

Biodegradable films with fungistatic activity for the postharvest control of *Fusarium solani* in Hass avocado fruit

Películas biodegradables con actividad fungistática para el control postcosecha de *Fusarium solani* en fruto de aguacate Hass

Wendy Abril Coyotl-Pérez, Centro de Investigación en Biotecnología Aplicada-Instituto Politécnico Nacional, Tlaxcala 90700, México; Nemesio Villa-Ruano, CONACyT-Centro Universitario de Vinculación y Transferencia de Tecnología, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México; Efraín Rubio-Rosas*, Dirección de Innovación y Transferencia de Conocimiento, Benemérita Universidad Autónoma de Puebla, Puebla 72570, México.

*Corresponding author: efrain.rubio@correo.buap.mx

Received: March 31, 2022.

Accepted: July 11, 2023.

Coyotl-Pérez WA, Villa-Ruano N and Rubio-Rosas E. 2023. Biodegradable films with fungistatic activity for the postharvest control of *Fusarium solani* in Hass avocado fruit. Mexican Journal of Phytopathology 41(3): 343-371.

DOI: <https://doi.org/10.18781/R.MEX.FIT.2303-4>

First DOI publication: July 31, 2023.

Primera publicación DOI: 31 de Julio, 2023.

Abstract. Little is known on the use of biodegradable films for the control of diseases in crops of agricultural importance. Consequently, the objective of this work was to determine the efficacy of chitosan hybrid films impregnated with thyme essential oil on Hass avocado fruits previously infected with *Fusarium solani* isolated from the northeastern highlands of Puebla, Mexico. The native strain of *F. solani* was morphologically and

Resumen. Existen escasa información sobre el uso de películas biodegradables para el control de enfermedades en cultivos de importancia agrícola. En consecuencia, el objetivo de este trabajo fue determinar la eficacia de películas híbridas de quitosano con aceite esencial de tomillo sobre frutos de aguacate Hass previamente infectados con *Fusarium solani* proveniente de la sierra nororiental de Puebla, México. Se identificó morfológica y molecularmente la cepa nativa de *F. solani* y se evaluó la actividad fungistática de tres películas de quitosano suplementadas con 0.7% (FT1), 1.0% (FT2) y 1.3% (FT3) de aceite esencial de tomillo en condiciones *in situ* sobre el crecimiento de *F. solani* en frutos de aguacate. La textura, transmitancia y opacidad de las películas fueron obtenidas mediante microscopía electrónica de barrido y espectrometría UV-Vis, respectivamente. De manera general, se observó que aquellas películas con mayor concentración de aceite esencial de tomillo (1-1.3% p/v) presentaron menor transmitancia en el rango de luz UV y mayor

molecularly identified and the fungistatic activity of three chitosan films supplemented with 0.7% (FT1), 1.0% (FT2) and 1.3% (FT3) of thyme essential oil was evaluated *in situ* on the growth of *F. solani* in avocado fruits. Texture, transmittance and opacity of the films were obtained by scanning electron microscopy and UV-Vis spectrometry, respectively. Overall, it was recorded that films with a higher concentration of thyme essential oil (1-1.3% w/v) presented lower transmittance in the UV light range and higher opacity. Avocado fruits infected with *F. solani* simultaneously treated with FT2 and FT3 reduced the appearance of symptoms while preserved firmness, as well as fiber, fat, reducing sugars, and protein content ($p < 0.01$). In the same context, these materials promoted the conservation of the content of the nutraceuticals linoleic acid, oleic acid, palmitic acid and palmitoleic acid for 21 days. These results suggest that the hybrid films generated in the present study have the ability to control fusariosis caused by this fungus, prolonging the shelf life of Hass avocado fruit.

Key words: Chitosan, *Thymus vulgaris*, phytopathogens, rot, bromatological analysis, fatty acids.

The *Fusarium* genus is a group of phytopathogenic fungi associated to dry and soft rot of several plant species. This genus affects yields and fruit quality because of their ability to synthesize mycotoxins harmful to humans. Some of the mycotoxins biosynthesized by this genus are deoxynivalenol and zearalenones which disturb animal health, including that of humans (Liu *et al.*, 2022). Common toxigenic species are *Fusarium sambucinum*, *F. oxysporum* and *F. solani* (Liu *et al.*, 2022). *F. solani* is a phytopathogenic fungus linked to plant wilt affecting root and aerial parts,

opacidad. Los frutos de aguacate infectados con *F. solani* simultáneamente tratados con las películas FT2 y FT3 redujeron la aparición de síntomas de infección preservando la firmeza, así como el contenido de fibra, grasa, azúcares reductores y proteína de manera significativa ($p < 0.01$). De igual forma, promovieron la conservación del contenido de los nutraceuticos ácido linoleico, ácido oleico, ácido palmítico y ácido palmitoleico por 21 días. Estos resultados sugieren que dichos materiales tienen la capacidad de controlar la fusariosis generada por este hongo prolongando la vida útil del fruto de aguacate Hass.

Palabras clave: Quitosano, *Thymus vulgaris*, fitopatógeno, pudrición, análisis bromatológicos, ácidos grasos.

El género *Fusarium*, es un grupo de hongos fitopatógenos responsables de la pudrición seca y blanda de varias especies vegetales. Este género afecta el rendimiento y la calidad del fruto, además de producir micotoxinas que son perjudiciales para el ser humano. Algunas de las micotoxinas biosintetizadas por este género son el deoxinivalenol y zearalenonas que pueden afectar la salud animal incluyendo la humana (Liu *et al.*, 2022). Dentro de las especies toxigénicas comunes se encuentran *Fusarium sambucinum*, *F. oxysporum* y *F. solani* (Liu *et al.*, 2022). *Fusarium solani* es un hongo fitopatógeno responsable de la marchitez de algunas plantas, ya que afecta desde la raíz hasta la parte aérea provocando un daño que puede ser apreciado a simple vista (Mejía-Bautista *et al.*, 2016). Adicionalmente, se ha registrado la presencia de *F. solani* en maíz (*Zea mays*), frijol (*Phaseolus vulgaris*), cilantro (*Coriandrum sativum*), jitomate (*Solanum lycopersicum*), trigo (*Triticum aestivum*), papa (*Solanum tuberosum*), aguacate

and in many cases, this damage can be observed at first glance (Mejía-Bautista *et al.*, 2016). The presence of *F. solani* has been recorded in maize (*Zea mays*), common bean (*Phaseolus vulgaris*), coriander (*Coriandrum sativum*), tomato (*Solanum lycopersicum*), wheat (*Triticum aestivum*), potato (*Solanum tuberosum*), avocado (*Persea americana*) among other crops (Kong *et al.*, 2022). Hass avocado fruit represents an important economic income for Mexico since this country is the main producer and exporter worldwide (Ramos-Aguilar *et al.*, 2021). High fruit requirements by consumers are regarded to its content of vitamins, fiber, reducing sugars proteins, minerals and unsaturated fatty acids accumulated in its pulp (Ramos-Aguilar *et al.*, 2021). Some of these components are exploited by opportunistic microorganisms for their own benefit, causing a collateral decrease in fruit quality (Mejía-Bautista *et al.*, 2016). *Fusarium solani* is tagged as a phytopathogenic fungus of Hass avocado fruit because of its ability to cause plant wilt (Hernández-Medina *et al.*, 2015). A substantial incidence of this fungus is presented during postharvest period which considerably limits its commercialization (Wanjiku *et al.*, 2020). Although high demand and production of this fruit has increased, losses persists because of diverse biotic and abiotic factors which change its normal physiology (Bowen *et al.*, 2018; Pandey *et al.*, 2021). It has been recorded that wrong fruit management during postharvest period enhances phytosanitary issues (Ramírez-Gil *et al.*, 2021). These problems have turned into increasing crisis because of the non-discriminated use of agrochemicals. In the same context, the excessive use of these substances may induce microbial resistance (Pandey *et al.*, 2021). Due to the latter arguments, considering highly efficient control agents with negligible side effects against environment and public health is desirable. Based in latter points, our research group has focused

(*Persea americana*) entre otros cultivos (Kong *et al.*, 2022). El fruto del aguacate Hass representa un importante ingreso económico para México puesto que es el principal productor y exportador a nivel mundial (Ramos-Aguilar *et al.*, 2021). Dicho fruto presenta alta demanda debido a las propiedades nutritivas que ofrece al consumidor destacando el contenido de vitaminas, fibra, proteínas, azúcares reductores, minerales y ácidos grasos insaturados acumulados en su pulpa (Ramos-Aguilar *et al.*, 2021). Algunos de estos componentes son aprovechados por microorganismos oportunistas para su beneficio afectando colateralmente la calidad del fruto (Mejía-Bautista *et al.*, 2016). *Fusarium solani* es catalogado como un hongo fitopatógeno presente en el aguacate Hass porque causa marchitez o tristeza (Hernández-Medina *et al.*, 2015). Este hongo se ha caracterizado por estar presente en el periodo de poscosecha siendo un factor que limita la comercialización del aguacate (Wanjiku *et al.*, 2020). Aunque se ha observado un incremento en la producción del fruto, las pérdidas persisten debido a diversos factores bióticos y abióticos que alteran su fisiología (Bowen *et al.*, 2018; Pandey *et al.*, 2021). Se tiene registrado que las malas prácticas en el manejo del fruto durante la poscosecha provocan el desarrollo de problemas fitosanitarios (Ramírez-Gil *et al.*, 2021). Estos problemas se han convertido en una crisis que incrementa cada día por el uso desmedido de agroquímicos. Así mismo, la aplicación indiscriminada estas sustancias aumenta la resistencia microbiana (Pandey *et al.*, 2021). Por lo anterior, se ha optado por el uso de agentes de control de hongos fitopatógenos que sean eficaces y no perjudiciales para el medio ambiente y la salud pública. En función de lo anterior, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en el diseño y aplicación de películas fungistáticas sobre base quitosano y enriquecidas con aceites esenciales de canela y tomillo para el control de distintos patógenos del

in the design and application of fungistatic films containing chitosan and essential oils of cinnamon and thyme for the control of diverse pathogens of Hass avocado. These materials efficiently modulated the standard growth of *Fusarium verticillioides* and *Clonostachys rosea* in avocado fruits under postharvest conditions (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). Similarly, results on the use of chitosan films impregnated with thyme essential oil reported by Coyotl-Pérez *et al.* (2022a), indicated that these materials represent a viable alternative for controlling the soft rot raised by *C. rosea* infection in avocado fruit. Then, the exploration of these films on other pathogens of the same fruit is desirable. As is known, sustainable agriculture faces these problems with the aim of limiting the constant practice of unsafe agents (Eke *et al.*, 2020). Currently, the use of antifungal materials such as chitosan has acquired substantial importance due to their application in postharvest diseases (Yan *et al.*, 2021). However, chitosan is a polymer showing limitations in its antifungal activity and can be ineffective against specific filamentous fungi (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). Then, hybrid materials made with chitosan and essential oils are visualized as an agroecological alternative to reduce fungal diseases during postharvest period (Fernández *et al.*, 2015). On the bases of latter arguments, this work aimed to determine the efficacy of chitosan films impregnated with thyme essential oil on Hass avocado fruits, previously infected with a native strain of *Fusarium solani* isolated from symptomatic fruits collected in the northern highlands of Puebla, Mexico.

MATERIALS AND METHODS

Isolation and identification of an associated fungus. *Fusarium solani* was isolated from

aguacate Hass. Los materiales generados, han mostrado controlar de manera eficiente el crecimiento de *Fusarium verticillioides* y *Clonostachys rosea* en frutos de aguacate en condiciones de poscosecha (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). En este contexto, los resultados sobre el uso de películas de quitosano impregnadas con el aceite esencial de tomillo reportados por Coyotl-Pérez *et al.* (2022a), señalaron que estos materiales son una alternativa viable para controlar la pudrición blanda causada por *C. rosea* en aguacate, por lo que la exploración de estas películas sobre otros patógenos del mismo fruto es altamente recomendable. La agricultura sostenible busca hacer frente a estos problemas con el fin de limitar el uso de productos sintéticos con efectos tóxicos (Eke *et al.*, 2020). Actualmente, el uso de materiales antifúngicos como el quitosano ha adquirido una gran importancia principalmente para el control de enfermedades poscosecha (Yan *et al.*, 2021). Sin embargo, el quitosano no es un polímero con actividad antifúngica de amplio espectro y puede ser inefectivo contra ciertos hongos filamentosos (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). Los materiales hechos a base de quitosano y aceites esenciales representan una alternativa agroecológica para reducir la incidencia de enfermedades fúngicas durante el periodo poscosecha (Fernández *et al.*, 2015). Con base a lo anterior, el objetivo de este trabajo fue determinar la eficacia de películas de quitosano impregnadas con aceite esencial de tomillo, sobre frutos de aguacate Hass infectados con una cepa nativa de *Fusarium solani* aislada y caracterizada a partir de frutos sintomáticos colectados en la Sierra Nororiental de Puebla.

MATERIALES Y MÉTODOS

Aislamiento e identificación del hongo asociado. *Fusarium solani* fue aislado de aguacates

avocado fruits showing symptoms of soft rot as a consequence of the exploration of associated fungi of Hass avocado isolated from the northern highlands of Puebla which were included in investigations performed by Coyotl-Pérez *et al.* (2022a; 2022b) during June, 2021 in Yaonáhuac, Puebla, México (19°56'55" N 97°26'26" W; 1997 masl). Once isolated, the fungus was kept in potato dextrose agar (PDA). In addition, 1 cm² PDA microcultures were prepared for the identification and description of fungal reproductive structures. The microcultures were stored at 25 °C during 5 d in the dark and the structures were observed in a Primo Star Carl Zeiss optic microscope.

Molecular identification. The fungus was identified by genomic DNA extraction using the E.Z.N.A Plant DNA DS Mini Kit (Omega Bio-Tek) and the amplification of molecular markers using the primers ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) and ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) for the obtainment of partial sequence of the internal transcribed spacer of the ribosomal 18S gene (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022b). Additionally, the primers EF-1H (ATGGGTAAGGAAGACAAGAC) and EF-2T (GGAAGTACCAGTGATCATGTT) were used to obtain the partial sequence of the translation elongation factor 1-alpha (TEF-1 α) (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022b). The resulting amplicons were sequenced using commercial services of Macrogen Inc. (Seoul, South Korea). Once obtained, the sequences were compared with those deposited in the database of the National Center for Biotechnology Information (NCBI), through multiple alignments using BLAST software.

Pathogenicity tests. Cultures of 10 days grown in PDA were incubated at 4 °C for 12 h and exposed to solar radiation for 3 h, during three consecutive days. This action was done for stimulating the generation

con síntomas de pudrición blanda como resultado de la exploración de hongos asociados al fruto de aguacate Hass de la Sierra Nororiental del estado de Puebla, en investigaciones realizadas por Coyotl-Pérez *et al.* (2022a; 2022b) durante junio de 2021 en Yaonáhuac, Puebla, México (19°56'55" N 97°26'26" W; 1997 msnm). Una vez aislado, el hongo se mantuvo en medio agar dextrosa y papa (PDA). Adicionalmente, se realizaron microcultivos de 1 cm² en PDA para la identificación y descripción de las estructuras reproductivas del hongo. El microcultivo se almacenó a 25 °C durante 5 d en oscuridad y las estructuras fueron observadas en microscopio óptico Primo Star Carl Zeiss.

Identificación molecular. El hongo fue identificado mediante extracción del ADN genómico con el Kit E.Z.N.A Plant DNA DS Mini Kit (Omega Bio-Tek) y amplificación de marcadores moleculares usando los iniciadores ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG) e ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) para la obtención de la secuencia parcial del espaciador transcrito interno del gen ribosomal 18S (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022b). Además, se emplearon los iniciadores EF-1H (ATGGGTAAGGAAGACAAGAC) y EF-2T (GGAAGTACCAGTGATCATGTT) para la obtención de la secuencia parcial del gen del factor de elongación 1-alfa (TEF-1 α) (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022b). Los amplicones resultantes se secuenciaron utilizando los servicios comerciales de Macrogen Inc. (Seúl, Corea del Sur). Una vez obtenidas, las secuencias fueron comparadas con aquellas depositadas en la base de datos del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante alineamientos múltiples usando el programa BLAST.

Pruebas de patogenicidad. Siembras de hongos de 10 días de crecimiento en PDA, fueron incubados a 4 °C por 12 horas y expuestos a la radiación

of reproductive structures. Pathogenicity tests were carried out in healthy avocado fruits collected in the same zone of study in accordance with Coyotl-Perez *et al.* (2022a). The reproductive structures (conidia) were recovered from culture medium with sterile saline solution using a micropipette of 200 μ L capacity to be finally adjusted to 10,000 conidia per mL using a Neubauer chamber. A total of 100 conidia were inoculated in each healthy fruit by mechanical penetration with the aim to increase infection rate. The avocados were incubated at room temperature (25 °C), 70% relative humidity and photoperiod of 12 h:12 h light: darkness for 21 days. Symptoms and signs of rot were followed daily during the same period of time.

Phylogenetic analysis. The phylogenetic analysis of the native strain of *F. solani* was performed as reported by Romero-Arenas *et al.* (2022), using Clustal X 2.0 software. Multiple alignments were separately done with ITS and EF-1 α , respectively. Posteriorly, concatenation (assembly) and generation of phylogenetic tree were both performed with the predictive evolution software MEGA version 11.0.11.

Quantification of *in vitro* antifungal activity. The essential oil of thyme used in this investigation was extracted according to the protocol previously described by Coyotl-Pérez *et al.* (2022a). The chemical composition of the essential oil is described in Table 1. The obtainment of minimum inhibitory concentration (MIC) was achieved by microdilution using potato dextrose broth (PDB) in 96 well-plate added with resazurin (1 mM; Sigma-Aldrich Co. St Louis MO) as indicator of cell viability in a final volume of 300 μ L. Hyphal discs of 5 mm diameter were placed in each well of the plate at 28 °C for 48 h with different concentrations of thyme essential oil (0.1-6 mg mL⁻¹) emulsified with absolute ethanol. Hyphal discs were obtained

solar por 3 horas, durante tres días consecutivos. Lo anterior con la finalidad de estimular la generación de estructuras reproductivas. Las pruebas de patogenicidad se realizaron en frutos de aguacate Hass asintomáticos colectados en la misma zona de estudio de acuerdo con Coyotl-Perez *et al.* (2022a). Las estructuras reproductivas (conidias) fueron recuperadas del medio de cultivo con solución salina estéril usando una micropipeta de 200 μ L para finalmente ajustarse a una concentración de 10,000 conidios por mL usando una cámara de Neubauer. Un total de 100 conidias fueron inoculadas en cada fruto sano mediante penetración mecánica, con el objetivo de aumentar las probabilidades de infección. Los aguacates fueron incubados a temperatura ambiente (25 °C) a una humedad relativa de 70 °C y fotoperiodo de 12 h:12 h de luz y oscuridad durante por 21 días. Los síntomas y signos de pudrición blanda fueron monitoreados diariamente durante el mismo periodo de tiempo.

Análisis filogenético. El análisis filogenético de la cepa nativa de *F. solani* se realizó de acuerdo a lo reportado por Romero-Arenas *et al.* (2022), usando el programa Clustal X versión 2.0. Los alineamientos múltiples se efectuaron con las secuencias ITS y EF-1 α por separado. Posteriormente, se utilizó el programa de análisis evolutivo MEGA versión 11.0.11 para realizar la concatenación (ensamblaje) de ambas secuencias y la obtención del árbol filogenético.

Cuantificación de la actividad antifúngica *in vitro*. El aceite esencial de tomillo usado en esta investigación se extrajo y evaluó de acuerdo con los protocolos descritos previamente por Coyotl-Pérez *et al.* (2022a). La composición química del aceite se detalla en el Cuadro 1. La obtención de la concentración mínima inhibitoria (MIC) se obtuvo mediante microdilución en caldo dextrosa y papa (PDB) en microplacas de Elisa de 96 pocillos usan-

Table 1. Chemical composition of the thyme essential oil used as antifungal agent in the chitosan films evaluated in this investigation. The chemical profile has been previously reported by Coyotl-Pérez *et al.* (2022a).**Cuadro 1. Composición química del aceite esencial de tomillo usado como agente antifúngico en las películas de quitosano evaluadas en la presente investigación. El perfil químico ha sido reportado previamente por Coyotl-Pérez *et al.* (2022a).**

Compound	Retention index	Abundance (%)
Alpha-Pinene	939	2.5
Camphene	946	2.8
Beta-Pinene	974	2.1
Alpha-Phellandrene	1002	0.5
(2E)-Hexenyl acetate	1010	2.9
o-Cymene	1022	15.7
Gamma-Terpinene	1054	12.4
Linalool	1095	1.6
1-Terpineol	1130	2.4
Camphor	1141	0.5
Borneol	1165	1.4
Alpha-Terpineol	1186	0.3
Thymol, methyl eter	1232	1.7
Thymol	1289	43.6
Beta-Cubebene	1387	3.3
Beta-Elemene	1389	0.5
Beta-Caryophyllene	1417	1.2
Total		95.4

from cultures of *F. solani* of 7 days grown in PDA. At the end of this time, absorbance was recorded at 630 nm using PDB plus resazurin and PDB with resazurin plus hyphal discs as controls to normalize acquired results.

To obtain MIC, twenty replicates (n=20) were considered for each point of the dose-response curve and the percentage of inhibition was calculated based in the following formula:

$$\% \text{ inhibition} = \frac{(\bar{x} \text{ abs EO}) - (\bar{x} \text{ abs viability})}{(\bar{x} \text{ abs inhibition}) - (\bar{x} \text{ abs viability})} \times 100$$

Where:

\bar{x} : Arithmetic mean

Abs: Absorbance value at 630 nm

EO: Essential oil

do resazurina (1 mM; Sigma-Aldrich Co. St Louis MO) como indicador de viabilidad en un volumen final de 300 μ L. Discos hifales de 5 mm de diámetro fueron colocados en cada pozo e incubados a 28 °C por 48 h con diferentes concentraciones de aceite esencial de tomillo (0.1-6 mg mL⁻¹) emulsificado en etanol absoluto. Los discos hifales fueron obtenidos a partir de cultivos de *F. solani* de 7 d crecidos en PDA. Al término de este tiempo, la absorbancia se determinó a 630 nm usando PDB más resazurina y PDB con resazurina más discos hifales como controles para normalizar los resultados obtenidos.

Para obtener la MIC se efectuaron 20 repeticiones (n=20) para cada punto de la curva dosis-respuesta y se calculó el porcentaje de inhibición con la siguiente formula:

Film elaboration and physicochemical characterization. Films were obtained according to the methodology reported by Coyotl-Pérez *et al.* (2022a; 2022b) using high molecular weight chitosan from Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) with slight modifications. Three concentrations of thyme essential oil (0.7, 1.0 y 1.3% w/v) were mixed with 0.1 L chitosan solution (1% w/v) under constant stirring at 50 °C for 1.5 h. Twenty milliliters of this solution were spread into Petri dishes of 9 cm diameter to be dehydrated at 25 °C in a glass desiccator containing silica gel for 5 d. The films were manually scratched out from the Petri dish and named FT1, FT2 y FT3 according to their increasing oil concentration order. Posteriorly, the films were subjected to physicochemical analysis and biological assessment in accordance with Coyotl-Pérez *et al.* (2022a) and Morales-Rabanales *et al.* (2022). The physicochemical characterization included transmittance and opacity degree by UV-Vis spectrophotometry as well as texture by scanning electron microscopy (SEM) using a JEOL JSM-6610 apparatus (Akishima, Kanto, Japón). Conditions for SEM were those reported by Morales-Rabanales *et al.* (2022). On the other hand, width of each film was measured (n=10) using a digital micrometer iGaging with 0.001 mm precision. Transmittance and opacity were associated to width and absorbance according to the same authors (Morales-Rabanales *et al.*, 2022). Biological tests with obtained materials are described in the next section.

Fungistatic activity of chitosan films and thyme essential oil. Healthy fruits collected from the zone of study were transported to the laboratory to be sanitized by immersion in a 20% sodium hypochlorite solution for 1 h and posteriorly rinsed with sterile distilled water. Twenty-five avocados (n=25) were used for each treatment and these

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(\bar{x} \text{ abs AE}) - (\bar{x} \text{ abs viabilidad})}{(\bar{x} \text{ abs inhibición}) - (\bar{x} \text{ abs viabilidad})} \times 100$$

Donde:

\bar{x} : es la media aritmética

Abs: es el valor de la absorbancia a 630 nm

AE: Aceite esencial

Elaboración de películas y caracterización fisicoquímica. Las películas se obtuvieron de acuerdo a la metodología reportada por Coyotl-Pérez *et al.* (2022a; 2022b) usando quitosano de peso molecular medio adquirido de Sigma-Aldrich Co. (St. Louis, MO, USA) con ligeras modificaciones. Tres concentraciones de aceite esencial de tomillo (0.7, 1.0 y 1.3% p/v) fueron mezcladas con 0.1 L de una solución de quitosano al 1% (p/v) en agitación constante a 50 °C durante una hora y media. Veinte mililitros de la solución fueron vertidos en placas de Petri de 9 cm de diámetro para ser deshidratadas a 25 °C en un desecador de vidrio conteniendo gel de sílice durante 5 d. Las películas fueron extraídas manualmente de la placa Petri y denominadas como FT1, FT2 y FT3 en orden creciente de concentración de aceite. Posteriormente, fueron sometidas a análisis fisicoquímicos y evaluación biológica de acuerdo con Coyotl-Pérez *et al.* (2022a) y Morales-Rabanales *et al.* (2022). En la parte fisicoquímica se determinó la transmitancia y opacidad mediante espectrofotometría UV-Vis así como la textura por microscopía electrónica de barrido (SEM) usando un aparato JEOL JSM-6610 (Akishima, Kanto, Japón). Las condiciones de los ensayos SEM fueron aquellas reportadas por Morales-Rabanales *et al.* (2022). Por otra parte, se midió el grosor de cada película (n=10) con un micrómetro digital iGaging con precisión de 0.001 mm. La opacidad y transmitancia fueron asociadas al grosor y la absorbancia

were inoculated in a single point of the fruit with 100 conidia dissolved in saline solution (20 μ L) using a micropipette of 20 μ L capacity. Posteriorly, the fruits were covered with a specific film (FT1-FT3). The amount of conidia in the solution was calculated using a Neubauer chamber. Control groups consisted of infected avocados without film (control of infection), healthy avocados without film (control of non-infection) and, avocados covered with films of pure chitosan without essential oil. Experimental groups were incubated at 25 °C and 70% relative humidity under photoperiod of 12 h light and 12 h darkness during 21 days and symptom and sign appearance such as loss of turgor and mycelium emergence were documented during 21 d. Simultaneously, *in situ* evaluation was done over film surface using 1 cm² squares added with 100 viable conidia diluted in a final volume of 10 μ L. PDA (1 cm²) was used as a control of conidial germination which was inoculated with the same amount of cells. The films were incubated at 25 °C and relative humidity of 70% under photoperiod of 12 h light and 12 h darkness for 7 d. At the end of this period, the materials were observed under optic microscope to endorse mycelium emergence. Treatments with presence of mycelium were re-isolated and maintained in PDA to corroborate *F. solani* identity.

Quality parameters analysis. Firmness was the first quality parameter in accordance with Coyotl-Pérez *et al.* (2022a). Additionally, the nutritional composition (protein, reducing sugars, fat and fiber) was determined through the reported methodology of AOAC (2019). Complementarily, the levels of linoleic acid (18:2 n-6), oleic acid (18:1 n-9), palmitic acid (16:0) and palmitoleic acid (16:1) were estimated as nutraceutical parameters of the fruit (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a).

de las películas de acuerdo con los mismos autores (Morales-Rabanales *et al.*, 2022). Las pruebas biológicas con los materiales obtenidos se detallan en la siguiente sección.

Actividad fungistática de las películas de quitosano y aceite esencial de tomillo. Frutos sanos de aguacate colectados en la zona de estudio fueron trasladados al laboratorio para ser sanitizados por inmersión con hipoclorito de sodio al 20% durante 1 hora y posteriormente se enjugaron con agua destilada estéril. Para cada tratamiento se utilizaron 25 aguacates (n=25), los cuales fueron inoculados en un solo punto del fruto con 100 conidios disueltos con solución salina (20 μ L) usando una micropiteta de 20 μ L de capacidad. Posteriormente, se les colocó una película específica (FT1-FT3). La cantidad de conidios en la solución se calculó usando una cámara de Neubauer. Los grupos controles constaron de aguacates infectados sin película (control de infección), aguacates sanos sin película (controles de no infección) y, aguacates cubiertos con películas de quitosano puro sin aceite esencial. Los grupos experimentales fueron incubados a 25 °C a una humedad relativa del 70% en fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad durante 21 días y se documentó la aparición de síntomas y signos de infección, como fueron pérdida de turgencia y aparición de micelio durante 21 d. Simultáneamente, se realizó una evaluación *in situ* sobre la superficie de las películas, donde se utilizaron cuadros de 1 cm² sobre los cuales se vertieron 100 conidios viables diluidos en un volumen final de 10 μ L. Como control de germinación conidial se empleó 1 cm² de PDA inoculado con la misma cantidad de conidios. Las películas fueron incubadas a 25 °C a una humedad relativa del 70% en fotoperiodo de 12 h luz y 12 h oscuridad por 7 d. Al término de este tiempo, los materiales se observaron bajo microscopio óptico

Statistical analysis. Data from treatments processed by Analysis of Variance coupled to Tukey Tests ($p < 0.01$) using GraphPad Prism software version 8.0.1.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification and characterization. Morphologically, the isolated strain showed white color in the obverse of the Petri dish and cream color at the back of the same dish (Figure 1A and 1B). It showed filamentous border, cotton texture, smooth consistence and moderate radial growth (4-7 d). Macroconidia were erect, slightly curved with thin walls. Apical cells were curved and septate from

para constatar la presencia micelio. En los tratamientos en los que se observó micelio este se recolectó y se resembró en medio PDA para corroborar la presencia de *F. solani*.

Análisis de parámetros de calidad. Como primer parámetro de calidad, se evaluó la firmeza de acuerdo con Coyotl-Pérez *et al.* (2022a). Adicionalmente, se determinó la composición nutricional (proteínas, azúcares reductores, grasa y fibra) de los frutos de aguacate bajo la metodología reportada por la AOAC (2019). Complementariamente, se determinaron los niveles de ácido linoleico (18:2 n-6), ácido oleico (18:1 n-9), ácido palmítico (16:0) y ácido palmitoleico (16:1) como valoración del contenido nutraceutico del fruto (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a).

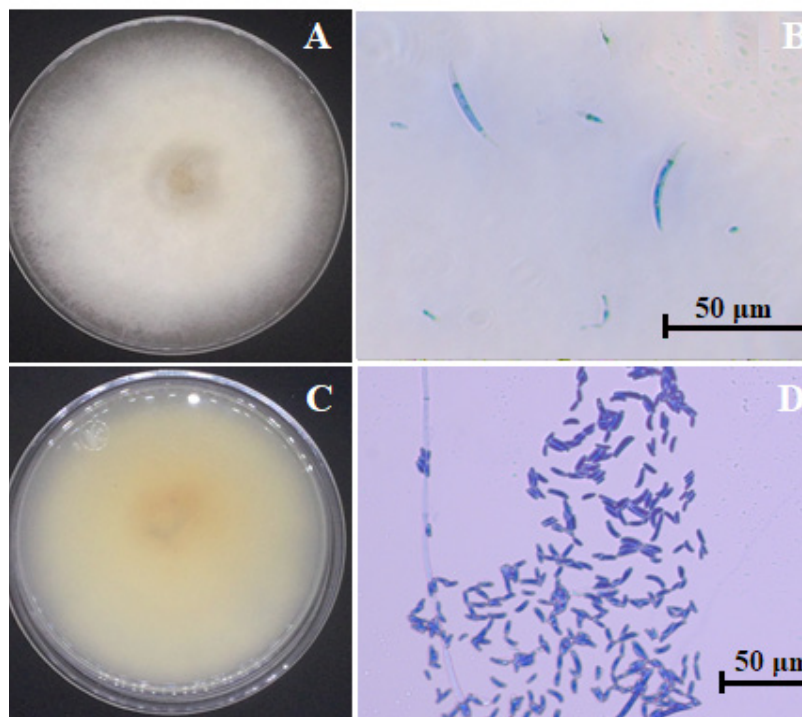


Figure 1. Morphology of *Fusarium solani*. A) Radial growth observed from the obverse of Petri dish in PDA after 7 days. B) Radial growth observed from the reverse of Petri dish. C) Macroconidia observed at 50X without staining. D) Microconidia observed at 50X stained with cotton blue.

Figura 1. Morfología de *Fusarium solani*. A) crecimiento radial observado desde el anverso de la placa Petri en medio PDA después de 7 días. B) crecimiento radial observado desde el reverso de la placa Petri. C) Macroconidios observados a 50X sin tinción. D) Microconidios observados a 50X teñidos con azul de algodón.

which non-branched phialides emerged. The length of macroconida was from 20 to 40 μm , these were thin, slightly curved and every macroconidium showed the presence of septa (Figure 1C). The length of microconida was from 5.96 to 10.3 μm (Figure 1D). These morphological features were consistent with those described by Wanjiku *et al.* (2020) and Dugassa *et al.* (2021) for *Fusarium solani*.

Molecular analysis revealed that the coding sequence for the internal transcribed spacer had a homology of 98.8% with that of sequence MN523174.1 of *Fusarium solani* reported by Rivedal *et al.* (2020). The sequence was deposited at the gene bank of NCBI with the accession code OR016146. On the other hand, the sequence of 682 bp corresponding to the translation elongation factor 1-alpha, had a homology of 97.7% with the sequence HM852038.1 of *Fusarium solani* reported by Scheel *et al.* (2013).

Phylogenetic analysis. The evolutionary history was inferred by the Neighbor-Joining method, which allowed to predict the phylogeny of *Fusarium solani* showing the sum of branch length equal to 0.23497162 (Figure 2). The percentage of replicates was grouped in the starting test (1000 permutations) with a scale of 0.020 from the concatenation of ITS and EF-1 α sequences. This analysis involved 12 nucleotide sequences and the model avoided alignment gaps with a total of 1014 positions in the final dataset. Such sequences were chosen in the basis of percentage of homology with obtained sequences of the *F. solani* strain isolated in the present investigation.

The concatenated sequences belonged to the accessions described in Table 2. Most homologues to that of *F. solani* were those isolated from *Panax ginseng* from China.

Análisis estadístico. Los datos de los tratamientos fueron interpretados mediante un análisis de varianza acoplado a una prueba Tukey ($p < 0.01$) con software GraphPad Prism versión 8.0.1.

RESULTADOS y DISCUSIÓN

Identificación y caracterización. Morfológicamente, la cepa aislada presentó una coloración blanca en su anverso y crema en el reverso (Figura 1A y 1B). Esta mostró borde filamentosos, textura algodonosa, consistencia suave y crecimiento radial moderado (4-7 días). Los macroconidios fueron rectos y ligeramente curvados con paredes delgadas. Las células apicales se encontraron ligeramente curvadas y septadas, a partir de las cuales emergen monofialides no ramificadas. Los macroconidios midieron 20 a 40 μm de largo, fueron delgados, ligeramente curvados y cada macroconidio presentó tres septos (Figura 1C) Los microconidios midieron de 5.96 a 10.3 μm de largo (Figura 1D). Estas características morfológicas fueron consistentes con las descritas por Wanjiku *et al.* (2020) y Dugassa *et al.* (2021) para *Fusarium solani*.

El análisis molecular, reveló que la secuencia codificante para el espaciador transcrito interno tuvo una homología del 98.8% con la secuencia MN523174.1 de *Fusarium solani* reportada por Rivedal *et al.* (2020). La secuencia fue depositada en el banco de genes del NCBI con el número de accesoión OR016146. Por otra parte, la secuencia de 682 pb correspondiente al factor de elongación 1-alfa, tuvo una homología del 97.7% con la secuencia HM852038.1 de *Fusarium solani* reportada por Scheel *et al.* (2013).

Análisis filogenético. La historia evolutiva se infirió utilizando el método Neighbor-Joining, misma

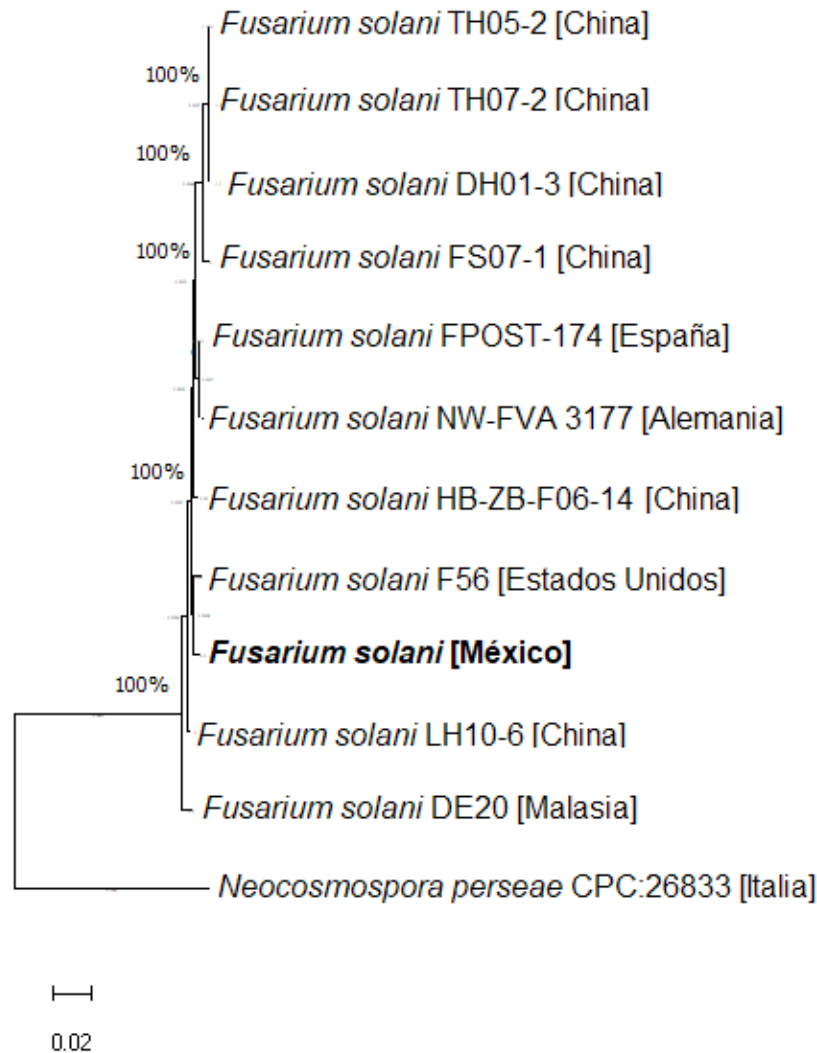


Figure 2. Phylogenetic tree of *Fusarium solani* with concatenated sequences of ITS and EF-1 α . The strain *F. solani* isolated from the northeast highland of Puebla is remarked in bold font.

Figura 2. Árbol filogenético de *Fusarium solani* con secuencias concatenadas de ITS y EF-1 α . La cepa de *F. solani* aislada de la Sierra Nororiental del estado de Puebla se resalta en letras negritas.

Assays of antimicrobial evaluation by broth microdilution. The results of the present study showed that thyme essential oil exerted a MIC of 4.4 ± 0.04 mg mL⁻¹ on *F. solani*. It is known that essential oils work as natural antifungal agents which additionally are environmentally friendly, renewable and easily biodegradable for the conservation of several foods (Pandey *et al.*,

que permitió predecir la filogenia de *Fusarium solani* mostrando una suma de longitud de rama igual a 0.23497162 (Figura 2). El porcentaje de réplicas se agrupó en la prueba de arranque (1000 permutaciones) a una escala de 0.020 a partir la concatenación de secuencias ITS y EF-1 α . Este análisis involucró 12 secuencias de nucleótidos y el modelo evitó brechas de alineación con un total de 1014

Table 2. Genic sequences extracted from the National Center for Biotechnology Information database to estimate phylogenetic relationships.**Cuadro 2. Secuencias génicas extraídas del banco de genes del National Center fo Biotechnology Information para estimar la proximidad filogenética.**

Species	Strain	Source	Country	Accession ITS/TEF-1 α	
<i>Fusarium solani</i>	FS07-1	<i>Panax ginseng</i>	China	MN636714.1	MN650117.1
<i>F. solani</i>	DH01-3	Ginseng (root)	China	MN637839.1	MN650105.1
<i>F. solani</i>	TH05-2	Ginseng (root)	China	MN637848.1	MN652892.1
<i>F. solani</i>	LH10-6	<i>Oryza sativa</i>	China	MK611942.1	MN927129.1
<i>F. solani</i>	F56	<i>Lilium longiflorum</i>	Estados Unidos	HQ379676.1	KY020039.1
<i>F. solani</i>	FPOST-174	Strawberry	España	KY484986.1	KX215054.1
<i>F. solani</i>	HB-ZB-F06-14	Beet	China	KT213074.1	KT213256.1
<i>F. solani</i>	DE20	Mangrove soil	Malasia	KF897899.1	KM580560.1
<i>F. solani</i>	TH07-2	Ginseng (root)	China	MN637851.1	MN652894.1
<i>F. solani</i>	NW-FVA_3177	<i>Fraxinus excelsior</i>	Alemania	MH191237.1	MH220421.1
<i>Neocosmospora perseae</i>	CPC:26833	<i>Persea americana</i>	Italia	LT991944.1	LT991906.1
<i>F. solani</i>	MA-W2	<i>Persea americana</i>	Mexico	OR016146	TEF submitted

2017). The mechanism of action of essential oils is conferred to the destabilization of fungal and bacterial cells walls and membranes (Pacheco-Hernández *et al.*, 2020). As a consequence, intracellular compounds drain causing cell death by lysis (Eke *et al.*, 2020). It has been reported the antimicrobial action of the methanolic extracts of *Artemisia annua* (Zaker, 2014) and *Larrea tridentata* (Rodríguez-Castro *et al.*, 2020) against *Fusarium solani* with percentages of inhibition over 50% at 5 mg mL⁻¹. Coyotl-Pérez *et al.* (2022a) reported that the concentration of thyme essential oil with more effectiveness against *Clonostachys rosea* was 2.13 mg mL⁻¹, this concentration was lower than that reported in the present study. Interestingly, the essential oil used in this study had the same chemical composition than that reported for the same authors with thymol (43.6%), O-cimene (15.7%) and gamma-terpinene (12.4%) as major compounds (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a).

Physicochemical characterization of films. The microstructure obtained by scanning electron

posiciones en el conjunto final de datos. Dichas secuencias se eligieron con base al porcentaje de homología con las secuencias obtenidas para *F. solani* aisladas en la presente investigación.

Las secuencias concatenadas pertenecieron a las accesiones descritas en el Cuadro 2. La mayoría de secuencias homólogas de *Fusarium solani* pertenecieron a aquellas aisladas de *Panax ginseng* provenientes de China.

Ensayos de evaluación antimicrobiana por microdilución en caldo. Los resultados del presente estudio demostraron que el aceite esencial de tomillo ejerció una MIC de 4.4 ± 0.04 mg mL⁻¹ sobre *F. solani*. Se sabe que los aceites esenciales funcionan como agentes antifúngicos naturales, ecológicos, renovables y fácilmente biodegradables para la conservación de muchos alimentos (Pandey *et al.*, 2017). El mecanismo de acción de los aceites esenciales radica en desestabilizar la pared celular y membrana citoplasmática de hongos y bacterias (Pacheco-Hernández *et al.*, 2020). En consecuencia, se genera una fuga de compuestos intracelulares que

microscopy (SEM) revealed that film surface of the chitosan hybrid films obtained in this work was homogenous as those reported to inhibit the growth of *C. rosea* in avocado fruit (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a). The presence of pores, bubbles or fractures was not observed (Figure 3), which indicated high miscibility between polymeric matrix and the essential oil. However, small irregularities were

provocan la muerte celular por lisis (Eke *et al.*, 2020). Se ha reportado la acción antimicrobiana de algunos extractos metanólicos de plantas como aquellos de *Artemisia annua* (Zaker, 2014) y *Larrea tridentata* (Rodríguez-Castro *et al.*, 2020) contra *Fusarium solani* con porcentajes de inhibición superiores al 50% en dosis de 5 mg mL⁻¹. Coyotl-Pérez *et al.* (2022a) reportaron la concen-

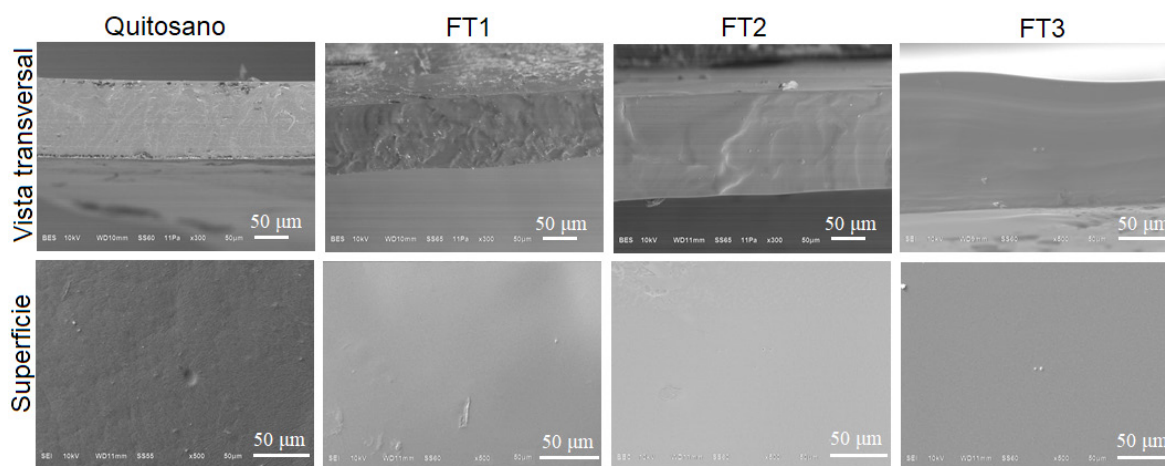


Figure 3. Micrographs of scanning electron microscopy for transversal views and surfaces of films elaborated with chitosan and hybrids films supplemented with thyme essential oil (FT1-FT3).

Figura 3. Imágenes de microscopía electrónica de barrido de la vista transversal y superficie de las películas elaboradas con quitosano y aquellas suplementadas con aceite esencial de tomillo (FT1-FT3).

observed in transversal views (Figure 3) but, these did not interfere with their malleability. The addition of essential oils in polymeric matrices requires emulsification and as a result, the dried material does not show signs of lipid accumulation in the surface (Lian *et al.*, 2020; Ardjoum *et al.*, 2023). The same behavior has been observed in other films impregnated with essential oil of clove (*Syzygium aromaticum*), citronella (*Pelargonium citrodorum*) and thyme (*Thymus vulgaris*) (Haghighi *et al.*, 2019). According to previous studies, the surface of a great variety of hybrid films is often uniform without bubbles, drops, pores or fractures (Haghighi

tración de aceite esencial tomillo evaluada contra *Clonostachys rosea* fue de 2.13 mg mL⁻¹, siendo mucho menor. Interesantemente, el aceite usado en este estudio tuvo la misma composición química que la reportada por los mismos autores, siendo el timol (43.6%), O-cimeno (15.7%) y γ -terpineno (12.4%) los compuestos mayoritarios (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a)

Caracterización fisicoquímica de las películas.

La microestructura obtenida por microscopía electrónica de barrido (SEM) reveló que la superficie de las películas híbridas de quitosano obtenidas en

et al., 2019). Contrastingly, the materials generated in this investigation showed small pores revealed in transversal views, especially in films containing the highest concentration of thyme essential oil such as FT2 and FT3 (Figure 3). These pores may be produced by the volatility of the essential oil during drying process (Lauriano *et al.*, 2017).

The observed transmittance for chitosan films containing 0.7% thyme essential oil showed a similar behavior than that of films made with pure chitosan (Figure 4A). The UV transmittance (190-300 nm) and visible light (350-800) was similar for chitosan films and FT1 films with no statistically

este trabajo, fue uniforme al igual que aquellas reportadas para inhibir el crecimiento de *C. rosea* en fruto de aguacate (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a). No se observaron poros, burbujas o grietas (Figura 3), lo cual indicó una alta miscibilidad entre la matriz polimérica y el aceite esencial. Sin embargo, pequeñas irregularidades fueron observadas al corte transversal (Figura 3), mismas que no interfirieron su maleabilidad. La adición de aceites esenciales en matrices poliméricas requiere emulsificación y como resultado, el material seco no presenta gotas de lípidos en la superficie (Lian *et al.*, 2020; Ardjoum *et al.*, 2023). Se ha observado este mismo

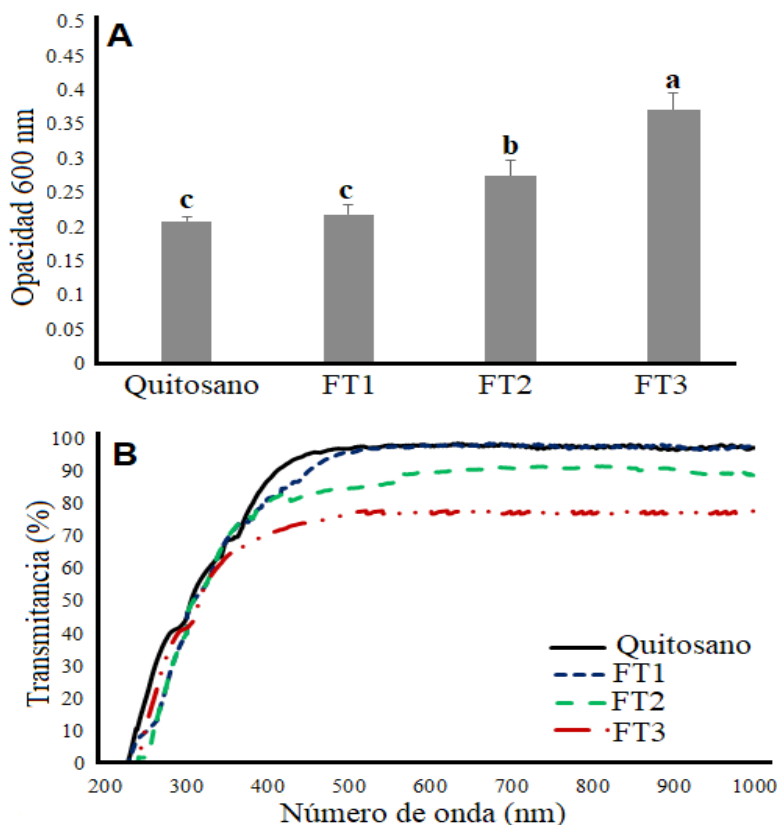


Figure 4. Transmittance (A) and opacity (B) of chitosan films (without essential oil) and films impregnated with thyme essential oil at concentration of 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) and 1.3 % w/v (FT3). Different letters indicate statistically significant differences ($p < 0.01$) according to ANOVA-Tukey ($n=5$).

Figura 4. Transmittancia (A) y opacidad (B) de las películas de quitosano puro (sin aceite esencial) y películas impregnadas con aceite esencial de tomillo en concentraciones de 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) y 1.3 % p/v (FT3). Las letras indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) de acuerdo a la prueba ANOVA-Tukey ($n=5$).

significant differences. However, statistically significant differences were observed ($p < 0.01$) between films FT2 and FT3 with those made with pure chitosan and FT1 from 400 to 1000 nm (Figure 5). On the contrary, opacity of films FT2 and FT3 showed a clear protective effect against UV light

fenómeno en otras películas impregnadas con aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*), citronela (*Pelargonium citrodorum*) y tomillo (*Thymus vulgaris*) (Haghighi *et al.*, 2019). De acuerdo con estudios previos, la superficie de una gran variedad de películas híbridas suele ser uniforme y no

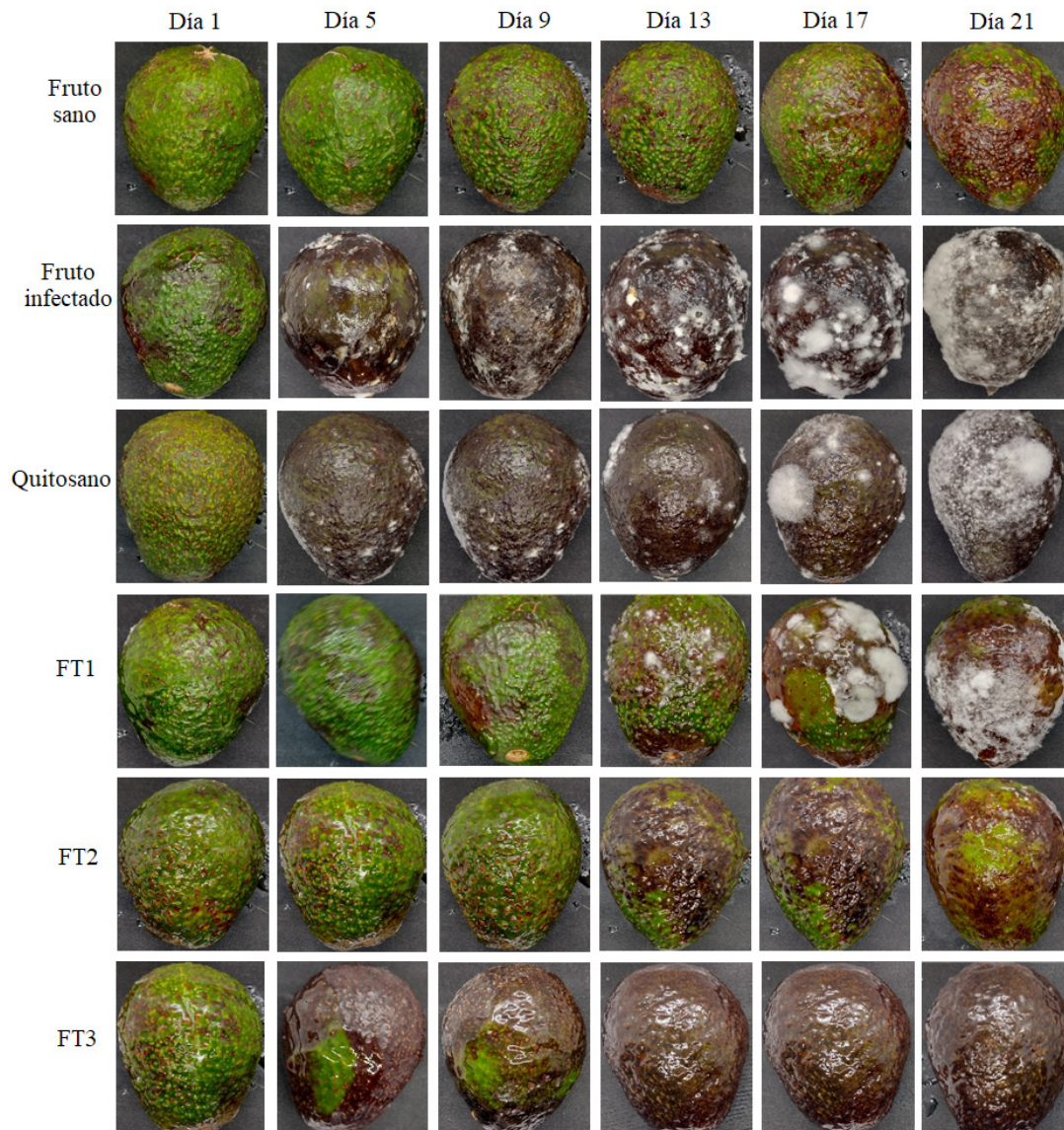


Figure 5. Qualitative kinetics for the colonization of *Fusarium solani* in avocado fruits treated with chitosan films and films impregnated with thyme essential oil at concentrations of 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) and 1.3% w/v (FT3) during 21 days.

Figura 5. Cinética cualitativa de la colonización de *Fusarium solani* en frutos de aguacate tratados con películas de quitosano y aceite esencial de tomillo en concentraciones de 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) y 1.3% p/v (FT3) durante 21 días.

with statistically significant differences ($p < 0.01$) in comparison with other films (Figure 4B). In the same context, films made with sole chitosan and FT1 did not show statistically significant differences among them. On the other hand, the thickness of films proportionally increased as the concentration of impregnated essential oil also increased, this trend was in accordance with previous studies performed by Coyotl-Pérez *et al.* (2022a). The thickness of films FT1, FT2 y FT3 was 0.103, 0.208, 0.223 y 0.251 mm respectively, which was reproducible with previous work describing the same type of films (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a). Lian *et al.* (2020) created films with diverse polymers (xanthan gum, pullulan, gum tragacanth and gum arabic) supplemented with thyme essential oil for the growth control of *E. coli* in nectarine. Such films also showed an increase in thickness after adding growing concentrations of essential oil. Nevertheless, some studies suggest that the thickness of films supplemented with essential oils is associated with changes in hydrogen bonds as well as with the ionization of amine and carboxylic groups (Lian *et al.*, 2020). As is known, opacity and transmittance act as barriers against UV radiation which induces fast food degradation. High levels of opacity and low transmittance play a vital role to preserve organoleptic properties and to retard lipid oxidation (Romanazzi *et al.*, 2017). The capacity to retract UV light is an important factor to conserve foods since such radiation causes a fast degradation because of associated oxidative stress (Romanazzi *et al.*, 2017).

***In situ* evaluation of chitosan films impregnated with thyme essential oil.** From the four films evaluated, those made by pure chitosan did not exert and inhibitory effect on the growth of *F. solani*. A similar result was observed the Hass avocado fruits infected with *Clonostachys rosea*

presenta burbujas, gotas, poros o grietas (Haghighi *et al.*, 2019). Contrastantemente, los materiales generados en esta investigación muestran pequeños poros al corte transversal, sobre todo en aquellas películas con mayor cantidad de aceite como FT2 y FT3 (Figura 3). Estos poros podrían atribuirse a la volatilidad del aceite esencial durante el secado (Lauriano *et al.*, 2017).

La transmitancia observada para las películas de quitosano que contuvieron 0.7% de aceite esencial de tomillo mostró un comportamiento similar a aquellas de quitosano puro (Figura 4A). La transmitancia UV (190-300 nm) y de luz visible (350-800) fue semejante en las películas de quitosano y FT1 sin diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$). Sin embargo, se observaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre las películas FT2 y FT3 con aquellas de quitosano y FT1 a partir de 400-1000 nm (Figura 5). Por el contrario, la opacidad de las películas FT2 y FT3 mostró un claro efecto protector contra la luz UV con diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) respecto al resto de las películas (Figura 4B). Así mismo, las películas de quitosano puro y FT1 no presentaron diferencias estadísticamente significativas entre ellas. Por otro lado, el grosor de las películas aumentó con base a la concentración de aceite impregnado concordando con Coyotl-Pérez *et al.* (2022a). El grosor de las películas de quitosano, FT1, FT2 y FT3 fue de 0.103, 0.208, 0.223 y 0.251 mm respectivamente siendo reproducible con lo reportado previamente para el mismo tipo de películas (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a). Lian *et al.* (2020) elaboraron películas con diferentes polímeros (goma xantana, pululano, goma tragacanto y goma arábica) suplementadas con aceite esencial de tomillo para controlar el crecimiento de *E. coli* en nectarina. Dichas películas también mostraron un aumento en grosor al adicionar concentraciones crecientes de aceite esencial. No obstante, algunos

and *Fusarium verticillioides* (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). On the other hand, the films FT2 and FT3 showed a clear delay on the growth of *F. solani* until 21 days after treatment (Figure 5). The addition of thyme essential oil to chitosan matrix enhanced the antimicrobial effect, this according to previous results observed in films generated with maize starch on *Escherichia coli* and *Listeria monocytogenes* (Ardjoum *et al.*, 2023). It has been demonstrated that pectin coatings impregnated with essential oils reduced the amount of microorganisms (lactic bacteria, yeasts and filamentous fungi) in foods of animal origin such as bologna (Gedikoğlu, 2022). In other context, essential oils rich in carvacrol and thymol has been used to improve shelf life of avocado fruit during post-harvest period. These essential oils were extracted from *Thymus daenensis* and *Satureja khuzistanica* and showed high effectiveness against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Sarkhosh *et al.*, 2017).

Avocado fruits treated with hybrid films did not show symptoms of infection whereas non-treated infected fruits were clearly affected since the first three days (Figure 6A). On the other hand, infected avocados simultaneously treated with films made with pure chitosan and FT1 showed symptom of infection from the 5th day (Figure 6A). These results suggested that chitosan itself cannot stop the growth of *F. solani*. Despite this, it has been documented that chitosan damages cell wall and changes cell membrane permeability of filamentous fungi (Romanazzi *et al.*, 2017). The evaluation of conidial germination on the surface of films FT1-FT3 demonstrated an evident viability loss, suggesting that coatings with higher amount of thyme essential oil are more effective to be preferentially used as preventive agents (Figure 6B). The results of this investigation suggested that thyme essential oil impregnated in chitosan films

estudios sugieren que el grosor de las películas suplementadas con aceites esenciales está asociado con los cambios de los enlaces de hidrógeno, así como con la ionización de los grupos amino o carboxilo (Lian *et al.*, 2020). Como es sabido, la opacidad y transmitancia cumplen la función de una barrera contra la radiación UV, misma que provoca una degradación rápida de los alimentos. Altos niveles de opacidad y baja transmitancia son clave para preservar las propiedades organolépticas y retardar la oxidación de lípidos (Romanazzi *et al.*, 2017). La capacidad de repeler la luz UV es un factor importante en la conservación de alimentos ya que dicha radiación causa una rápida degradación debido al estrés oxidativo que genera (Romanazzi *et al.*, 2017).

Evaluación *in situ* de películas de quitosano impregnados con aceite esencial de tomillo. De las cuatro películas evaluadas, las de quitosano puro no ejercieron un efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *F. solani*. Un resultado similar fue observado en fruto de aguacate Hass infectado con *Clonostachys rosea* y *Fusarium verticillioides* (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). Por otro lado, las películas FT2 y FT3 mostraron un claro retraso en el crecimiento de *F. solani* hasta 21 días post-tratamiento (Figura 5). La adición de aceite esencial de tomillo a la matriz de quitosano potencializa el efecto antimicrobiano, esto de acuerdo con resultados previos observados en películas elaboradas con almidón de maíz sobre *Escherichia coli* y *Listeria monocytogenes* (Ardjoum *et al.*, 2023). Se ha demostrado que recubrimientos de pectina impregnados con aceites esenciales reducen el recuento de microorganismos (bacterias lácticas, levaduras y mohos) en alimentos de origen animal como las mortadelas (Gedikoğlu, 2022). Por otro lado, se han evaluado diversos aceites esenciales ricos en carvacrol y timol para mejorar la vida útil poscosecha

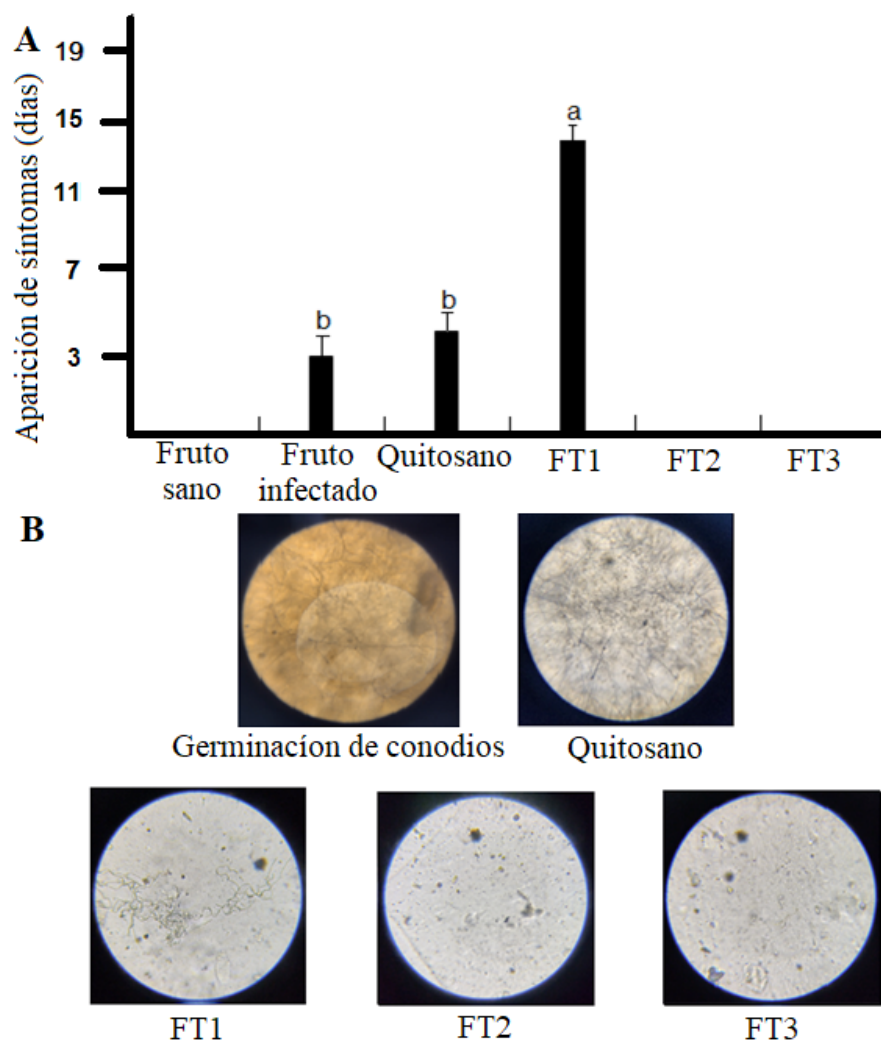


Figure 6. Kinetics for symptom appearance during *in situ* inoculation of *Fusarium solani* on avocado fruits (A). Evaluation of conidial viability of *F. solani* on the surface of films FT1-FT3 (B). Means (n=25) with different letter indicate statistically significant differences ($p < 0.01$) by ANOVA-Tukey.

Figura 6. Cinética de aparición de síntomas de infección tras la inoculación *in situ* de *Fusarium solani* en frutos de aguacate (A). Evaluación de la viabilidad de conidios de *F. solani* sobre la superficie de las películas FT1-FT3 (B). Medias (n=25) con letra distinta indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) por ANOVA-Tukey.

causes a substantial delay in the growth of *F. solani* at least for 21 days. However, residual protective effect may be extended to 30 days in accordance with documented observations (data not shown).

Firmness of avocado fruits. The firmness of non-treated avocado fruits was notably reduced

de aguacate. Estos aceites esenciales fueron extraídos de *Thymus daenensis* y *Satureja khuzistanica* y mostraron alta efectividad contra la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Sarkhosh *et al.*, 2017).

Los frutos de aguacate tratados con los recubrimientos no mostraron síntomas de infección

(69.5%) en 21 días. At the same time, healthy avocados showed loss of turgor 19.5 al 26.6% (Figure 7). The films FT1, FT2 and FT3 kept the firmness of avocado fruits ($p < 0.01$) until days 21 compared with both healthy and infected avocados. Thymol (as major volatile in thyme essential oil) is a phenolic monoterpene which causes physical damage changing permeability of cell membrane (Sarkhosh *et al.*, 2017). The results of statistical analysis revealed statistically significant differences ($p < 0.01$) between the firmness of healthy avocados and those covered with the films FT2 y FT3. Thus, avocados treated with films made with pure chitosan showed 13% loss related with healthy non-treated avocados. These evidences suggested that chitosan does not exert a prolonged fungistatic activity on *F.*

mientras que los frutos infectados no tratados fueron afectados desde los primeros tres días (Figura 6A). Por otro lado, los aguacates infectados, tratados con las películas de quitosano y FT1 presentaron crecimiento desde el día 5 (Figura 6A). Estos resultados sugieren que el quitosano por sí mismo no controla el crecimiento de *F. solani*. A pesar de esto, se tiene documentado que el quitosano daña la pared celular y altera la permeabilidad de la membrana celular de hongos filamentosos (Romanazzi *et al.*, 2017). La evaluación de la germinación de conidios sobre la superficie de las películas FT1-FT3 demostró una clara pérdida en su viabilidad, sugiriendo que las superficies que contuvieron mayor cantidad de aceite de tomillo son más efectivas y podrían ser usadas preferentemente como agentes

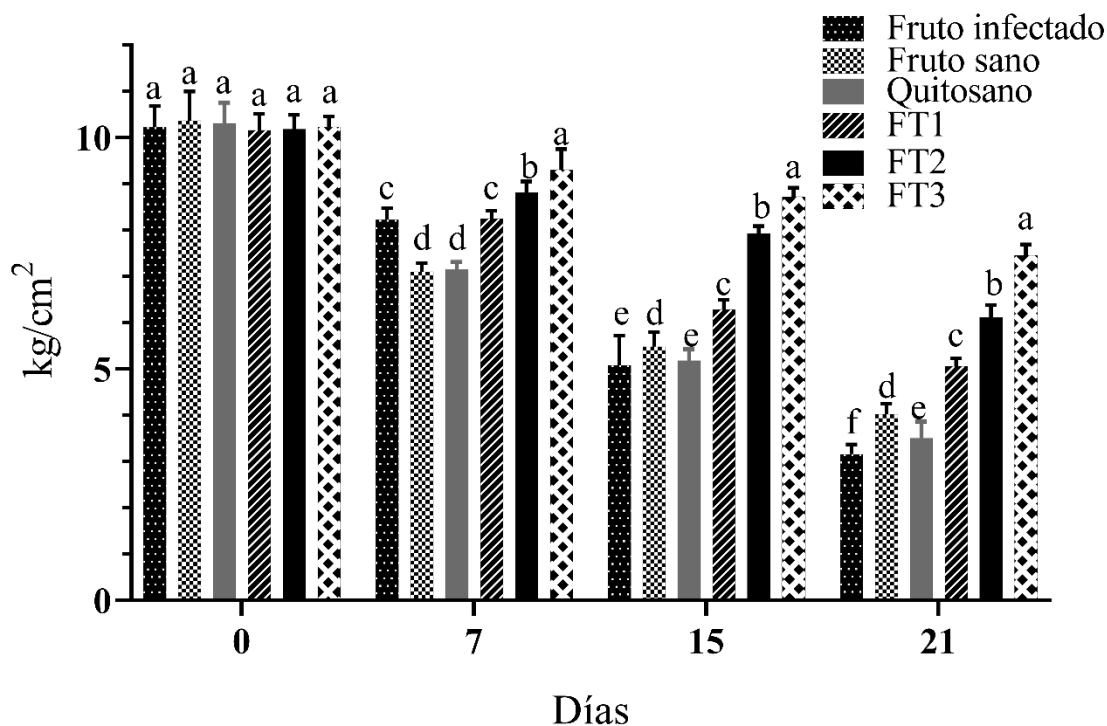


Figure 7. Firmness of avocado fruits treated with hybrid films FT1-FT3. Means with divergent letters indicate statistically significant differences ($p < 0.01$) by ANOVA-Tukey (n=25).

Figura 7. Firmeza de aguacates tratados con las películas híbridas FT1-FT3. Medias con letras divergentes, indican diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) por ANOVA-Tukey (n=25).

solani. It has been reported that the application of the essential oils from thyme and savory (*Satureja montana*) keep the firmness of avocado fruits better than those of mentha (*Mentha piperita*), cinnamon (*Cinnamomum verum*) or lavender (*Lavandula angustifolia*) during storage (Sarkhosh *et al.*, 2017). Previous studies performed by our research group, indicates that loss of firmness in avocado fruit harvested in the northeastern highlands of Puebla, is mainly affected by *Clonostachys rosea* (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). The loss of firmness can be attributed to the degradation of cell wall components (pectins) by the action of fungal pectinesterases and polygalacturonases (Huber *et al.*, 2001). Loss of turgor was translated into water deficit in plant tissues causing changes in vegetal texture (Bello *et al.*, 2016). Firmness is a very important parameter in the quality of perishable fruits and new techniques for their conservation represent an area of opportunity that must be addressed with special interest (Jha *et al.*, 2012; Pedreschi *et al.*, 2019).

Parameters of nutritional and nutraceutical quality. Avocados infected with *F. solani* showed a dramatic reduction in the content of fat (1.36 ± 0.4 g/100 g) at day 21 compared with healthy fruits (Figure 8). On the contrary, avocados treated with films FT2 y FT3 presented marked differences at day 21 ($p < 0.01$) compared with infected fruits. However, fruits treated with films made with pure chitosan and FT1 did not show statistically significant differences in relation to infected fruits but, they showed differences with healthy fruits. Regarding the content of total fat, infected avocados had 60% reduction at day 21 in comparison with healthy fruits. Similarly, protein levels showed 49% decrease in avocados infected by *F. solani* at day 21 in comparison with healthy avocados ($p < 0.01$). It was also observed that infected fruits and

preventivos (Figura 6B). Los resultados de esta investigación sugieren que el aceite esencial de tomillo impregnado en películas de quitosano, retrasa de manera sustancial el crecimiento de *Fusarium solani* al menos por 21 días. Sin embargo, el efecto residual podría incluir hasta 30 días de protección de acuerdo a observaciones documentadas (datos no mostrados).

Firmeza de frutos de aguacate. Los frutos infectados disminuyeron notablemente su firmeza (69.5%) en 21 días. En el mismo tiempo, los aguacates sanos mostraron una pérdida de turgencia del 19.5 al 26.6% (Figura 7). Las películas FT1, FT2 y FT3 conservaron significativamente la firmeza de los aguacates ($p < 0.01$) al día 21 en comparación con aguacates infectados y sanos. El timol (como volátil mayoritario del aceite esencial de tomillo) es un monoterpenoide fenólico que causa daño físico a los hongos cambiando la permeabilidad de la membrana celular (Sarkhosh *et al.*, 2017). Los resultados del análisis estadístico revelaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en la firmeza de aguacates sanos y aquellos cubiertos con las películas FT2 y FT3. Así mismo, los aguacates tratados con las películas de quitosano puro presentaron una pérdida mayor al 13% en relación con aguacates sanos no tratados. Estas evidencias reforzaron el hecho de que el quitosano no ejerce una actividad fungistática prolongada sobre *F. solani*. Se ha reportado que la aplicación de aceite esencial de tomillo y ajedrea (*Satureja montana*) mantiene la firmeza de frutos de aguacate en comparación con los aceites de menta (*Mentha piperita*), canela (*Cinnamomum verum*) o lavanda (*Lavandula angustifolia*) durante el almacenamiento (Sarkhosh *et al.*, 2017). Estudios previos efectuados por nuestro grupo de investigación, indican que la pérdida de firmeza en fruto de aguacate Hass cosechados en la sierra nororiental

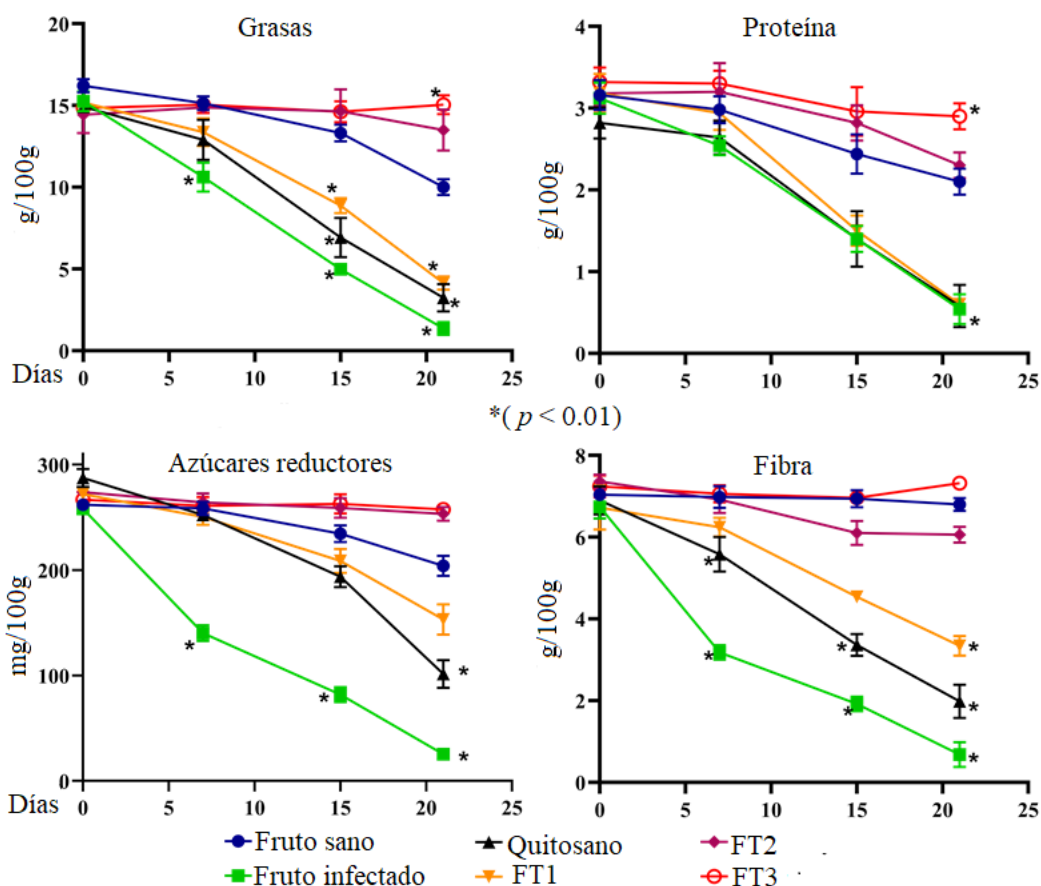


Figure 8. Fat content, protein, reducing sugars and fiber of Hass avocado fruits treated with hybrid films impregnated with thyme essential oil at concentrations of 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) y 1.3% w/v (FT3) during 21 days. Asterisks indicate means ($n=25$) with statistically significant differences by ANOVA-Tukey ($p < 0.01$).

Figura 8. Contenido de grasas, proteínas, azúcares reductores y fibra en frutos de aguacates Hass tratados con las películas híbridas impregnadas con aceite esencial de tomillo en concentraciones de 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) y 1.3% p/v (FT3) durante 21 días. Los asteriscos indican medias ($n=25$) con diferencias estadísticamente significativas sobre ANOVA-Tukey ($p < 0.01$).

those treated with films made of pure chitosan and FT1 did not show statistically significant differences ($p < 0.01$) among them at day 21. However, avocados treated with film FT3 showed statistically significant differences ($p < 0.01$) in comparison with healthy and infected avocados. On the other hand, avocados treated with films FT2 and FT3 preserved up to 37% protein content at day 21 compared to healthy fruits. Contrarily, reducing

del estado de Puebla, es mayormente afectada por *Clonostachys rosea* (Coyotl-Pérez *et al.*, 2022a; 2022b). La pérdida de firmeza puede atribuirse a la degradación de los componentes de la pared celular (pectinas) por la acción de pectinesterasas y poligalacturonasas fúngicas (Huber *et al.*, 2001). La pérdida de turgencia se traduce en un déficit de agua en los tejidos vegetales provocando cambios en la textura vegetal (Bello *et al.*, 2016). La firmeza

sugars decreased up to 90% in infected fruits at day 21 compared with healthy fruits. This fact may be related with the parasitic activity of the filamentous fungi which uses reducing sugars as a carbon source. In addition, infected avocados previously treated with films FT2-FT3 showed statistically significant differences at day 21 if compared with healthy avocados ($p < 0.01$). In the same context, fiber content was reduced until 90% in infected avocados at day 21 in comparison with healthy fruits. Treatments of pure chitosan and FT1 showed statistically significant differences ($p < 0.01$) at day 21 compared with healthy avocados since losses of 70 y 21%, were respectively recorded. Treatments FT2 and FT3 efficiently maintained fiber content but, no statistically significant differences ($p < 0.01$) were observed among these treatments and healthy avocados.

Avocado fruit contains nutrients that favor human diet because of the high amount of protein (4%), but especially it is pretty valued because of the high amount of beneficial fat (30%) (Selladurai y Madhav, 2020). Thus, fatty acid content plays a crucial role to ameliorate the risk of cardiovascular diseases (Krumreich *et al.*, 2018).

The decrease in reducing sugar content was inversely proportional to the accumulation of fatty acids. This evidence could be related to the overexpression of genes associated to glycolysis as a potential source of pyruvate for fatty acid biosynthesis through the excretion of citrate to the cytoplasm (Pedreschi *et al.*, 2019). Determination of linoleic acid in infected fruits revealed that *F. solani* was able to drastically decrease its accumulation at day 21 in comparison with healthy fruits (Figure 9). Such decrease was evident in infected avocados during normal ripening and suggested that *F. solani* is able to metabolize fatty acids as a substrate for its development (Pedreschi *et al.* 2019; Bowen *et al.*, 2018). Contrarily, avocados treated with films

es un parámetro muy importante en la calidad de frutos percederos y las técnicas que favorecen su conservación representan un área de oportunidad que debe ser abordada con especial interés (Jha *et al.*, 2012; Pedreschi *et al.*, 2019).

Parámetros de calidad nutricional y nutracéutica. Los aguacates infectados con *F. solani* mostraron una dramática reducción en la cantidad de grasa (1.36 ± 0.4 g/100 g) al día 21 en comparación con frutos sanos (Figura 8). Por lo contrario, los aguacates tratados con las películas FT2 y FT3 presentaron diferencias estadísticamente significativas al día 21 ($p < 0.01$) respecto al grupo de aguacates infectados. Sin embargo, aquellos frutos tratados con las películas de quitosano puro y FT1 no presentaron diferencias estadísticamente significativas en relación a los frutos infectados, pero si con los frutos sanos. Respecto al contenido de grasa total, los aguacates infectados tuvieron una reducción de más del 60% al día 21 en relación a frutos sanos. De igual forma, la cantidad de proteína disminuyó 49% en aguacates infectados por *F. solani* al día 21 en comparación con aguacates sanos ($p < 0.01$). También se observó que los aguacates infectados, así como aquellos tratados con películas de quitosano puro y FT1 no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) entre ellos al día 21. Sin embargo, los aguacates tratados con las películas FT3 mostraron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en comparación con los aguacates sanos e infectados. Por otro lado, los aguacates tratados con las películas FT2 y FT3 preservaron hasta un 37% más el contenido de proteínas al día 21 en comparación con frutos sanos. Contrariamente, los azúcares reductores disminuyeron hasta un 90% en frutos infectados al día 21 en comparación con frutos sanos. Este hecho podría estar relacionado con la actividad parasítica del hongo filamentoso al usar azúcares

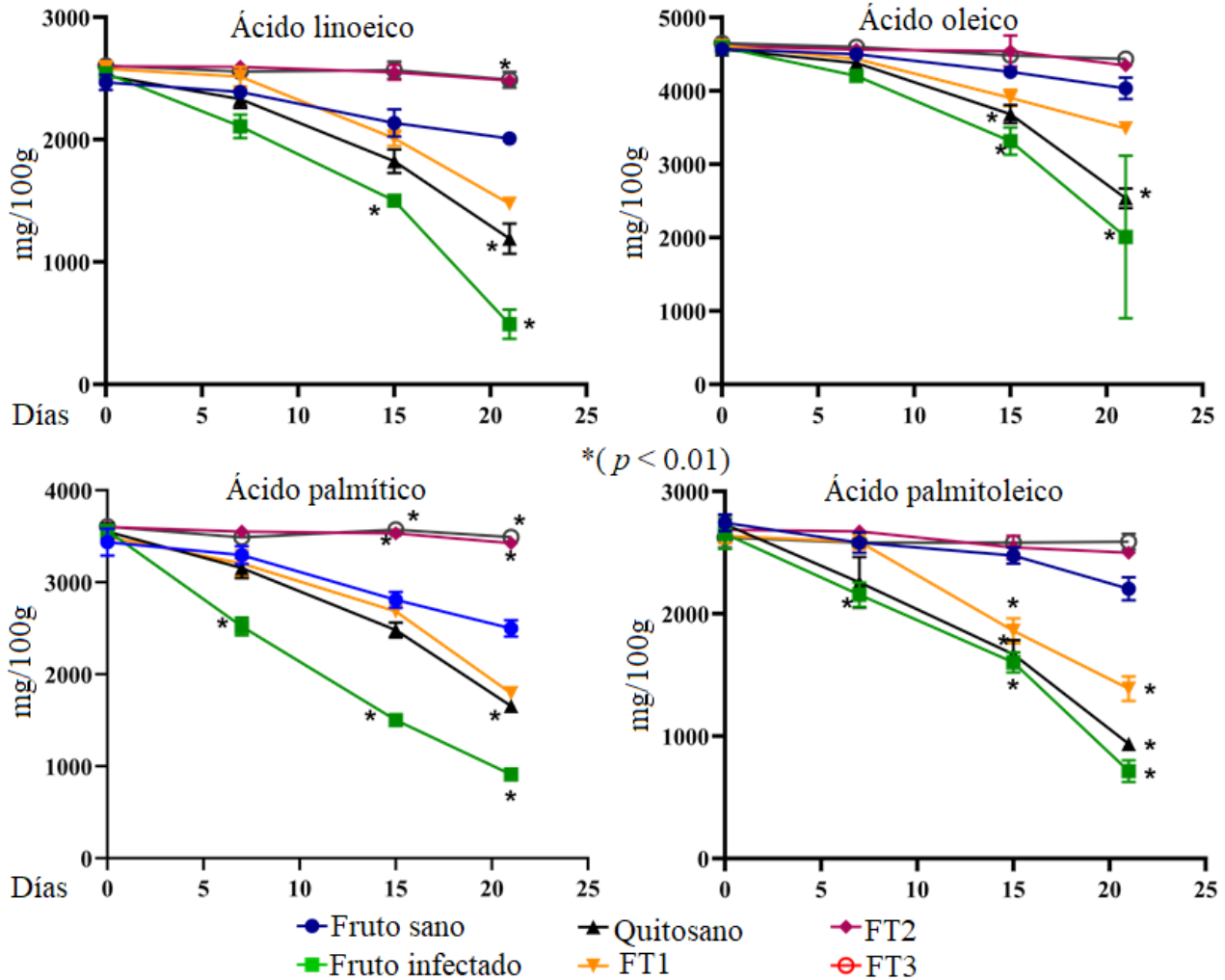


Figure 9. Contents of linoleic acid, oleic acid, palmitic acid and palmitoleic acid in Hass avocado fruits treated with hybrid films impregnated with thyme essential oil at concentrations of 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) and 1.3% w/v (FT3) during 21 days. Asterisks indicate means with statistically significant differences by ANOVA-Tukey ($p < 0.01$).

Figura 9. Contenido de ácido linoleico, oleico, palmítico y palmitoleico en frutos de aguacates Hass tratados con las películas híbridas impregnadas con aceite esencial de tomillo en concentraciones de 0.7 (FT1), 1.0 (FT2) y 1.3% p/v (FT3) durante 21 días. Los asteriscos indican medias ($n=25$) con diferencias estadísticamente significativas por ANOVA-Tukey ($p < 0.01$).

FT3 showed statistically significant differences at day 21 ($p < 0.01$) in comparison with healthy fruits. Infected fruits and those treated with films made of pure chitosan did not show statistically significant differences among them but, they show differences

reductores como fuente de carbono. En adición, al día 21 los aguacates infectados previamente tratados con las películas FT2-FT3 presentaron diferencias estadísticamente significativas en el contenido de azúcares en comparación con aguacates sanos

with healthy fruits at day 21. The content of oleic acid in infected fruits has a reduction of 70% at day 21 showing statistically significant differences ($p < 0.01$). Villa *et al.* (2011) reported oleic acid as the main fatty acid in Hass avocado with rates of 67-70% of total lipid composition. These authors observed a significant increase of monounsaturated and saturated fatty acids during normal avocado ripening. Contrarily, these authors concluded that polyunsaturated fatty acids decreased. Infected avocados treated with chitosan films showed statistically significant differences compared with healthy avocados at day 21. Nevertheless, avocados treated with films FT3 did not show statistically significant differences ($p < 0.01$) compared with healthy avocados at day 21.

Conversely, palmitic acid decreased 63.5% in infected fruits whereas avocados treated with chitosan films presented statistically significant differences in comparison with healthy avocados ($p < 0.01$). In the same context, avocados treated with films FT1 and FT2 showed statistically significant differences compared with healthy fruits because of their ability to preserve the content of this fatty acid in around 37.1 y 40%. Finally, the content of palmitoleic acid in infected fruits decreased until 67.6% in comparison with healthy fruits. Treatments of pure chitosan and FT1 showed statistically significant differences ($p < 0.01$) at day 21 in comparison with healthy for this fatty acid, whereas treatments FT2 and FT3 kept the content of palmitoleic acid without statistically significant differences with healthy avocados. Pedreschi *et al.* (2019) claim that the concentration of palmitic and palmitoleic acids in avocados usually increases between 65 day 105 days in intact plants. The results of this investigation suggest that during a period of 21 days, the levels of these fatty acids remain steady, however, longer time is required to corroborate the findings of Pedreschi *et al.* (2019).

($p < 0.01$). Así mismo, el contenido de fibra en aguacates infectados se redujo hasta un 90% al día 21 en comparación a frutos sanos. Los tratamientos con quitosano y FT1 presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) al día 21 respecto a los aguacates sanos ya que existió una pérdida del 70 y 21%, respectivamente. Los tratamientos FT2 y FT3 mantuvieron eficientemente el contenido de fibra, pero entre estos tratamientos no existieron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en comparación con aguacates sanos.

El fruto de aguacate contiene nutrientes que favorecen la dieta humana debido a la alta cantidad de proteínas (4%), pero sobre todo es altamente valuado por la cantidad de grasas benéficas (30%) (Selladurai y Madhav, 2020). Aunado a ello, el contenido de ácidos grasos juega un papel muy importante para disminuir el riesgo de enfermedades cardiovasculares (Krumreich *et al.*, 2018).

El decremento en el contenido de azúcares reductores fue inversamente proporcional al incremento en la producción de ácidos grasos. Esto podría estar relacionado a la sobreexpresión de genes asociados a la glucólisis como fuente potencial de piruvato para la síntesis de ácidos grasos por medio de la excreción de citrato hacia el citosol (Pedreschi *et al.*, 2019). La determinación de los niveles del ácido linoleico en frutos infectados reveló que *F. solani* disminuyó drásticamente su contenido al día 21 respecto a frutos sanos (Figura 9). Tal disminución fue evidente en aguacates infectados durante la maduración y sugiere que *F. solani* podría metabolizar ácidos grasos como sustrato para su desarrollo (Pedreschi *et al.* 2019; Bowen *et al.*, 2018). Por lo contrario, los aguacates que fueron tratados con las películas FT3 presentaron diferencias estadísticamente significativas al día 21 ($p < 0.01$) respecto a los aguacates sanos. Los frutos infectados y aquellos tratados con las películas de quitosano no presentaron diferencias

CONCLUSIONS

The films generated in this investigation showed fungistatic activity against a native strain of *Fusarium solani* isolated from Hass avocado fruits harvested in the northeastern highlands of Puebla. The addition of thyme essential oil in chitosan films improved physicochemical and biological properties in these films. Remarkably, the films made of pure chitosan did not stop the normal growth of the fungus under the experimental conditions reported in this work. It was observed that transmittance and opacity were substantially improved by the addition of thyme essential oil. The fungistatic films obtained in this investigation delayed the normal growth of the fungus and preserved nutrimental and nutraceutical contents of Hass avocado fruit up to 21 days. These results suggested the possible use of these films in avocado fruits to reduce the incidence of *F. solani* during postharvest period.

CITED LITERATURE

- AOAC. 2019. Official Methods of Analysis of AOAC International. 21st ed. AOAC International; Gaithersburg, MA, USA.
- Ardjoun N, Chibani N, Shankar S, Salmieri S, Djidjelli H and Lacroix M. 2023. Incorporation of *Thymus vulgaris* essential oil and ethanolic extract of propolis improved the antibacterial, barrier and mechanical properties of corn starch-based films. *International Journal of Biological Macromolecules* 224: 578-583. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2022.10.146>.
- Bello LJE, Balois MR, Sumaya MMT, Juárez LP, Jiménez REI, Sánchez HLM, López G GG and García PJD. 2016. Biopolímeros de mucilago, pectina de nopalitos y quitosano, como recubrimiento en almacenamiento y vida de anaquel de frutos de aguacate Hass. *Acta Agrícola y Pecuaria* 2(2): 43-50. <http://aap.uaem.mx/index.php/aap/article/view/24>
- Bowen J, Billing D, Connolly P, Smith W, Cooney J and Burdon J. 2018. Maturity, storage and ripening effects on anti-fungal compounds in the skin of 'Hass' avocado fruit. *Postharvest Biology and Technology* 146(1): 43-50. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2018.08.005>

estadísticamente significativas entre sí, pero si en contraste con frutos sanos al día 21. El contenido de ácido oleico en aguacates infectados tuvo una reducción del 70% al 21 siendo altamente significativa ($p < 0.01$). Villa *et al.* (2011) reportaron al ácido oleico como el principal ácido graso en el aguacate Hass ya que conforma entre el 67-70% del total de su composición lipídica. Los autores observaron un aumento significativo de ácidos grasos monoinsaturados y saturados durante la maduración del aguacate. Contrariamente, concluyeron que el contenido de ácidos grasos poli-insaturados disminuyó. Los aguacates infectados con películas de quitosano presentaron diferencias estadísticamente significativas al día 21 en referencia a los aguacates sanos. Sin embargo, los aguacates tratados con las películas FT3 no presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) en comparación con los aguacates sanos al día 21.

Por otra parte, el ácido palmítico disminuyó 63.5% en frutos infectados mientras que aquellos tratados con películas de quitosano presentaron diferencias estadísticamente significativas en contraste con los aguacates sanos ($p < 0.01$). De la misma forma, los aguacates tratados con las películas FT1 y FT2 presentaron diferencias estadísticamente significativas en referencia a los aguacates sanos ya que preservaron el contenido de este ácido graso entre un 37.1 y 40%. Finalmente, el contenido de ácido palmitoleico en aguacates infectados se redujo hasta un 67.6% respecto a aguacates sanos. Los tratamientos con quitosano y FT1 presentaron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.01$) al día 21 respecto a los aguacates sanos para este ácido graso, mientras que los tratamientos FT2 y FT3 mantuvieron el contenido de ácido palmitoleico sin mostrar diferencias estadísticamente significativas en referencia a los aguacates sanos. Pedreschi *et al.* (2019) sostienen que la concentración de los ácidos palmítico y palmitoleico en aguacates usualmente

- Coyotl-Pérez WA, Rubio-Rosas E, Morales-Rabanales QN, Ramírez-García SA, Pacheco-Hernández Y, Pérez-España VH, Romero-Arenas O and Villa-Ruano N. 2022a. Improving the shelf life of avocado fruit against *Clonostachys rosea* with chitosan hybrid films containing thyme essential oil. *Polymers* 14(10): 2050. <https://doi.org/10.3390/polym14102050>
- Coyotl-Pérez WA, Morales-Rabanales QN, Lozoya-Gloria E, Becerra-Martínez E, Ramírez-García SA, Mosso-González C and Villa-Ruano N. 2022b. Fungistatic films containing cinnamon essential oil: new coatings to preserve the nutraceutical content of avocado fruit against fusariosis. *Chemistry and Biodiversity* 19(8): e202200441. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202200441>
- Dugassa A, Alemu T and Woldehawariat Y. 2021. In-vitro compatibility assay of indigenous *Trichoderma* and *Pseudomonas* species and their antagonistic activities against black root rot disease (*Fusarium solani*) of faba bean (*Vicia faba* L.). *BMC Microbiology* 21(1): 115. <https://doi.org/10.1186/s12866-021-02181-7>
- Eke P, Adamou S, Fokom R, Dinango NV, Tsouh FPV, Wakam LN, Nwaga D and Fekam BF. 2020. Arbuscular mycorrhizal fungi alter antifungal potential of lemongrass essential oil against *Fusarium solani*, causing root rot in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Heliyon* 6(12): e05737. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2020.e05737>
- Fernández VD, Bautista BS, Fernández VD, Ocampo RA, García PA and Falcón RA. 2015. Películas y recubrimientos comestibles: una alternativa favorable en la conservación poscosecha de frutas y hortalizas. *Revista Ciencias Técnicas Agropecuarias* 24(3): 52-57. http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2071-00542015000300008
- Gedikoğlu A. 2022. The effect of *Thymus vulgaris* and *Thymbra spicata* essential oils and/or extracts in pectin edible coating on the preservation of sliced bolognas. *Meat Science* 184: 108697. <https://doi.org/10.1016/j.meatsci.2021.108697>
- Haghighi H, Biard S, Bigi F, De Leo R, Bedin E, Pfeifer F, Heinz WS, Licciardello F and Pulvirenti A. 2019. Comprehensive characterization of active chitosan-gelatin blend films enriched with different essential oils. *Food Hydrocolloids* 95:33-42. <https://doi.org/10.1016/j.foodhyd.2019.04.019>
- Hernández-Medina CA, Henao-Henao ED, Velasco-Belalcázar ML and Gómez-López ED. 2015. Caracterización morfológica y molecular de aislados de *Fusarium* asociadas aguacate (*Persea americana* Mill), en el Valle del Cauca. *Fitopatología Colombiana* 39(2): 51-56. https://www.researchgate.net/publication/309662918_CARACTERIZACION_MORFOLOGICA_Y_MOLECULAR_DE_AISLADOS_DE_Fusarium_ASOCIADAS_AGUACATE_Persea_american_Mill_EN_EL_VALLE_DEL_CAUCA

aumenta entre 65 a 105 días en plantas intactas. Los resultados de esta investigación sugieren que durante un periodo de 21 días los niveles de estos ácidos grasos son estables, sin embargo, se requiere una ventana mayor de tiempo para corroborar los hallazgos de Pedreschi *et al.* (2019).

CONCLUSIONES

Las películas generadas en esta investigación mostraron actividad fungistática contra una cepa nativa de *Fusarium solani* aislada de aguacate Hass proveniente de la Sierra Nororiental del estado de Puebla. La adición del aceite esencial de tomillo en combinación con quitosano resultó en una mejora de las propiedades biológicas y fisicoquímicas en dichas películas. Remarcablemente, las películas de quitosano puro no detuvieron el crecimiento del hongo bajo las condiciones experimentales de este trabajo. Se observó que la transmitancia y opacidad mejoraron sustancialmente con la adición del aceite esencial de tomillo. Las películas fungistáticas obtenidas en esta investigación retrasaron el crecimiento del hongo y preservaron las propiedades nutrimentales y nutracéuticas en fruto de aguacates Hass por 21 días. Estos resultados sugieren la posible utilización de estas películas en frutos de aguacate para reducir la incidencia de *F. solani* durante la poscosecha.

~~~~~ Fin de la versión en Español ~~~~~

- Huber DJ, Kaarkurt Y and Jeon J. 2001. Delay of avocado (*Persea americana*) fruit ripening by 1-methylcyclopropene and wax treatments. *Postharvest Biology and Technology* 28: 171-175. [https://doi.org/10.1016/S0925-5214\(02\)00176-X](https://doi.org/10.1016/S0925-5214(02)00176-X)
- Jha SN, Jaiswal P, Narsaiah K, Gupta M, Bhardwaj R and Singh AK. 2012. Non-destructive prediction of sweetness of intact mango using near infrared spectroscopy. *Scientia Horticulture* 138: 171-175. <https://doi.org/10.1007/s13197-010-0033-1>



- Kong W, Huo H, Gu Y, Cao Y, Wang J, Liang J and Niu S. 2022. Antifungal activity of camphor against four phytopathogens of *Fusarium*. South African Journal of Botany 148: 437-445. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2022.05.019>
- Krumreich FD, Borges CD, Mendonça CRB, Jansen-Alves C and Zambiasi RC. 2018. Bioactive compounds and quality parameters of avocado oil obtained by different processes. Food Chemistry 257(1): 376-381. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.03.048>
- Lauriano SVG, Fernando AL, Afonso PJR, Freitas RP, Lopes AA S and Braz FFM. 2017. Physical properties of chitosan films incorporated with natural antioxidants. Industrial Crops and Products 107: 565-572. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.056>
- Lian H, Shi J, Zhang X and Peng Y. 2020. Effect of the added polysaccharide on the release of thyme essential oil and structure properties of chitosan based film. Food Packaging and Shelf Life 23: 100467. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2020.100467>
- Liu Y, Liu S, Luo X, Wu X, Ren J, Huang X, Feng S, Lin X, Ren M and Dong P. 2022. Antifungal activity and mechanism of thymol against *Fusarium oxysporum*, a pathogen of potato dry rot, and its potential application. Postharvest Biology and Technology 192: 112025. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2022.112025>
- Mejía-Bautista M A, Cristóbal-Alejo J, Tun-Suárez J M and Reyes-Ramírez A. 2016. *In vitro* activity of *Bacillus* spp. on mycelial growth inhibition of *Fusarium equiseti* and *Fusarium solani* isolated from habanero peppers (*Capsicum chinense* Jacq.). Agrociencia 50(3): 1123-1135. [https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952016000801123&script=sci\\_arttext&tlng=en](https://www.scielo.org.mx/scielo.php?pid=S1405-31952016000801123&script=sci_arttext&tlng=en)
- Morales-Rabanales Q N, Cóyotl-Pérez W A, Rubio-Rosas E, Cortes-Ramírez G S, Sánchez-Ramírez J F, Villa-Ruano N. 2022. Antifungal properties of hybrid films containing the essential oil of *Schinus molle*: protective effect against postharvest rot of tomato. Food Control 134: 108766. <https://doi.org/10.1016/j.foodcont.2021.108766>
- Pandey A K, Kumar P, Singh P, Tripathi N N and Bajpai V K. 2017. Essential oils: sources of antimicrobials and food preservatives. Frontiers in Microbiology 7: 1-14. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.02161>
- Pandey A K, Deka B, Varshney R, Chepkirui C E and Babu A. 2021. Do the beneficial fungi manage phytosanitary problems in the tea agro-ecosystem? BioControl 66: 445-462. <https://doi.org/10.1007/s10526-021-10084-9>
- Pacheco-Hernández Y, Sánchez-Hernández GR, Reyes-Cervantes E, Romero-Hernández O, Pérez-Xochipa I and Villa-Ruano N. 2020. Chemical variation and pharmacological properties of *Dyssodia decipiens* essential oil. Chemistry and Biodiversity 17(10): e2000487. <https://doi.org/10.1002/cbdv.202000487>
- Pedreschi R, Uarrota V, Fuentealba C, Alvaro JE, Olmedo P, Defilippi BG and Campos V R. 2019. Primary metabolism in avocado fruit. Frontiers in Plant Science 10. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00795>
- Ramírez-Gil JG, Henao-Rojas JC and Morales-Osorio JC. 2021. Postharvest diseases and disorders in avocado cv. Hass and their relationship to preharvest management practices. Heliyon 7(1): e05905. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e05905>
- Ramos-Aguilar AL, Ornelas-Paz J, Tapia-Vargas LM, Gardea-Béjar AA, Elhadi MY, Ornelas-Paz JJ, Ruiz-Cruz S, Rios-Velasco C and Ibarra-Junquera V. 2021. Comparative study on the phytochemical and nutrient composition of ripe fruit of Hass and Hass type avocado cultivars. Journal of Food Composition and Analysis 97: 103796. <https://doi.org/10.1016/j.jfca.2020.103796>
- Rivedal HM, Stone AG, Severns PM and Johnson KB. 2020. Characterization of the fungal community associated with root, crown, and vascular symptoms in an undiagnosed yield decline of winter squash. Phytobiomes Journal 4: 178-192. <https://doi.org/10.1094/PBIOMES-11-18-0056-R>
- Rodríguez-Castro A, Torres-Herrera S, Domínguez-Calleros A, Romero-García A and 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: 1-13. <http://dx.doi.org/10.37114/abaagrof/2020.7>
- Romanazzi G, Feliziani E, Baños SB and Sivakumar D. 2017. Shelf life extension of fresh fruit and vegetables by chitosan treatment. Critical Reviews in Food Science and Nutrition 57(3): 579-601. <https://doi.org/10.1080/10408398.2014.900474>
- Romero-Arenas O, Pérez-Vázquez MAK, Rivera TJA, Pacheco-Hernández Y, Ramírez-García SA, Landeta-Cortés G and Villa-Ruano N. 2022. Volatiles of *Zanthoxylum limoncello* as antifungal agents against the postharvest rot of manzano pepper triggered by *Fusarium temperatum*. Horticulturae 8(8): 700. <https://doi.org/10.3390/horticulturae8080700>
- Sarkhosh A, Vargas AI, Schaffer B, Palmateer AJ, Lopez P, Soleymani A and Farzaneh M. 2017. Postharvest management of anthracnose in avocado (*Persea americana* Mill.) fruit with plant-extracted oils. Food Packaging and Shelf Life 12: 16-22. <https://doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.02.001>
- Scheel CM, Hurst S F, Barreiros G, Akiti T, Nucci M and Balajee S. A. 2013. Molecular analyses of *Fusarium* isolates recovered from a cluster of invasive mold infections in a Brazilian hospital. BMC Infectious Diseases 13(49): 12. <https://doi.org/10.1186/1471-2334-13-49>
- Selladurai R and Madhav AC. 2020. Nutrient management for avocado (*Persea americana* Miller), Journal of Plant Nutrition 43(1): 138-147. <https://doi.org/10.1080/01904167.2019.1659322>
- Villa RJA, Molina CFJ, Ayala ZJF, Olivas GI and González AGA. 2011. Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of 'Hass' avocado.



- Food Research International 44: 1231-1237. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.012>
- Wanjiku EK, Waceke JW, Wanjala BW and Mbaka JN. 2020. Identification and pathogenicity of fungal pathogens associated with stem end rots of avocado fruits in Kenya. International Journal of Microbiology 4063697: 8. <https://doi.org/10.1155/2020/4063697>
- Yan D, Li Y, Liu Y, Li N, Zhang X and Yan C. 2021. Antimicrobial properties of chitosan and chitosan derivatives in the treatment of enteric infections. Molecules 26(23): 7136. <https://doi.org/10.3390/molecules26237136>
- Zaker M. 2014. Antifungal evaluation of some plant extracts in controlling *Fusarium solani*, the causal agent of potato dry rot *in vitro* and *in vivo*. International Journal of Agriculture and Biosciences 3(4): 190-195. <https://www.cabdirect.org/cabdirect/abstract/20143326583>