiendo a la caracterización de la morfología de *Fusarium oxysporum* (López-Bautista *et al.*, 2019).

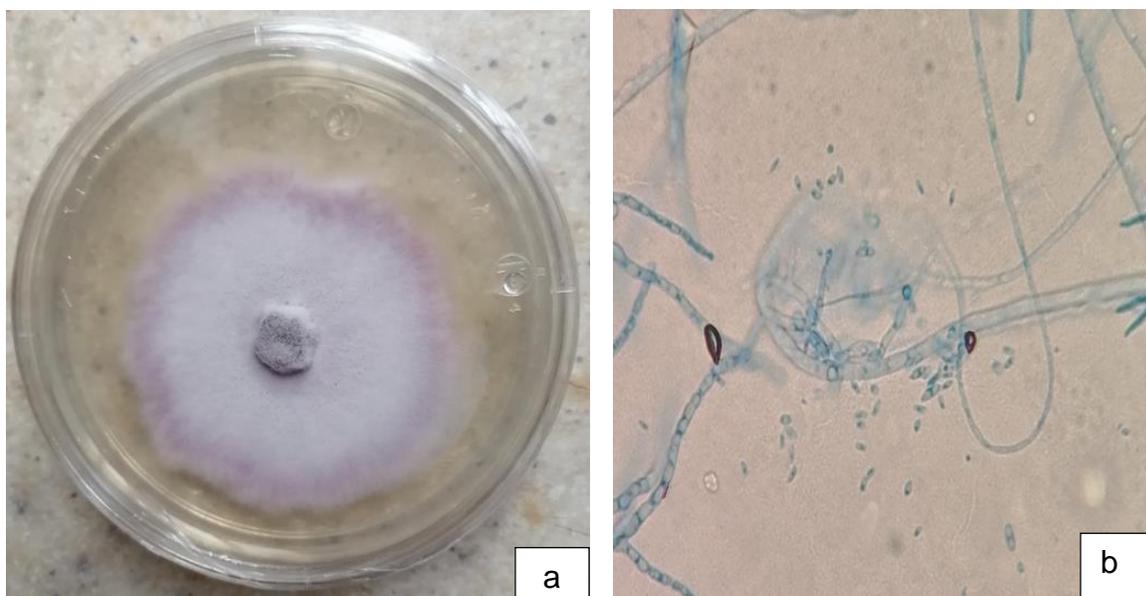


Figura 6. *Fusarium oxysporum*, a) cepa de color blanco con bordes y fondo de color purpura, b) estructuras fúngicas con micro y macro conidios.

6.4. Inhibición de hongos “*in vitro*”

6.4.1. Porcentaje de inhibición del hongo *Coniothyrium phyllachorae*

En cuanto a la actividad inhibitoria del extracto etanólico de ruda contra el hongo *Coniothyrium phyllachorae*, se obtuvo que el extracto etanólico al agregarse 5 μ L y 10 μ L de la solución, mantiene buena efectividad en las primeras 72 h (67% y 64%), pero su inhibición bajó a 53% y 51%, respectivamente al final del bioensayo. Sin embargo, cuando se confrontó el hongo con el aceite esencial de ruda (3 μ L), se obtuvo una efectividad del 100% desde el inicio hasta el final, tal como se puede observar en la tabla 3. Le siguió en efectividad el fungicida benomilo, al inhibir al hongo 91% y 86% con 10 μ L y 5 μ L respectivamente.

Tabla 3. Actividad antifúngica del extracto etanólico y aceite esencial de ruda (AER) contra el hongo *Coniothyrium phyllachorae*.

TRATAMIENTOS	% DE INHIBICIÓN DE 24 A 192 HORAS							
	24	48	72	96	120	144	168	192
Extracto etanólico (5µL)	91 ab	81 ab	67 bcd	59 bc	59 bcd	58 bcd	59 bc	53 b
Extracto etanólico (10µL)	83 abc	73 abc	64 bcd	63 bc	59 bcd	55 bcd	53 bc	51 b
Etanol (5µL)	64 c	18 d	14 e	13 d	4 f	4 f	3 e	3 d
Etanol (10µL)	50 bc	47 c	38 d	38 c	31 e	29 e	27 d	26 c
Benomilo (5µL)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	97 a	86 a
Benomilo (10µL)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	96 a	93 a	91 a
Quitosano (5µL)	79 abc	68 bc	62 cd	60 bc	57 cd	48 cd	43 c	35 c
Quitosano (10µL)	100 a	73 abc	57 cd	50 c	43 de	40 de	30 d	25 c
Quitosano+AER (5µL)	100 a	85 ab	82 abc	77 ab	68 bc	63 bc	62 b	56 b
Quitosano+AER (10µL)	100 a	100 a	93 ab	86 ab	80 ab	76 ab	70 b	64 b
Aceite esencial (3µL)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a

Letras diferentes entre las medias de cada columna, significa diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$)

En la figura 7 se observa al hongo *Coniothyrium phyllachorae* en discos de 5 mm en los que se agregó 10 µL del extracto etanólico. Estas placas mostraron poco crecimiento radial en comparación con la placa testigo; sin embargo, en este caso el fungicida comercial (benomilo) fue mejor que el extracto al inhibir 91.4% el crecimiento del hongo. También se aprecia que la placa con etanol presenta un crecimiento del hongo considerable, al igual que el testigo por lo tanto se considera que el etanol no contribuyó a la inhibición del hongo. En cuanto a la confrontación del aceite esencial de ruda, al agregarle 3 µL al disco de 5 mm, se observa 100% de inhibición del patógeno (Figura 8).

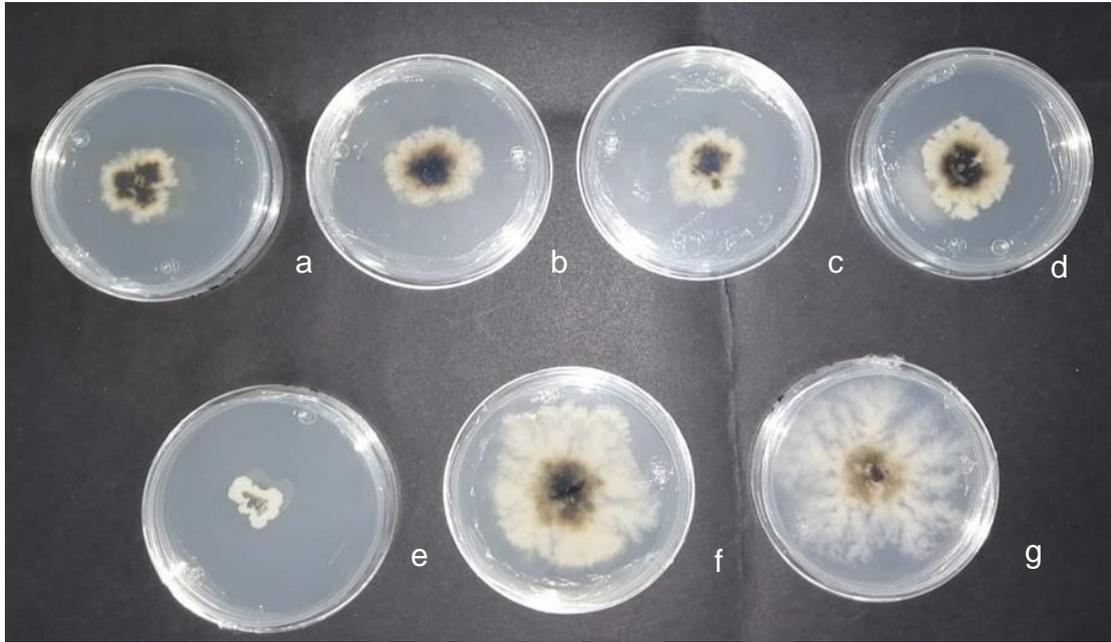


Figura 7. Actividad antifúngica del extracto etanólico de ruda con 10 μ L, contra *Coniothirium phyllachorae* (a, b, c, d), con fungicida benomilo (e), etanol (f) y hongo testigo (g).

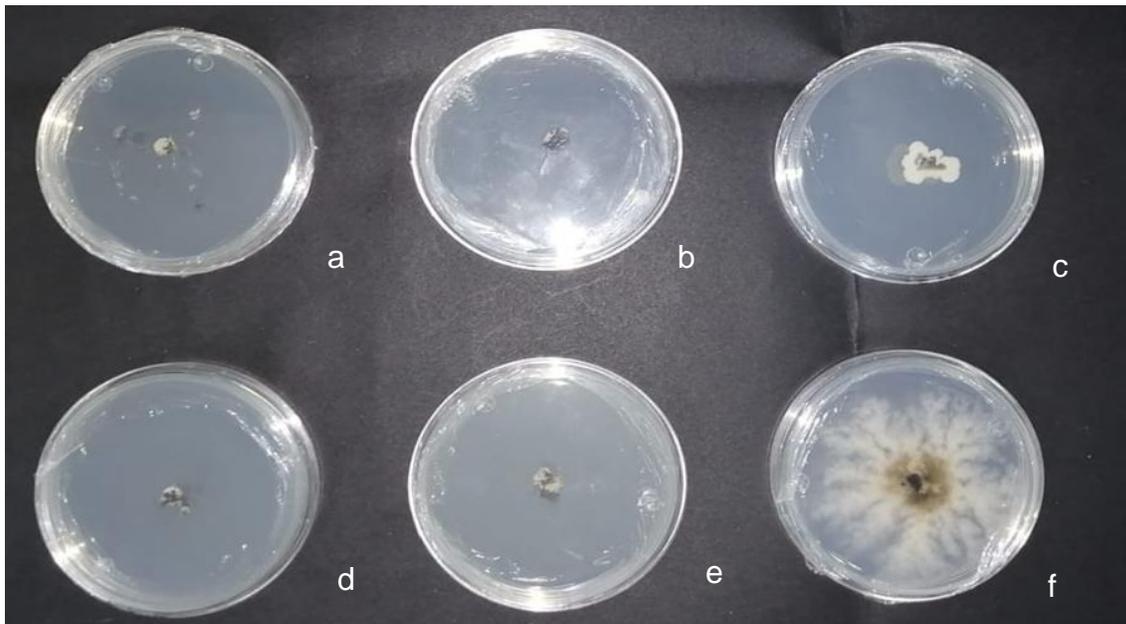


Figura 8. Actividad antifúngica del aceite esencial de ruda con 3 μ L, contra *Coniothirium phyllachorae* (a, b, c, d), con fungicida benomilo (e) y hongo testigo (f).

Respecto al quitosano, se puede considerar que ambas dosis (5 μ L y 10 μ L) no fueron efectivas para inhibir el crecimiento micelial de *C. phyllachorae* a través del tiempo, por lo que se considera que la inhibición fue muy similar en ambos casos (Figura 9). Mientras tanto si hubo una diferencia estadística al adicionarse el quitosano con el aceite esencial, manteniendo al doble el porcentaje de inhibición tanto con 5 μ L y 10 μ L, del mismo modo el quitosano más el aceite esencial de ruda mantuvieron similares niveles de inhibición que el extracto etanólico; por lo que por motivos económicos para el caso de *Coniothyrium phyllachorae* se puede considerar que el extracto etanólico es menos costoso su producción a comparación del aceite esencial más el quitosano.

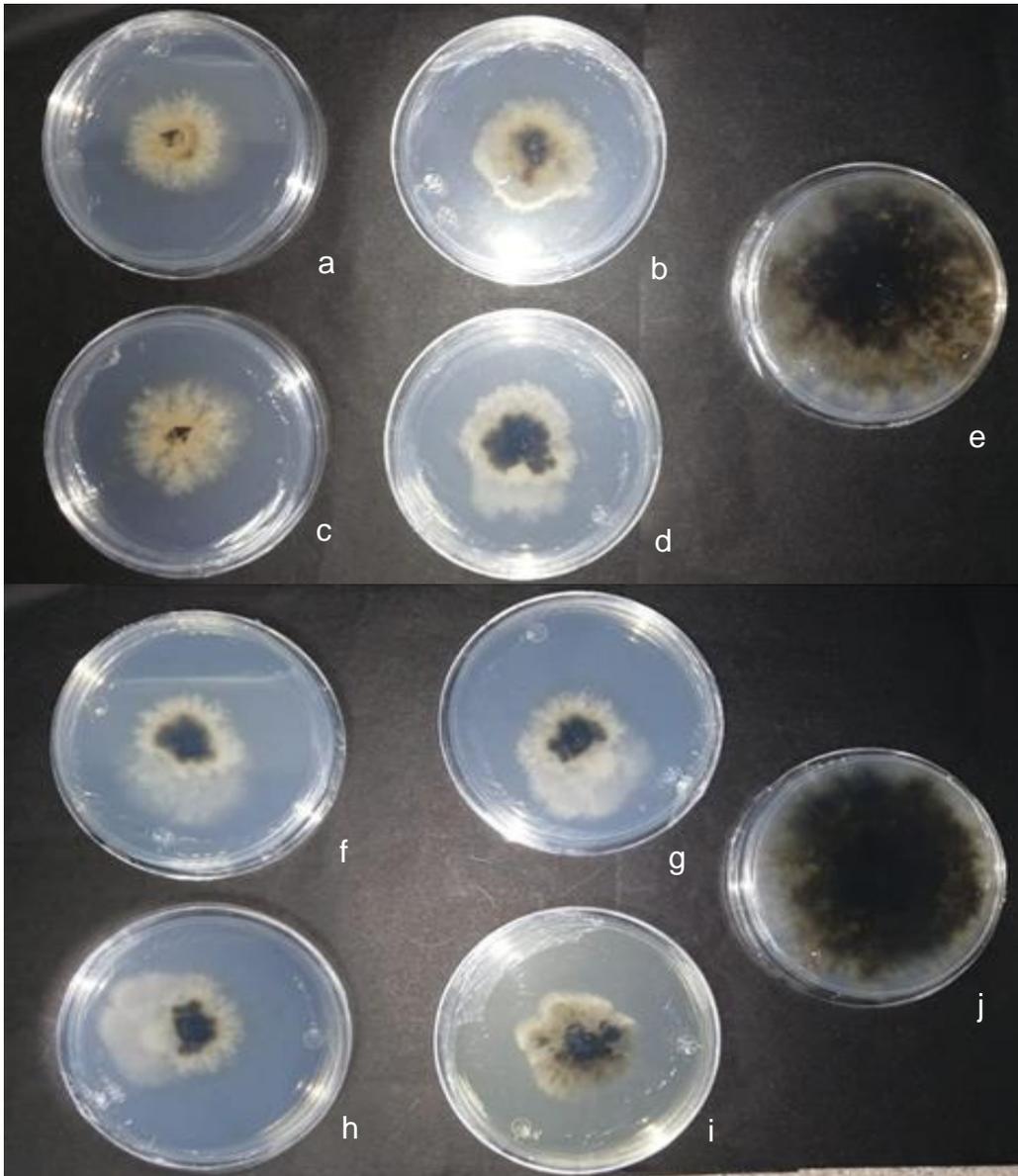


Figura 9. Actividad antifúngica del quitosano + aceite esencial de ruda, contra *Coniothyrium phyllachorae* (a, b, c, d), quitosano (f, g, h, i) y hongos testigos (e, j).

6.4.2. Porcentaje de inhibición del hongo *Exserohilum turcicum*

En la tabla 4, se presenta el porcentaje de inhibición del hongo *Exserohilum turcicum* mediante la difusión de disco del extracto etanólico, fungicida comercial (benomilo), etanol y el aceite esencial de ruda; en donde se observa desde el inicio, una mayor inhibición en las primeras 48 h de incubación y posteriormente disminuye; esto puede ser ocasionado por la disipación del extracto etanólico; sin embargo, en la utilización de 10 µL aumenta el porcentaje de inhibición. El tratamiento con extracto etanólico mantiene una efectividad mayor que el benomilo, pero inferior al de los tratamientos con quitosano y quitosano + aceite esencial de ruda, que mantienen su actividad inhibitoria desde las primeras horas, disminuyendo solo un poco y se asemeja al aceite esencial.

Tabla 4. Actividad antifúngica del extracto etanólico y aceite esencial de ruda (AER) contra el hongo *Exserohilum turcicum*.

TRATAMIENTOS	% DE INHIBICIÓN DE 24 A 192 HORAS							
	24	48	72	96	120	144	168	192
Extracto etanólico (5µL)	69 a	70 c	58 d	36 ef	26 f	20 d	16 d	13 d
Extracto etanólico (10µL)	91 a	82 bc	81 bc	77 abc	77 bc	72 b	69 b	68 b
Etanol (5µL)	63 a	69 c	54 d	30 de	26 e	23 d	17 d	12 d
Etanol (10µL)	38 a	80 c	79 c	74 bc	74 cd	69 b	68 b	63 b
Benomilo (5µL)	75 a	44 d	27 e	24 f	18 f	15 d	15 d	14 d
Benomilo (10µL)	88 a	87 abc	68 c	52 cd	53 d	42 c	35 c	35 c
Quitosano (5µL)	100 a	94 ab	93 ab	95 a	95 ab	92 a	91 a	89 a
Quitosano (10µL)	100 a	100 a	96 ab	96 a	96 ab	94 a	91 a	88 a
Quitosano+AER (5µL)	100 a	96 ab	96 ab	96 a	93 ab	92 a	91 a	89 a
Quitosano+AER (10µL)	100 a	100 a	98 a	95 ab	94 ab	92 a	91 a	90 a
Aceite esencial (3µL)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	98 a	96 a	96 a

Letras diferentes entre las medias de cada columna, significa diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$)

En la figura 10, se puede observar el desarrollo de *Exserohilum tursicum* con dosis de 10 µL de extracto etanólico, siendo menos efectivo para inhibir el crecimiento

radial del hongo que los tratamientos con quitosano y aceite esencial + quitosano y aceite esencial. Cabe señalar que el desarrollo del hongo con el extracto etanólico, fue similar al del hongo con el fungicida benomil; mientras que los que contienen únicamente etanol desarrollaron con mayor facilidad que los anteriores; razón por la cual se puede decir que los extractos de ruda, tienen facultad de inhibición sobre el hongo *Exserohilum turcicum*.

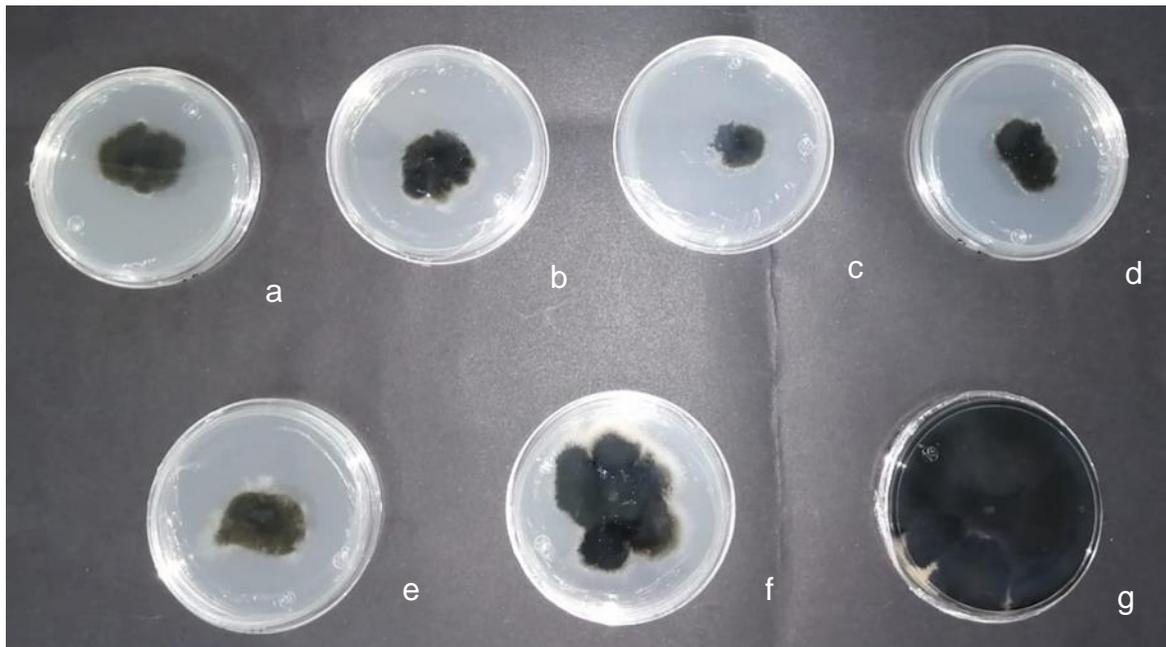


Figura 10. Actividad antifúngica del extracto etanólico de ruda con 10 μL , contra *Exserohilum turcicum* (a, b, c, d), con fungicida benomilo (e), etanol (f) y hongo testigo (g).

Mientras que en la figura 11 se muestra el contraste del crecimiento radial de *Exserohilum turcicum*, en dosis de 3 μL de aceite esencial de ruda por contacto directo en un disco de 5mm, en donde se aprecia un mínimo crecimiento radial en las cajas Petri (a, b, c, d) y un crecimiento ligeramente mayor con benomilo (e), comparado con el testigo (f).

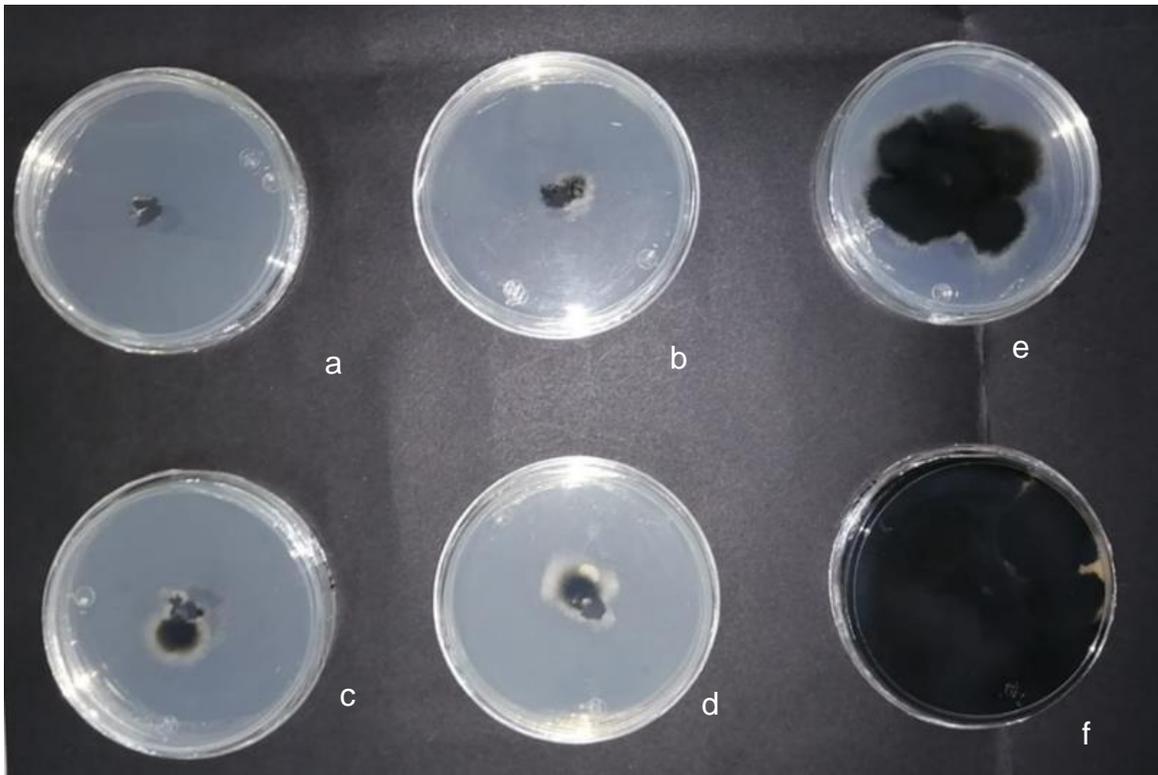


Figura 10. Actividad antifúngica del aceite esencial de ruda con 3 μ L, contra *Exserohilum turcicum* (a, b, c, d), con fungicida benomilo (e) y hongo testigo (f).

En cuanto a los tratamientos con quitosano y quitosano + ruda lucen casi similares en apariencia del crecimiento radial (Figura 12) y son estadísticamente iguales; por lo tanto, en el caso del hongo *Exserohilum turcicum* las opciones para su control serían el uso del quitosano y el quitosano+ la ruda y aceite esencial; sin embargo, deben considerarse los costos de producción y el tiempo de elaboración; por lo que como segunda opción sería la utilización de quitosano y el extracto etanólico (10 μ L) individualmente, aunque su efectividad para inhibir el desarrollo de este hongo puede bajar hasta 68%.

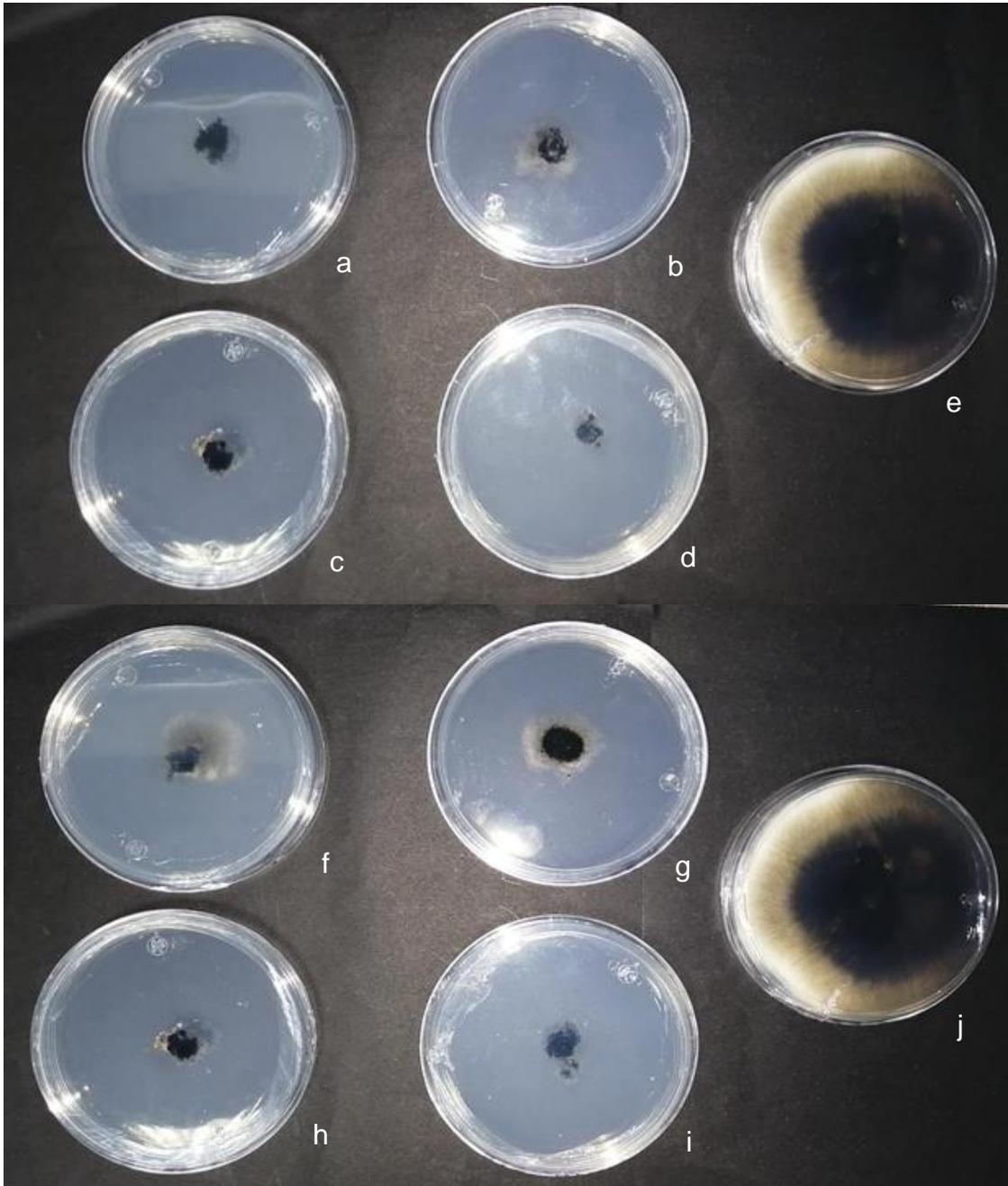


Figura 11. Actividad antifúngica del quitosano + aceite esencial de ruda, contra *Exserohilum turcicum* (a, b, c, d), quitosano ((f, g, h, i) y hongos testigo (e, j).

6.4.3. Porcentaje de inhibición del hongo *Fusarium oxysporum*

Por otro lado, los porcentajes de inhibición de *Fusarium oxysporum* fueron muy similares entre la dosis de 5 μ L y 10 μ L del extracto etanólico (51% y 52%, respectivamente), lo que se puede visualizar en la figura 13, teniendo mayor efectividad hasta las 120 h después de la incubación (Tabla 5); mientras que el fungicida benomilo obtuvo con ambas dosis el 100% de inhibición. Con el uso del aceite esencial, se mantuvo la actividad antifúngica de 98% a 100% hasta las 144 h, aunque finalmente su máxima inhibición fue de 86%. La inhibición de este hongo con el aceite de ruda, se puede observar en la figura 14. Mientras que el quitosano solo, fue de los menos efectivos (44%); sin embargo, éste último más aceite esencial, incrementó la inhibición de *Fusarium* hasta 73% con dosis de 10 μ L (Tabla 5). Este resultado también se puede visualizar en la figura 15.

Resultados similares al aceite esencial fueron reportados por Rodríguez-Castro *et al.* (2020) quienes evaluaron el extracto metanólico obtenido mediante el método de Soxhlet de gobernadora (*Larrea tridentata*), teniendo un efecto inhibitorio de 100% contra *Fusarium solani* y *F. oxysporum* a 144 h, y de 90% a 240 h.

Tabla 5. Actividad antifúngica del extracto etanólico y aceite esencial de ruda (AER) contra el hongo *Fusarium oxysporum*.

TRATAMIENTOS	% DE INHIBICIÓN DE 24 A 192 HORAS							
	24	48	72	96	120	144	168	192
Extracto etanólico (5 μ L)	88 ab	83 ab	73 ab	63 abc	60 abc	53 bcd	50 bc	51 bcd
Extracto etanólico (10 μ L)	81 ab	75 abc	69 abc	67 abc	60 abc	57 bc	54 bc	52 bcd
Etanol (5 μ L)	75 bc	67 c	29 c	25 c	24 c	21 d	19 d	17 e
Etanol (10 μ L)	75 c	67 bc	62 bc	42 bc	42 bc	41 cd	41 cd	39 de
Benomilo (5 μ L)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Benomilo (10 μ L)	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a	100 a
Quitosano (5 μ L)	100 a	65 abc	64 abc	61 abc	59 abc	56 bcd	51 bc	44 cd
Quitosano (10 μ L)	100 a	83 ab	77 ab	70 abc	63 abc	61 bc	52 bc	44 cd
Quitosano+AER (5 μ L)	100 a	88 a	75 ab	72 ab	67 ab	64 abc	64 abc	58 abcd
Quitosano+AER (10 μ L)	100 a	94 a	88 ab	84 ab	79 a	78 ab	76 ab	73 abc
Aceite esencial (3 μ L)	100 a	100 a	100 a	99 a	99 a	98 a	91 a	86 ab

Letras diferentes entre las medias de cada columna, significa diferencia estadística (Tukey, $p \leq 0.05$)

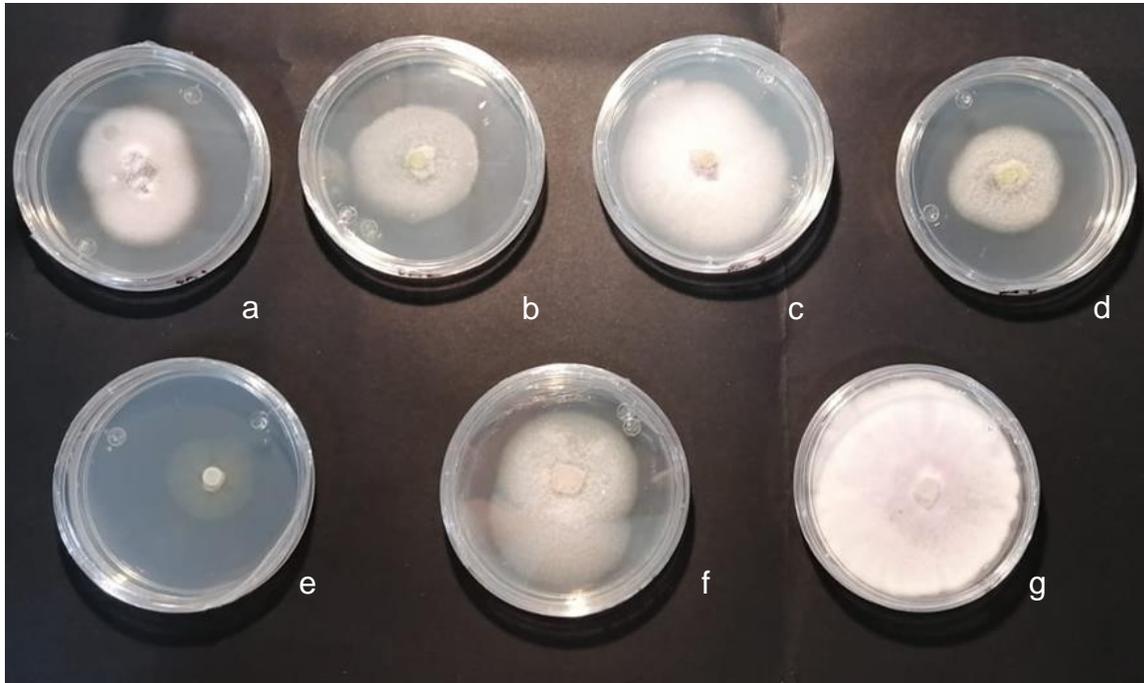


Figura 13. Actividad antifúngica del extracto etanólico de ruda, contra *Fusarium oxysporum* (a, b, c, d), con fungicida benomilo (e), etanol (f) y hongo testigo (g).

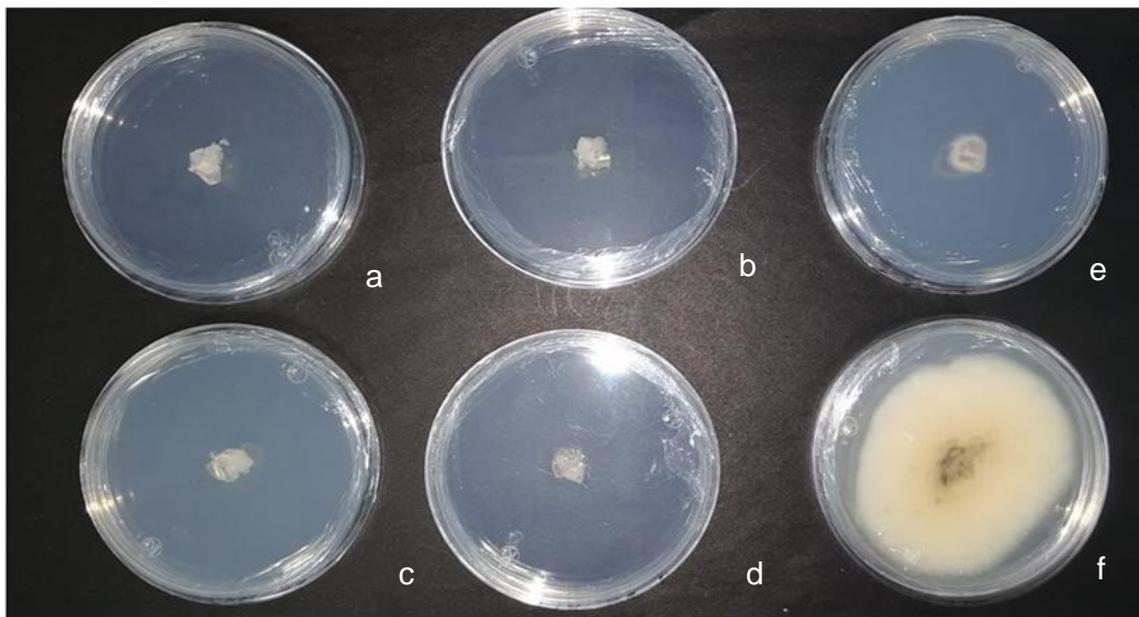


Figura 14. Actividad antifúngica del aceite esencial de ruda con 3 mL, contra *Fusarium oxysporum* (a, b, c, d), con fungicida benomilo (e) y hongo testigo (f).

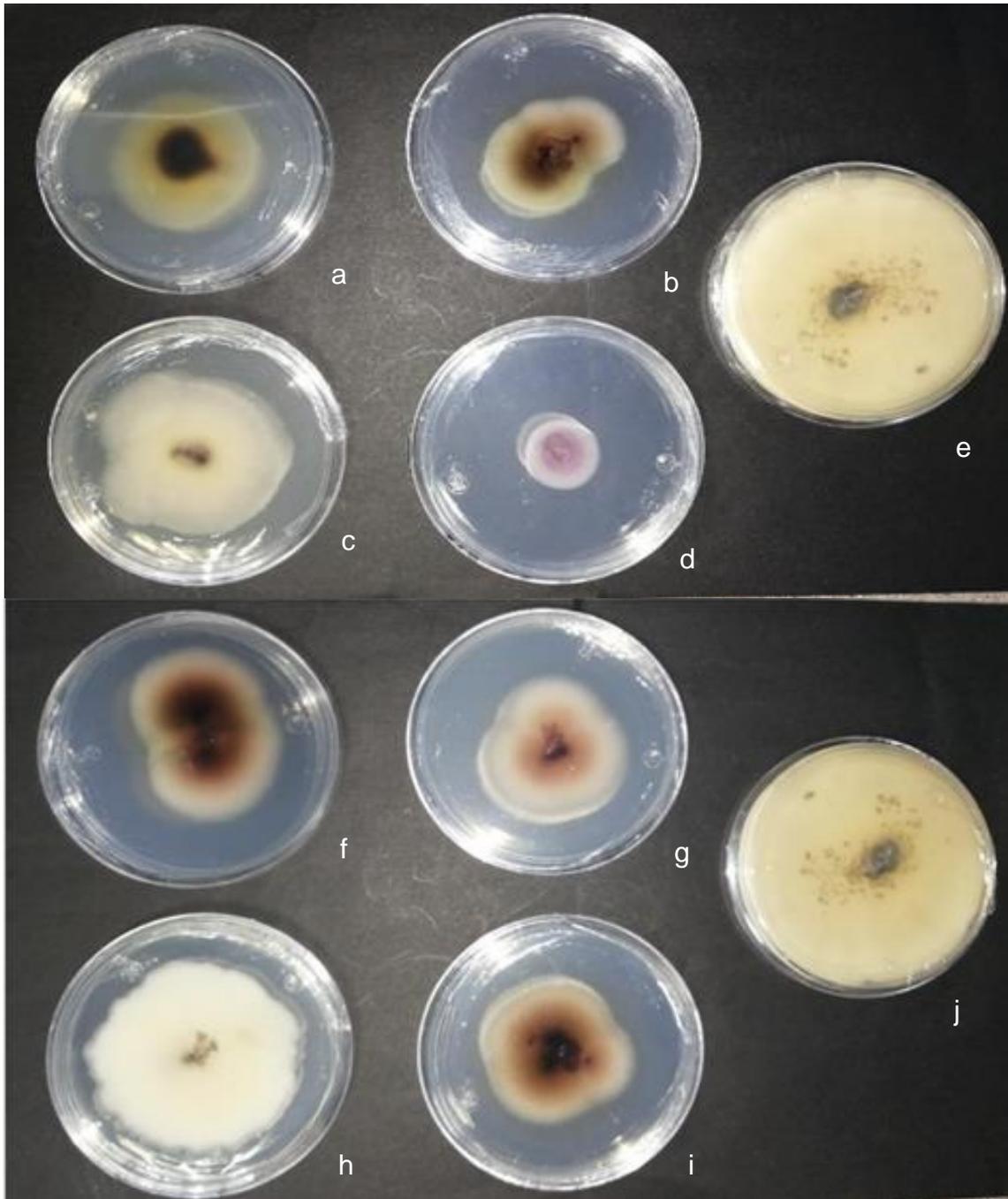


Figura 12. Actividad antifúngica del quitosano + aceite esencial de ruda, contra *Fusarium oxysporum* (a, b, c, d), quitosano (f, g, h, i) y hongos testigo (e, j).

Los periodos en los que cuenta con mayor eficacia el aceite esencial de la ruda parece similar a lo reportado por Río (2019), quién utilizó aceites esenciales de orégano, tomillo y clavo contra *Aspergillus niger* y *Penicillium sp* manteniendo capacidades antifúngicas diferentes ante los mismos hongos y que los aceites fueron más efectivos empleándolos al 100% y 50%, teniendo una efectividad durante los 7 días de incubación, posteriormente se puede observar crecimiento en placa y en este caso la mayoría de aceites en emulsión, muestran excelentes capacidades antifúngicas a una concentración de 10%; sin embargo, estos resultados variaran dependiendo del género y especie del hongo a tratar.

Los efectos inhibitorios del extracto etanólico de ruda de este estudio, coinciden también con los resultados de Reyes-Quintanar *et al.* (2014), ya que en su evaluación *in vitro*, el extracto etanólico de ruda, inhibió 53% a 81% el desarrollo de esporas del moho *Trichoderma aggressivum*, reduciendo también el desarrollo y su velocidad de crecimiento entre 5 y 6 días.

La razón por la cual el efecto inhibitorio del aceite esencial es mayor en lugar del extracto etanólico, se puede deber a lo reportado por Semerdjieva *et al.* (2019), quienes mencionan que *Ruta graveolens* está compuesta de alrededor de 69.2% de cetonas, las cuales poseen actividad antimicrobiana y estas se encuentran en todas las partes de la planta de ruda.

6.5. Composición química del aceite esencial de *Ruta graveolens*

Los resultados del análisis de la muestra de aceite esencial de *R. graveolens* obtenida de la región de la meseta tarasca utilizando UHPLC-ESI, indican que el principal componente y mayoritario es Cinnamoyl chromone (nombre IUPAC: 2-(3-fenilprop-2-enil)cromen-4-ona) con una relación masa carga de 277.0831 m/z como se aprecia en los cromatogramas de la figura 16. Las caracterizaciones químicas de aceites esenciales de *R. graveolens* que se encuentran reportadas regularmente, se realizan empleando cromatografía de gases y cromatografía de gases acoplado a masas, donde indican que los componentes mayoritarios son las cetonas 2-undecanona y la 2-nonanona (Pino *et al.*, 2014). Sin embargo, es

importante resaltar que la cromona identificada mediante esta otra metodología como al menos otras 54, se encuentran naturalmente en las familias botánicas Rutaceae, Selaginellaceae, Simaroubaceae, Sterculiaceae, Aloaceae, Apiaceae, Asteraceae, Caesalpinaceae, Chaetomiaceae, Fabaceae, Hyperiaceae, Moraceae, entre otras de las cuales, la mayoría contienen grupos alcoxilo o hidroxilo (Ellis, 1977) y que son moléculas cuya estructura molecular tiene una gran gama de actividades biológicas como: antifúngicas, actividad antioxidante, antialérgicas, antivirales, antihipertensivas, antiinflamatoria, antitubulinas y como agentes anticancerígenos (Sharma *et al.*, 2011).

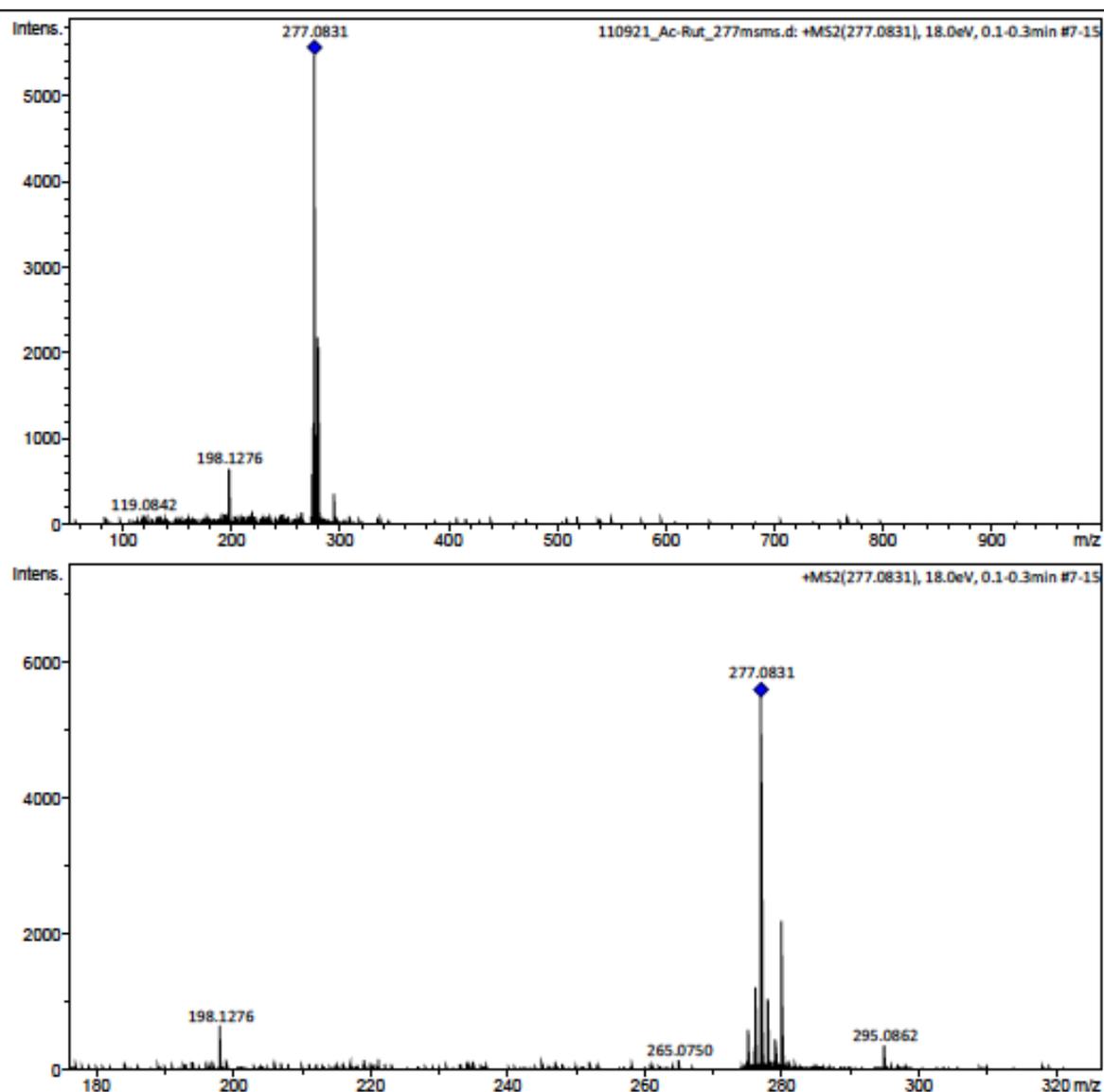


Figura 16. Cromatogramas del aceite esencial de ruda, empleando UHPLC-ESI.

Aunado al efecto anterior de los componentes Cinnamoyl chromone , 2-undecanona y 2-nonanona, otra razón por la que los aceites mantienen una actividad inhibitoria mayor, puede ser por su hidrofobicidad, ya que ésta divide los lípidos de la membrana celular y mitocondrias y al final alteran las estructuras celulares haciéndolas más permeables y produciendo la muerte celular debido a la pérdida de su contenido (Solorsano-Santos & Miranda-Novales, 2012).

Los resultados también concuerdan con estudios previos por Oliva *et al.* (2003) sobre el uso de compuestos activos del extracto de acetato de etilo de *Ruta graveolens* contra *F. oxysporum*, inhibiendo el crecimiento en un 50%, 37% y 44%, y un 77% y 100% de efectividad al utilizar el benomilo.

A diferencia de Reyes *et al.* (2021) que al utilizar el extracto de *Ruta graveolens* contra *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum* y *Stemphylium vesicarium* con extracto etanólico, obtuvo inhibiciones de entre 69% y 73% y mínimo de 23% a 39%, mencionando que este tipo de hongos son sensibles a los terpenos, furanocomarinas y a ácidos grasos presentes en las partes aéreas de la planta.

Por lo tanto, se afirma que los terpenos, ácidos grasos, así como los alcaloides, poseen un mecanismo de acción antifúngico que actúan rompiendo la membrana celular y disfunción de la mitocondria y en cuanto a los compuestos fenólicos, la acción antifúngica suele ser a través de la inhibición de las mitocondrias y la alteración de la membrana celular (Freiesleben & Jäger, 2014).

Sin embargo, la acción antifúngica de los metabolitos secundarios, estará sujeta a diferentes resultados en la aplicación del mismo tratamiento en cada hongo, debido al tipo de extracto y a los hongos probados; de la misma manera, las concentraciones y especies de plantas, ya que algunos hongos tendrán la capacidad de adaptarse ante la acción de los metabolitos (El-Mergawi *et al.*, 2018).

Por otro lado, el uso del quitosano en diversos estudios, ha demostrado su capacidad para inhibir el crecimiento micelial de varios hongos fitopatógenos, debido que este polímero, afecta la síntesis de la pared celular y su estructura de la

membrana (López-Díaz *et al.*, 2021). El quitosano por sí solo, tiene la capacidad antifúngica para diferentes fitopatógenos, pero también se han realizado estudios de manera combinada con aceites esenciales; uno de ellos fue realizado por Correa-Pacheco *et al.* (2018) quienes utilizaron nanopartículas de quitosano con aceite esencial de limón y tomillo contra *A. alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, y *Rhizopus stolonifer*, estudio en el cual se obtuvo una inhibición conjunta del 100% con aceite de tomillo al 5%, similar a los resultados obtenidos en este estudio contra el hongo de *Exserohilum tursicum*, con aceite esencial de ruda.

La actividad inhibitoria del quitosano en el desarrollo del micelio de algunos hongos, puede ser atribuido según Chávez *et al.* (2019) al ablandamiento de la pared celular, en consecuencia de la interacción del biopolímero de característica catiónica, con la membrana plasmática, permitiendo un cambio en la permeabilidad, afectando la entrada de nutrientes, ya que en su estudio se obtuvo un 100% de inhibición del crecimiento micelial de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides*, aislados de aguacate, mediante la combinación de quitosano al 5% con aceite de canela.

Entonces este hecho puede ser similar a lo mencionado por Luque *et al.* (2016), en el sentido de que el poder inhibitorio del quitosano, puede estar sujeto a las interacciones electrostáticas Van de Waals; es decir, que los tipos de enlaces de hidrogeno y los componentes cargados negativamente en la membrana celular del hongo y la carga positiva de las nanopartículas, pueden afectar la membrana y provocar alteraciones en sus propiedades, hasta inducir la muerte del microorganismo.

VII. CONCLUSIONES

En este estudio se encontró que el extracto etanólico, presenta un efecto positivo en la inhibición del crecimiento radial contra los hongos *Exserohilum turcicum* y *Coniothyrium phyllachorae*, con una concentración de 100mg/mL, sobre todo en los primeros días de incubación de los hongos. En cuanto al aceite esencial de ruda, fue el que obtuvo el mayor porcentaje de inhibición contra los hongos *Exserohilum turcicum* (96%), *Coniothyrium phyllachorae* (100%) y *Fusarium oxysporum* (86%), incluso fue mejor que el benomilo para controlar *E. turcicum* y *C. phyllachorae*. Mientras que con el uso de quitosano y quitosano más aceite esencial contra *E. turcicum* se obtuvo un 89% y 90% de efectividad, respectivamente.

Por lo tanto, se considera que los metabolitos secundarios de la ruda, tienen un gran potencial en la inhibición de los hongos *E. turcicum*, *C. phyllachorae* y *F. oxysporum*, por lo que se resalta la utilidad que pueden tener estos resultados, para futuros estudios relacionados con el control de hongos fitopatógenos.

También se considera que los resultados obtenidos en este estudio, abren la posibilidad de desarrollar biofungicidas para el control de enfermedades del maíz criollo de Cherán, Michoacán y minimizar la utilización de fungicidas químicos.

El principal componente y mayoritario del aceite esencial de *R. graveolens*, obtenida de la región de la meseta tarasca, es el Cinnamoyl chromone (nombre IUPAC: 2-(3-fenilprop-2-enil)cromen-4-ona).

VIII. BIBLIOGRAFÍA

- Abdul, K., Loladze, A., Kruseman, G., San- Vicente, F.M. (2018). Threats of tar spot complex disease of maize in the United States of America and its global consequences. *Miting Adapt Strateg Glob Change*, 24:281-300.
- Alarcón, P. (2009). Etnoecología de los Indígenas P´Urhepecha. *Cieco*, 1-103.
- Alieri, M., & Toledo, V. (2010). La revolución agroecológica de América Latina: Rescatar la naturaleza, asegurar La soberanía alimentaria y empoderar al campesino. *CLACSO*, 163-202.
- Alvarado, A., Barrera, L., Hernández, A., Velázquez, M. (2011). Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. *Revista Colombiana de Biotecnología*, Bogotá Colombia, 8(2):127-134.
- Amézcuca, J. & Gerardo, S. (2015). Pueblos indígenas de México en el siglo XXI (Vol. III). México: CDI.
- Ángeles, D. (2008). Alimentación tradicional Purépecha, una delicia que se pierde. Periódico *El Sol de Morelia*, Pág. 1.
- Attia, E.Z., Abd El-Baky, R.M., Desoukey, S.Y., Mohamed, M.A.E.H., Bishr, M.M. and Kamel, M.S. (2018). Chemical composition and antimicrobial activities of essential oils of *Ruta graveolens* plants treated with salicylic acid under drought stress conditions. *Future Journal of Pharmaceutical Sciences*, 1-11 p.
- Azalework, H.G., Sahabjada., Jafri, A., Arshad, M., & Malik, T. (2017). Phytochemical investigation, gc-ms profile and antimicrobial activity of a medicinal plant *Ruta graveolens* L. From Ethiopia. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9(6), 29.
- Bañuelos-Valenzuela, R., Delgadillo-Ruiz, L., Echavarría-Cháirez, F., Delgadillo-Ruiz, O., & Meza-López, C. (2018). Composición química y FTIR de extractos

etanólicos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. Revista Agrocienza, 52(3), 309-321.

Barnett, H.L. and Hunter, B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. American Phytopathological Society, USA. 241 pp.

Bohórquez, N.V., Enciso, N.A.A. & Hernández, W.A. (2016). Efecto del almacenamiento sobre las propiedades físicas de las películas de quitosano con inclusión de aceites esenciales de tomillo y romero. Materia (Rio de Janeiro), 21(1), 141–156.

Boiteux, J., Espino, M., Fernández, M. D., Pzzuoul, P., & Silva, M. (2019). Control sustentable postcosecha: extractos de *Larrea cuneifolia*. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias, (2):427-437.

Cabezas, I.A. (2020). Aceites esenciales de *Mentha piperita*, *Mentha spicata* y *Mentha suaveolens* para el control de hongos patógenos y de postcosecha: composición química y actividad antifúngica. Universitat Politecnica de Valencia. <http://hdl.handle.net/10251/151005>

Calixto, M.J.V. (2019). Inhibición del crecimiento de *Aspergillus* spp. y *Mucor* spp., con aceite esencial de menta y ruda. Avances de Investigación en Inocuidad de Alimentos, 2.

Carrillo, F.J.A., Cruz. O.J.E. y García, Q.J.R. (2014). Medios de cultivo y aislamientos de microorganismos. En: Tópicos selectos de Agronomía. Universidad Autónoma de Sinaloa. Universidad Autónoma de Nuevo León. México. 261-270.

Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Méndez, M., Rodríguez, R., Reyes, A. y Aguilar, C.N. (2010). *In vitro* antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. Industrial Crops And Products. 32:324-328.

Ceccon, E. (2008). La revolución verde tragedia en dos actos. Ciencias, 21-29.

CEDRSSA. (2019). Resultados de la encuesta nacional agropecuaria 2017. *CEDRSSA*, 1-24.

Chávez-Magdaleno, M.E., Gutiérrez-Martínez, P., Montaña-Leyva, B., & González-Estrada, R.R. (2019). Evaluación *in vitro* del quitosano y aceites esenciales para el control de dos especies patógenas de *Colletotrichum* aisladas de aguacate (*Persea americana* Mill). *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico – Biológicas*, 22.

CIMA. (2019). <https://www.cima.aserca.gob.mx/>. Obtenido CIMA:Ps://www.cima.aserca.gob.mx/work/models/cima/pdf/cadena/2019/Reporte_Mercado_Maiz_070819.Pdf. (Revisado el 25/03/2020).

CIMMYT. (2004). Enfermedades del maíz: una guía para su identificación en el campo. Cuarta Edición. México, D.F.: CIMMYT, Programa de maíz y trigo.

Colmenares, G. & Arcia, M. (2019). Gestión sostenible para la producción de biofungicidas y fortalecimiento del sector de bioinsumos agrícolas venezolano. Universidad Central de Venezuela, 26-40.

Coutiño, E. (2017). Mejoramiento genético de maíz ante el complejo mancha de asfalto en el sureste de México. Suplemento de la Revista Mexicana de Fitopatología. 35:16-20.

Correa-Pacheco, Z.N, Bautista-Baños, S., Hernández-López, M. y Marquina-Valle, M.Á. (2018). Evaluación de nanoformulaciones en el desarrollo *in vitro* de hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 36(3) 457-467.

Cruz, C.R. y Piontelli, E. (2020). *Exserohilum rostratum* (Drechsler) Leonard y Suggs. *Revista Chilena de Infectología*. 1(1)45-46.

De la Torre-Hernández, M.E, Sánchez-Rangel, D., Galeana-Sánchez, E., & Plasencia-de la Parra, J. (2014). Fumonisin –síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides* - maíz. *Tip Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77–91.

- Delgadillo, R.L., Bañuelos V.R., Delgadillo, R.O., Silva, V.M. & Gallegos, F.P. (2017). Composición química y efecto antibacteriano in vitro de extractos de *Larrea tridentata*, *Origanum vulgare*, *Artemisa ludoviciana* y *Ruta graveolens*. *Nova Scientia*, 9(19), 273-290.
- Díaz, M. (2017). Determination of the yield at different extraction times of the essential oil of the root *Salvia trifilis* Epling (mejorana) by the steam trapping method. *Agroindustrial Science*, 7(2), 73–77.
- Duarte, Y., Pino, O., Infante, D., Sánchez, Y., Travieso, M. C. & Martínez, B. (2013). Efecto *in vitro* de aceites esenciales sobre *Alternaria solani* Sorauer. *Revista de Protección Vegetal*, 28(1), 54-59.
- Ebel, R.J. & González, J. (2017). Manejo orgánico de la milpa: Rendimiento de maíz, frijol y calabaza en monocultivo y policultivo. *Terra Latinoamericana*, 35(2), 149-160.
- Ellis, G.P. (1977). Naturally occurring chromones in chemistry of heterocyclic compounds, chapter VII, Ed. Ellis, John Wiley & Sons, Ltd. Volume 31, pp. 455.
- El-Mergawi, R.A., Ibrahim, G. & Al-Humaid, A. (2018). Screening for antifungal potential of plant extracts of fifteen plant species against four pathogenic fungi species. *Gesunde Pflanzen*, 70(4), 217–224.
- El-Sayed, K., Mansour, S., Farouk, S. and Ross, S.A. (2000). New quinoline alkaloids from *Ruta chalepensis*. *J. Nat. Products*. (63):995-997.
- Estrada, B.C (2017). Mejoramiento de maíz para el complejo de manchas de alquitrán en el sureste de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35 (Suplemento).
- Fajardo-Franco, M. L., Aguilar-Tlatelpa, M., & Guzmán-Plazola, R.A. (2020). Evaluación de fungicidas en dos variedades de café para el control de *Emileia vatatrix*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 38(2):1-14.

- FAO. (2001). El maíz en los tropicos: Mejoramiento y producción. FAO, 1-61.
- FAO. (2010). Biopreparados para el manejo sostenible de plagas y enfermedades en la agricultura urbana y periurbana. Guía ¿Cómo Hacerlos?, 1-94.
- Freiesleben, S.H. and Jäger, A.K. (2014). Correlation between plant secondary metabolites, and their antifungal mechanisms – a Review. Med. Aromatic Plants 3, 2. <https://doi.org/10.4172/2167-0412.1000154>
- Giresha, A.S, Anitha, M.G. and Dharmappa, K.K. (2015). Phytochemical composition, antioxidant and in-vitro anti-inflammatory activity of ethanol extract of *Ruta graveolens* L. leaves. Int J Pharm Pharm Sci , 7 (10), 272-76.
- Gómez, L., Márquez, S. & Restrepo, L. (2018). La milpa como alternativa de conversión agroecológica de sistemas agrícolas convencionales de frijol (*Phaseolus vulgaris*), en el municipio El Carmen de Viboral, Colombia. IDESIA, 36(1), 123-131.
- González, M.S.L., Ávila, M.L.A., Blanco, W.G. y Silva, G.J.T. (2015). Comunidades indígenas: Entre la adaptación a alteraciones climáticas locales y el abandono de la agricultura. Revista de Antropología Iberoamericana, 10(1), 27-48.
- Hernández, A. M. A., Necha, L. L. B., Lauzardo, A. N. H. & Del Valle, M.G.V. (2011). Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. Revista Colombiana de Biotecnología, 13(2), 127-134.
- Hüller, A.S., Santini, E.J., Talgatti, M., Da Silveira, A.G., Valcorte, G., De Oliveira, L.H. & Estigarribia, M.G. (2019). Capacidade antifúngica do extrato vegetal de *Ruta graveolens* sobre o desenvolvimento dos fungos apodrecedores *Gloeophyllum trabeum* e *Pycnoporus sanguineus*. Revista Brasileira de Iniciação Científica, 6(6), 31-43.

- INEGI. Instituto Nacional de Estadística y Geografía. (2017). Anuario Estadístico Y Geográfico de Michoacán de Ocampo. 726 p.
- Jaradat, N., Adwan, L., K'aibni, S., Zaid, A.N., Shtaya, M.J.Y., Shraim, N. & Assali, M. (2017). Variability of chemical compositions and antimicrobial and antioxidant activities of *Ruta chalepensis* leaf essential oils from three Palestinian regions. *BioMed Research International*, 2017, 1–9.
- Jaramillo, E., Barrezueta-Unda, S., Luna, E. & Castillo, S. (2017). *In vitro* evaluation of the *Aloe vera* gel on *Mycosphaerella fijiensis*, causative agent of black Sigatoka disease in Musa (AAA). *Scientia Agropecuaria*, 8(3), 273-278.
- Jeon, J.H., Lee, S.G. & Hoi, S. (2015). Isolation of insecticidal constituent from *Ruta graveolens* and structure-activity relationship studies against stored-foodpests (Coleoptera). *Journal Of Food Protection*, VIII(78), 1536-1540.
- Jiménez-Reyes, M.F., Carrasco, H., Olea, A.F., & Silva-Moreno, E. (2019). Compuestos naturales: una alternativa sostenible al control de fitopatógenos. *Revista de la Sociedad Química Chilena*. 64(2), 4459-4465.
- López-Bautista, V., Mora-Aguilera, G., Gutiérrez-Espinosa, M.A, Mendoza-Ramos, C., Martínez-Bustamante, V.I, Coria-Contreras, J.J, Acevedo-Sánchez, G. y Santana-Peñaloza, B. (2019). Caracterización morfológica y molecular de *Fusarium* spp. asociado a la ocurrencia regional de marchitez y pudrición seca del cogollo en *Agave tequilana*. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 38(1):1-28.
- López-Díaz, S., Sandoval-Flores, M. G., Flores-Pantoja, L. E., Jiménez-Mejía, R., Santoyo, G., & Loeza-Lara, P. D. (2021). Quitosanos y compuesto quitosano-octanoato de sodio reducen la pudrición de fresa en poscosecha. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 12(6), 1131–1137
- Luque-Alcaraz, A.G., Cortez-Rocha, M.O., Velázquez-Contreras, C.A., Acosta-Silva, A.L., Santacruz-Ortega, H. del C., Burgos-Hernández, A., Argüelles-

- Monal, W.M. & Plascencia-Jatomea, M. (2016). Enhanced antifungal effect of chitosan/pepper tree (*Schinus molle*) essential oil bionanocomposites on the viability of *Aspergillus parasiticus* spores. *Journal of Nanomaterials*, 1–10.
- Luque-Alcaraz, A. G., Lizardi, J., Goycoolea, F. M., Valdez, M. A., Acosta, A. L., Iloki-Assanga, S. B., Higuera-Ciapara, I., & Argüelles-Monal, W. (2012). Characterization and antiproliferative activity of nobiletin-loaded chitosan nanoparticles. *Journal of Nanomaterials*, 1–7.
- Mahmoud, E.A., Elansary, H.O., El-Ansary, D.O. & Al-Mana, F.A. (2020). Elevated bioactivity of *Ruta graveolens* against cancer cells and microbes using seaweeds. *Processes (Basel, Switzerland)*, 8(1), 75.
- Martinez-Nunez, B., Tadeo-Robledo, M., Espinosa-Calderon, A., García-Zavala, J.J, Silva-Rojas, H.V, Aguilar-Rincón, V.H y Miranda-Colin, S. (2019). Rendimiento de grano y resistencia al tizón foliar (*Exserohilum turcicum*) de híbridos de maíz fértiles y adrosteriles. *Revista Agrocienca*, 53(1), 73-88.
- Mesa, V., Marín, P.A., Ocampo, O., Calle, J. & Monsalve, Z. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos. *BIOMA*, 45.
- Obrador-Sánchez, J.A., Tzec-Simá, M., Canto-Canché, B. & Higuera-Ciapara, I. (2017). Técnicas para el aislamiento, identificación y caracterización molecular de cepas de *Ralstonia solanacearum* relacionadas a Moko del plátano. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 35(3), 509-533.
- Ojala, T., Remes, S., Haansuu, P., Vuorela, H., Hiltunen, R., Haahtela, K. and Vuorela, P. (2000). Antimicrobial activity of some courmain containing herbal plants growing in Finland. *J. Ethnopharmacol.* 73:299-305.
- Oliva, A., Lahoz, E., Contillo, R. and Aliotta, G. (1999). Fungistatic activity of *Ruta graveolens* extract and its allelochemicals. *J. Chemical Ecol.* 3(25):519-526.

- Oliva, A., Meepagala, K.M., Wedge, D.E, Harries, D., Hale, A.L, Aliotta, G. and Duke, S.O. (2003). Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51 (4), 890-896.
- Orozco, Q. & Odenthal, J. y Astier, M. (2017). Diversidad de maíces en Pátzcuaro, Michoacán, México, y su relación con factores ambientales y sociales. *Revista Agrociencia*, 51(8), 867-884.
- Orozco-Ramírez, Q., Odenthal, J. y Astier, M. (2017). diversidad de maíces en Pátzcuaro, Michoacán, México, y su relación con factores ambientales y sociales. *Revista Agrociencia*, 51 (8): 867-884.
- Ouerghemmi, I., Bettaieb R.I., Rahali, F.Z., Bourgou, S., Pistelli, L., Ksouri, R., Marzouk, B. & Saidani T.M. (2017). Antioxidant and antimicrobial phenolic compounds from extracts of cultivated and wild-grown Tunisian *Ruta chalepensis*. *Journal of Food and Drug Analysis*, 25(2), 350–359.
- Paleta, G. (2012). Territorios y ruralidades: Jornaleros agrícolas en el cultivo de zarzamora en el Valle de Los Reyes, Michoacán, México. *Revista de Antropología Experimental*, (12), 17-28.
- Pandey, D.K., Tripath, N.N., Tripathi, R.D. and Dixit, S.N. (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Food and Agricultural Organization of the United Nations*. 89:344-349.
- Pedroza, H. & Dicovskyi, L. (2007). Sistema de análisis estadístico con SPSS. Nicaragua: Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura (IICA).
- Pino, O., Sánchez, Y., Rojas, M.M., Abreu, Y., Correa, T.M. Martínez, D. y Montes de Oca, R. (2014). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de *Ruta chalepensis* L. *Revista de Protección Vegetal*. 29(3):220-225.

- Quihui-Cota, L., Morales-Figueroa, G.G., Valbuena-Gregorio, E., Campos-García, J.C., Silva-Beltrán, N.P. & López-Mata, M.A. (2017). Membrana de quitosano con aceites esenciales de romero y árbol de Té: Potencial como biomaterial. *Revista Mexicana de Ingeniería Biomédica*, 38(1), 255-264.
- Reddy, D.N. & Al-Rajab, A.J. (2016). Chemical composition, antibacterial and antifungal activities of *Ruta graveolens* L. volatile oils. *Cogent Chemistry*, 2(1), 1220055. <https://doi.org/10.1080/23312009.2016.1220055>
- Reyes-Quintanar, C.K., Martínez-Carrera, D., Morales A.P., Sobal C.M., Escudero-Uribe, A.H. & Ávila-Acevedo, J.G. (2014). Efecto del extracto de ruda (*Ruta graveolens*) en el crecimiento micelial de *Trichoderma*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 5(8), 1433-1446.
- Reyes-Vaquero, L., Bueno, M., Ventura-Aguilar, R.I., Aguilar-Guadarrama, A.B., Robledo, N., Sepúlveda-Jiménez, G., Vanegas-Espinoza, P.E., Ibáñez, E. & Del Villar-Martínez, A.A. (2021). Seasonal variation of chemical profile of *Ruta graveolens* extracts and biological activity against *Fusarium oxysporum*, *Fusarium proliferatum* and *Stemphylium vesicarium*. *Biochemical Systematics and Ecology*, 95(104223), 104223.
- Río, O.C.D. 2019. Actividad antifúngica de tres aceites esenciales contra hongos aislados de pintura mural. Tesis para obtener el grado de Máster en Conservación y Restauración de Bienes Culturales. Universitat Politècnica de Valencia. 105 p.
- Ríos, H.E.N., Ochoa, F.Y.M., Cerna, C.E., Landeros, F.J., Cepeda, S.M. & Rodríguez, G.R. (2017). Hongos asociados a la mancha de asfalto en el cultivo de maíz en México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 8(2), 457–462.
- Rocha, A., Lopez-Lopez, P.C. & Salgado-Guerrero, J.P. (2021). Communication, smart technologies and innovation for society. *Proceedings of CITIS 2021* (1st ed.). Springer.

- Rodríguez-Castro, A., Torres-Herrera, S., Domínguez-Calleros, A., Romero-García, A. & Silva-Flores, M. (2020). Extractos vegetales para el control de *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* y *Rhizoctonia solani*, una alternativa sostenible para la agricultura. *Abanico Agroforestal*, 2.
- Román, A., Monar, C., Silva, D. & Rodríguez, E. (2018). Fitopatógenos asociados a enfermedades foliares de maíz en la provincia de Bolívar. *Revista de Investigación Talentos*. pp. 544-553.
- Romero, R., Morales, P., Pino, O., Cermeli, M. & González, E. (2015). Actividad insecticida de seis extractos etanólicos de plantas. *Protección Vegetal*, 30 (Especial), 11-16.
- Sandoval, F.M.G., Jiménez, M.R., Santoyo, G., Alva, M.P.N., López, M.J.E. & Loeza, L.P.D. (2018). Compósitos de quitosano-ácidos grasos reducen la infección de *Botrytis cinerea* en fresa en poscosecha. *Nova Scientia*, 10(21), 207–227.
- Semerdjieva, I.B., Burducea, M., Astatkie, T., Zheljzakov, V. D. & Dincheva, I. (2019). Essential oil composition of *Ruta graveolens* L. fruits and hyssopus officinalis Subsp. aristatus (Godr.) Nyman biomass as a function of hydrodistillation time. *Molecules (Basel, Switzerland)*, 24(22), 4047.
- Sharma, S.K., Kumar, S., Chand, K., Kathuria, A., Gupta, A. and Jain, R. (2011), An update on natural occurrence and biological activity of chromones. *Current Medicinal Chemistry*, 18, 3825-3852.
- Silva, F., Demolin, G., Monteze, S., Fonseca, A., D'Ávila, V. & Costa, C. (2011). Insecticide effects of *Ruta Graveolens*, *Copaifera langsdorffii* and *Chenopodium ambrosioides* against pests and natural enemies in commercial tomato plantation. *Acta Scientiarum. Agronomy*, 33(1), 37-43.
- Sing, D., Singh, R., Kumar, S., Singk, P., Ojha, V. (2017). Turcicum leaf blight: A ubiquitous foliar disease of maize (*Zea mays* L.). *International Journal of Currient Microbiology and Aplied Sciences. India*. 6(3), 825-831.

- Solórzano-Santos, F. & Miranda-Navales, M.G. (2012). Essential oils from aromatic herbs as antimicrobial agents. *Current Opinion in Biotechnology*, 23(2), 136–141. doi:10.1016/j.copbio.2011.08.005
- Sotelo-Boyás, M.E., Valverde-Aguilar, G., Plascencia-Jatomea, N., Correa-Pacheco, Z.M., Jiménez-Aparicio, A., Solorza-Feria, J., Barrera-Necha, L. y Bautista-Baños, S. (2015). Characterization of chitosan nanoparticles added with essential oils. In vitro effect on *Pectobacterium caratovorum*. *Revista Mexicana de Ingeniería Química*. 14(3): 589-599.
- Sovová, H., Sajfrtová, M. & Stateva, R.P. (2017). A novel model for multicomponent supercritical fluid extraction and its application to *Ruta graveolens*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 120, 102–112.
- Strada, J., Rojas, E., Conles, M., Silva, M., Casini, C., Piatti, F. & Martínez, M.A. (2012). Evaluación de residuos de plaguicidas en granos de maíz (*Zea mays* L.) y trigo(*Triticum aestivum* L.) posterior a la aplicación en el almacenamiento y en el campo. *Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca*, 37(6), 412-417.
- Taíz, L., Zeiger, E. (2006). *Fisiología vegetal*. Los ángeles. Publicaciones de la Universitat Jaume.I. pp 534-558.
- Tobón, M.F. & López, G.L. (2011). Genotoxicidad del agua acontaminada por plaguicidas en en área de Antioquia. *Revista MVZ Córdoba*, 12(2), 2605-2615.
- Torre-Hernández, M., Sánchez, D., Galeana, E., Placencia, J. (2014). Fumonisin –síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*,17(1),77-91.
- Torres, G. & Marcel, M. (1997). *Maíz-tortilla políticas y alternativas*. México, D.F: Universidad Nacional Autónoma de México.

- Vázquez-Briones, M., & Guerrero-Beltrán, J. (2017). Effect of essential oil of *Cymbopogon citratus* in the physicochemical properties of chitosan films. *Scientia Agropecuaria*, 8(4), 401–409.
- Vázquez, L. (2003). Purépechas de Michoacán. CIESAS, 1-160.
- Velarde, F.S., Valdez, R.N., Zamora, G.F., López, M.R., Melgoza, V.C. M., & Garzón, T.J.A. (2018). Identificación molecular de *Fusarium* spp. aislados de maíz en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 9(8), 1675–1689.
- Venegas, M.D. (2016). Producción y comercialización del maíz en México, cobertura de riesgo con derivados. *Amecider – Itm.*, 1-21.
- Zepeda, I. (2018). Manejo sustable de plagas agrícolas en México. *Agricultura, Sociedad y Desarrollo*, 15(1), 99-108.
- Zerbino, M.S. & Fassio, A. (1995). Insectos plagas en maíz. *Boletín de divulgación* 51. 19 p.
- Zurita, V.H., Valle, V.L., Vázquez, C., Curay, Q.S., Buenaño, S.M. & Guevara, F.D. (2017). Eficiencia del uso de plantas insecticidas en el control del gorgojo del maíz, *Sitophilus zeamais* Motschulsky, (Coleoptera: Curculionidae). *Investigación Agraria*, 19(2), 120-126.