



Actividad antifúngica contra *Fusarium culmorum* de los extractos de hojas de *Stevia rebaudiana* y sus combinaciones con extractos de semillas de *Silybum marianum* y *Lycium barbarum*

Petruta Mihaela Matei¹, Eduardo Pérez-Lebeña², Laura Buzón-Durán², Jesús Martín-Gil², Beatrice Michaela Iacomì¹, M. Carmen Ramos-Sánchez³, Pablo Martín-Ramos^{4,*}

- ¹ Department of Bioengineering of Horticultural and Viticultural Systems, University of Agricultural Sciences and Veterinary Medicine of Bucharest, Bulevardul Mărăști 59, București 011464, Rumania; petruta.matei@horticultura-bucuresti.ro (P.M.M.); b.iacomì@yahoo.fr (B.M.I.)
- ² Departamento de Ingeniería Agroforestal, ETSIIAA, Universidad de Valladolid, Avenida de Madrid 44, 34004 Palencia, España; eplebena@gmail.com (E.P.-L.); laura.buzon.duran@gmail.com (L.B.-D.); mgil@iaf.uva.es (J.M.-G.)
- ³ Servicio de Microbiología y Parasitología, Hospital Universitario Río Hortega, SACYL, Calle Dulzaina, 2, 47012 Valladolid, España; mramoss@saludcastillayleon.es
- ⁴ Instituto Universitario de Investigación en Ciencias Ambientales de Aragón (IUCA), EPS, Universidad de Zaragoza, Carretera de Cuarte, s/n, 22071 Huesca, España; pmr@unizar.es

Resumen: *Fusarium culmorum* es un hongo que produce la fusariosis (*scab* o FHB), una enfermedad que plantea un importante reto en la producción de cereales y conlleva notables implicaciones de seguridad alimentaria por la contaminación con micotoxinas (tricotecenos). Ocasionalmente, se desarrolla en almacén cuando las condiciones le son favorables (a bajas temperaturas y alta humedad) o si el grano ha sido secado insuficientemente y de forma rápida. En este estudio se ha evaluado *in vitro* el efecto antifúngico de los extractos de hojas de estevia, solos o en combinación con polifenoles (procedentes de semillas de cardo asnal, de semillas de goji o ácido gálico puro), contra este fitopatógeno. Se han ensayado distintas concentraciones, desde 31.25 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ a 1 $\text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ y se han obtenido, para el tratamiento basado sólo en las hojas de estevia, concentraciones inhibitorias CE_{50} y CE_{90} de 112 y 283 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente; y para los tratamientos basados en hojas de estevia y polifenoles, valores de CE_{50} y CE_{90} de 160 y 500 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, respectivamente. Estos resultados llevan a concluir que, aunque el comportamiento para las mezclas es no-sinérgico para este patógeno (la respuesta a la presencia de polifenoles es impredecible), la actividad antifúngica de las hojas de estevia (referida, principalmente a estevósido como principio activo) es incuestionable. En consecuencia, se propone la aplicación de extractos de hojas de estevia para la protección contra la fusariosis de cosechas y del grano en almacenes.

Palabras clave: antifúngico, cardo asnal, estevia, fusariosis, goji.

1. Introducción

Los hongos patógenos presentes en el ambiente suponen una amenaza para las cosechas: a escala mundial, las enfermedades producidas por hongos fitopatógenos contribuyen de forma notable a las pérdidas totales en términos de rendimiento de cultivo. En el abordaje de este reto, el uso de pesticidas tradicionales conlleva desventajas relacionadas con la gestión de peligros,

costes, residuos y amenazas para la salud humana y el medio ambiente. En consecuencia, existe un creciente interés en la valorización de los productos naturales como agentes antimicrobianos, ya que pueden representar una alternativa más respetuosa con el medio ambiente.

Stevia rebaudiana (Bert.) Bertoni (comúnmente conocida como estevia) es una planta herbácea perenne de la familia Asteraceae. Se ha sugerido que sus extractos pueden ejercer efectos beneficiosos sobre la salud humana [1] y varios estudios han investigado su actividad antimicrobiana [2,3]. No obstante, la búsqueda bibliográfica ha revelado que su actividad antifúngica / fungistática ha sido poco estudiada [4-6]. En cuanto a los hongos fitopatógenos, Shukla, *et al.* [7] presentaron resultados prometedores, encontrando que los extractos alcohólicos y acuosos de las hojas de *Stevia rebaudiana* mostraban porcentajes de inhibición del crecimiento radial de 65,3% y 73,6%, respectivamente, contra *Fusarium oxysporum*.

Contra otras especies de *Fusarium* también han sido referidas actividades inhibitorias fuertes y específicas producidas por compuestos fenólicos y polifenólicos de origen natural [8], y en el caso de *F. culmorum*, se han logrado actividades antifúngicas *in vitro* mejoradas por utilización de complejos de inclusión de polifenoles y nanopartículas de plata (AgNPs) [9].

El objetivo del presente estudio ha sido explorar el presumible efecto sinérgico contra *F. culmorum* que podría resultar de la combinación de las hojas de *Stevia rebaudiana* con extractos de cardo mariano (*Silybum marianum* (L.) Gaertn) y goji (semillas de *Lycium barbarum* (L.), caracterizados por contenidos fenólicos totales de 29 mg de GAE/gDW [10] y 9 mgGAE/gDW [11], respectivamente.

El interés de la investigación radica en la posibilidad de combatir la fusariosis (*Fusarium head blight*, FHB), que plantea problemas en agricultura y para la industria alimentaria: no solo conduce a pérdidas de rendimiento hasta el 50%, sino también contaminación por tricotecenos.

2. Material y métodos

2.1. Reactivos

Las hojas de *Stevia rebaudiana* (nº de producto S5381), el ácido gálico (CAS 149-91-7) y el etanol (CAS 64-17-5) fueron suministrados por Sigma-Aldrich/Merck KGaA (Darmstadt, Alemania). Las semillas de *Silybum marianum* y *Lycium barbarum*, procedentes de cultivos orgánicos, se adquirieron de Starwest Botanicals (Sacramento, CA, EE.UU.).

2.2. Preparación de las soluciones bioactivas

Se ensayaron un tratamiento basado solo en hojas de *Stevia rebaudiana* y tres tratamientos diferentes en combinación con polifenoles. Para el primero, se utilizó una solución hidroalcohólica (1:1, v/v) de hojas de *Stevia rebaudiana* (1257 mg en 50 mL de agua destilada y 50 mL de etanol). El contenido de esteviósido en las hojas de estevia fue cercano al 10%, por lo tanto, 1260 mg de hojas de estevia contendrían aproximadamente 126 mg de esteviósido.

Los otros tres tratamientos se basaron en las soluciones hidroalcohólicas que resultaron de mezclar una solución acuosa de hojas de *Stevia rebaudiana* (1257 mg en 50 mL de agua destilada) con una solución etanólica de 50 mL de: (i) ácido gálico (26 mg); (ii) semillas de *S. marianum* (252 mg); o (iii) semillas de goji (252 mg). El contenido de polifenoles en esas soluciones iniciales fue de 0,26 mg GAE·mL⁻¹, 0,073 mg GAE·mL⁻¹ y 0,023 mg GAE·mL⁻¹, respectivamente.

Las soluciones se sonicaron con un ultrasonificador UIP1000hdT de tipo sonda (Hielscher, Teltow, Alemania; 1000 W, 20 kHz) durante 20 min, manteniendo la temperatura por debajo de 60 °C.

2.3. Aislado fúngico y condiciones de crecimiento

Las pruebas *in vitro* se realizaron utilizando *Fusarium culmorum* CS7071, aislado de semillas de trigo infectadas, y siguiendo el procedimiento descrito anteriormente en [9]. La identificación se realizó sobre la base de la morfología de los conidios y los conidióforos y de las propiedades del cultivo. Se realizó una identificación molecular utilizando cebadores específicos de *Fusarium* dirigidos al factor de elongación 1 (EF1) [12,13]: se verificó una secuencia de FASTA en el NCBI Blast, confirmando la correspondencia con el gen del factor de elongación 1 (EF1a), cds parcial, identificador de secuencia MG857546.1 del cultivo de *F. culmorum* ICMP:15476.

La purificación del aislado se llevó a cabo mediante aislamiento de monoesporas. El aislado se mantuvo en muestras de agar de malta, a 4 °C, y se prepararon subcultivos frescos para las pruebas de sensibilidad, transfiriendo tapones de hifas a placas de Petri que contenían agar con dextrosa de patata (PDA; suministrado por Scharlau, Barcelona, España).

2.4. Ensayos *in vitro* de inhibición del crecimiento micelial

La actividad biológica de los tratamientos se determinó mediante el método de dilución en agar, incorporando alícuotas de soluciones madre a un medio de PDA para alcanzar concentraciones finales de 31,25, 62,5, 125, 250, 500 y 1000 µg·mL⁻¹. Los discos miceliales de patógeno (de 8 mm de diámetro), tomados de los bordes de un cultivo de 7 días, se transfirieron a placas llenas con los medios referidos anteriormente (tres por tratamiento y concentración), utilizando como control placas que contenían solo PDA.

El crecimiento radial del micelio se determinó mediante el cálculo del promedio de dos diámetros de colonias perpendiculares para cada réplica. La inhibición del crecimiento micelial para cada tratamiento y concentración después de 7 días de incubación, a 22 °C en la oscuridad, se calculó de acuerdo con la fórmula: $((d_c - d_t)/d_c) \times 100$, donde d_c es el diámetro promedio de la colonia fúngica en el control y d_t es el diámetro promedio de la colonia de hongos tratada con el compuesto objeto de ensayo.

Los resultados también se expresaron como concentraciones efectivas CE₅₀ y CE₉₀, estimadas mediante la regresión de los valores de inhibición del crecimiento radial (%) frente a los valores en logaritmo en base 10 de las concentraciones de tratamiento.

2.5. Análisis estadísticos

Los datos se sometieron a análisis de varianza (ANOVA) en el software IBM SPSS Statistics v.25. Para la comparación *post hoc* de las medias se utilizó el test HSD de Tukey con un nivel de probabilidad de 0,05 (p < 0,05).

3. Resultados

La inhibición del crecimiento radial *in vitro* lograda por cada uno de los tratamientos después de 7 días se muestra en la Figura 1 (solo para una repetición por cada tratamiento), y los valores medios de las tres repeticiones se resumen en la Figura 2.

El aumento en la concentración de los complejos de inclusión de 31,25 µg·mL⁻¹ a 1000 µg·mL⁻¹ conllevó una reducción en el crecimiento radial del micelio en todos los casos, con diferencias estadísticamente significativas entre las diversas concentraciones (Figura 2).

La inhibición completa se logró con las dos dosis más altas (500 y 1000 µg·mL⁻¹) para todos los tratamientos. Aunque no fuesen estadísticamente significativas, se pudieron observar diferencias para las dosis de 250 µg·mL⁻¹: mientras que el tratamiento basado solo en las hojas de estevia alcanzó una inhibición del 100%, los tratamientos basados en las hojas de estevia+ácido gálico, hojas de estevia +semillas de cardo mariano y de hojas de estevia+semillas de goji condujeron a porcentajes de inhibición del 90,4%, 90,1% y 87,2%, respectivamente.

A una dosis de $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ se detectaron diferencias estadísticamente significativas (Tabla 1) entre tratamientos, con porcentajes de inhibición del 73,4%, 22,9%, 35,1% y 41% para los tratamientos basados en hojas de estevia solas, hojas de estevia+ácido gálico, hojas de estevia+semillas de cardo mariano y hojas de estevia+semillas de goji, respectivamente.

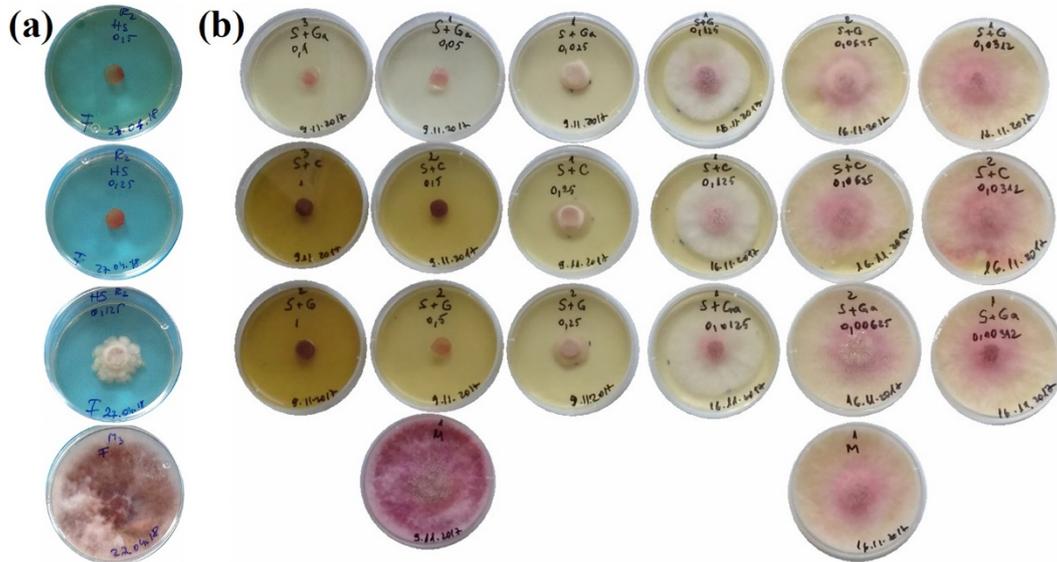


Figura 1. (a) Ensayos de inhibición de crecimiento frente a *F. culmorum* para hojas de *S. rebaudiana* a tres concentraciones representativas. De arriba a abajo: $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y el control (el color azul se debe al paper azul situado bajo las placas de Petri). (b) Ensayos de inhibición del crecimiento para los tres tratamientos con polifenoles a diferentes concentraciones. De arriba a abajo: hojas de *S. rebaudiana* con ácido gálico, hojas de *S. rebaudiana* con extracto de semillas de *S. marianum*, hojas de *S. rebaudiana* con extracto de semillas de *L. barbarum*, y control (no tratado). De izquierda a derecha: concentraciones a $1000 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $500 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $250 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $125 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$, $62,5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ y $31,25 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$.

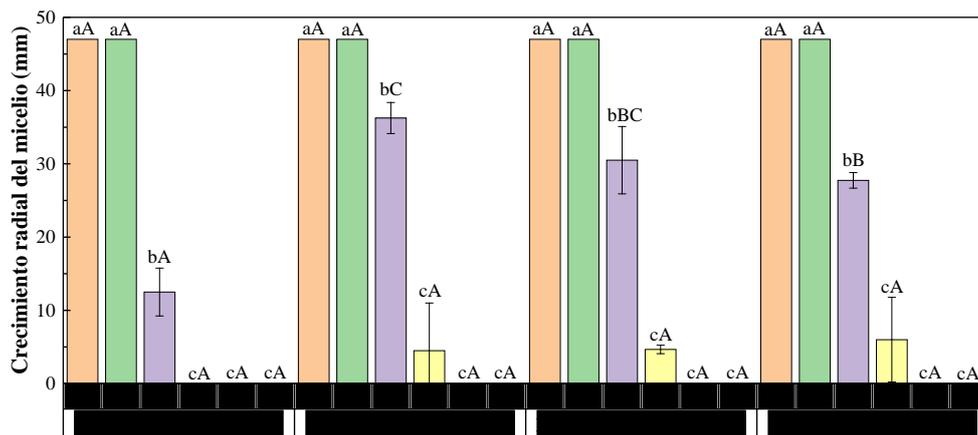


Figura 2. Valores de crecimiento radial del micelio de *F. culmorum* en presencia de hojas de *S. rebaudiana* (HS) y de HS con diferentes fuentes de polifenoles a distintas concentraciones (en $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$). Para el control (no mostrado) se obtuvo un crecimiento radial de 47 mm en todos los casos. Las concentraciones etiquetadas con las mismas letras minúsculas no son significativamente diferentes para $p < 0,05$ según el test de Tukey. Los tratamientos etiquetados con las mismas letras mayúsculas no son significativamente diferentes para $p < 0,05$ a la dosis indicada. Todos los valores presentados son medias de tres repeticiones. Las barras de error indican desviaciones estándar.

Tabla 1. Análisis de las diferencias en valores de crecimiento radial para los distintos tratamientos a una concentración de 125 µg·mL⁻¹, con un intervalo de confianza del 95%, según el test de Tukey.

Comparaciones	Diferencia	Diferencia estandarizada	Pr > Dif	Significativo
HS vs HS+ácido gálico	-23,750	-9,516	< 0,0001	Sí
HS vs HS+semillas <i>S. marianum</i>	-18,000	-7,212	0,000	Sí
HS vs HS+semillas <i>L. barbarum</i>	-15,250	-6,110	0,001	Sí
HS+semillas <i>L. barbarum</i> vs HS+ácido gálico	-8,500	-3,406	0,038	Sí
HS+semillas <i>L. barbarum</i> vs HS+semillas <i>S. marianum</i>	-2,750	-1,102	0,698	No
HS+ semillas <i>S. marianum</i> vs HS+ácido gálico	-5,750	-2,304	0,176	No

Valor crítico para la prueba de Tukey: 4,529

Los resultados de las pruebas de sensibilidad también pueden expresarse en términos de concentraciones efectivas CE₅₀ y CE₉₀, es decir, en forma de aquellas concentraciones que reducen el crecimiento del micelio en un 50% y 90%, respectivamente (Tabla 2). La sensibilidad del aislado fue muy similar para los tres tratamientos con polifenoles, que mostraron una inhibición notablemente menor que el tratamiento con solo hojas de estevia. De acuerdo con el método de Wadley [14] para la cuantificación del nivel de interacción, se obtuvo un factor de sinergia FS=0,6 (<1,0) en los tres casos, lo que sugiere una interacción antagonica entre los fungicidas.

Tabla 2. Concentraciones efectivas que inhibieron el crecimiento micelial en un 50% y un 90% (CE₅₀ y CE₉₀, respectivamente).

Concentración (µg·mL ⁻¹)	HS	HS+ácido gálico	HS+semillas de cardo mariano	HS+semillas de goji
CE ₅₀	112,1	166,1	156,9	154,5
CE ₉₀	282,7	508,6	488,3	486,4

HS: hojas de estevia

4. Discusión

Como se ha señalado anteriormente, los resultados de actividad observados para las tres mezclas con polifenoles fueron muy similares, a pesar de sus diferentes contenidos de ácido gálico (o equivalentes de ácido gálico). Este hallazgo sugiere que la acción antifúngica de esas mezclas debe referirse a los principios activos de las hojas de estevia (en lugar de a los fenoles de los extractos de cardo de leche o de semillas de goji). Además, los tratamientos con solo hojas de estevia mostraron la mayor inhibición de entre los cuatro tratamientos objeto de estudio en todas las dosis probadas.

Este hallazgo apoya la actividad antifúngica de las hojas de estevia defendida por Shukla, *et al.* [7], y que debe atribuirse principalmente al esteviósido y, en menor medida, al rebaudosido y al ácido docosahexaenoico [15].

Aunque Salehi, *et al.* [16] informaron de que los extractos fenólicos de *S. marianum* tenían actividad antifúngica en hongos dermatofíticos y saprófitos, y Skenderidis, *et al.* [17] encontraron actividad contra *F. oxysporum* para el goji, en el estudio presentado aquí su actividad contra este aislado fúngico no ha resultado relevante.

Esta baja actividad puede referirse tentativamente a sus bajas concentraciones relativas en ácido gálico (o equivalentes de ácido gálico), ya que Song, *et al.* [18], en ensayos con vinos de goji, utilizaron concentraciones entre 5 y 50 veces mayores. Con respecto a la eficacia del ácido gálico

contra *Fusarium* spp., Nguyen, *et al.* [19] ensayaron la actividad antifúngica del ácido gálico obtenido de *Terminalia nigrovenulosa* contra *F. solani*, observando una supresión de la enfermedad del 81% para 1000 µg·mL⁻¹. Pani, *et al.* [8] no informaron los valores de CE₅₀ para los diferentes polifenoles ensayados contra *F. culmorum* (en cambio cuantificaron el crecimiento fúngico en términos de biomasa fúngica seca), pero encontraron que el crecimiento fúngico solo se inhibió ligeramente cuando se añadió al cultivo líquido ácido gálico 1,5 mM (255 mg·mL⁻¹). La inhibición alcanzada en [9] para dosis de ácido gálico del mismo orden de magnitud a las reportadas en este documento sería atribuible a la formación de compuestos de inclusión y a su combinación con oligómeros de quitosano y nanopartículas de plata.

4.1. Mecanismo de acción

La actividad antifúngica del esteviósido (el principal constituyente del extracto de *Stevia rebaudiana*) ha sido referida a los derivados beta-OH del isosteviol (7β-, 11β-, 12β- y 17β-hidroxi-isosteviol) [20] que resultan de la interacción esteviósido-hongos. En un primer paso, la hidrólisis del esteviósido mediada por hongos conduce al aglicón esteviol o a su derivado reordenado isosteviol (ácido *ent*-16-cetobeyerano-19-oico). Posteriormente, los hongos metabolizan el isosteviol a derivados de beta-OH a través de una introducción estereoselectiva de grupos OH en las posiciones C-7, C-11, C-12 y C-17, así como C-1, C-6, C-15, y con una mayor cetonzación en las posiciones C-1 y C-7 [21]. La evidencia sugiere que el mecanismo de acción de estas moléculas estaría relacionado con el desacoplamiento de la fosforilación oxidativa mitocondrial o con la permeabilización de la membrana celular, como ocurre con el ácido 7β-hidroxi-kaurenoico [22] (kaurenos y beyeranos están muy relacionados).

En el caso de *Fusarium verticillioides* (la única especie del género *Fusarium* estudiada), la biotransformación de isosteviol conduce a los ácidos *ent*-7,6-hidroxi-16-cetobeyerano-19-oico y *ent*-12-hidroxi-16-cetobeyerano-19-oico como principales metabolitos (Figura 3) [23,24]. La hidroxilación selectiva del núcleo cetobeyerano de estos metabolitos es similar a la que ha llevado a la actividad potenciada de los metabolitos identificados por Lin, *et al.* [25], con hidroxilación en posiciones 7/12, 7/16 y 14/16. Existe la presunción de que algunos de estos metabolitos sean los que están involucrados en la transformación de isosteviol con *F. culmorum* y a que a ellos sea referida la eficacia antifúngica observada.

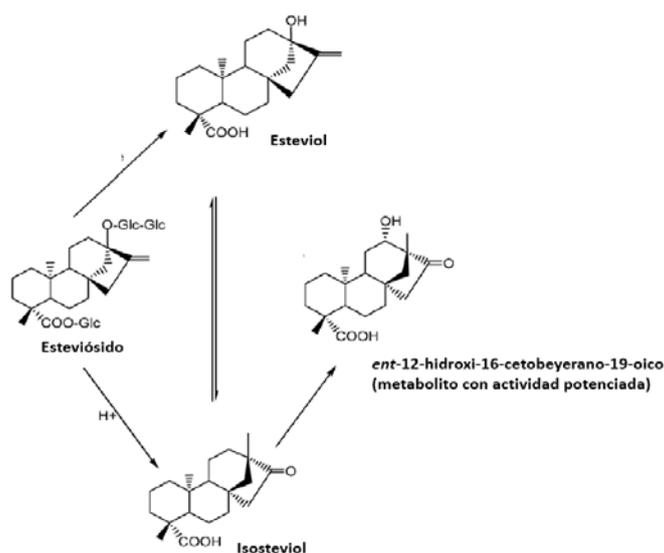


Figura 3. Estructuras de esteviósido, esteviol, isosteviol y uno de los metabolitos presumiblemente implicados en la interacción esteviósido-*F. culmorum*

5. Conclusiones

El potencial efecto sinérgico en términos de actividad antifúngica resultante de la combinación de soluciones acuosas de hojas de estevia y soluciones alcohólicas de cardo mariano y extractos de semillas de goji, preconizado como hipótesis de trabajo, no ha sido evidenciado contra *F. culmorum*. Se ha observado que, a las concentraciones utilizadas en nuestros ensayos y para este patógeno específico, los contenidos fenólicos de estas dos últimas plantas no han contribuido a aumentar la eficacia antifúngica de los extractos de estevia sola, los cuales –sin embargo– se han mostrado suficientemente bioactivos. De hecho, han dado lugar a valores de CE₅₀ y de CE₉₀ de 112,1 y 282,7 µg·mL⁻¹, respectivamente. La falta de sinergismo observada orienta a la conclusión de que la simple concurrencia de varios tipos de polifenoles no es determinante de la actividad antifúngica y esta debe ser referida a la presencia preferente de intermediarios con hidroxilación selectiva sobre el núcleo cetobeyerano. Estos resultados sugieren que los extractos de las hojas de *S. rebaudiana* pueden ser prometedores antifúngicos para el tratamiento de la fusariosis, incluso como tratamiento único.

Agradecimientos

Esta investigación ha sido financiada a través del proyecto VA258P18 de la Junta de Castilla y León.

Referencias

1. Ruiz-Ruiz, J.C.; Moguel-Ordoñez, Y.B.; Segura-Campos, M.R. Biological activity of *Stevia rebaudiana* Bertoni and their relationship to health. *Crit. Rev. Food Sci. Nutr.* **2015**, *57*, 2680-2690.
2. Pina-Pérez, M.C.; Rivas, A.; Martínez, A.; Rodrigo, D. Effect of thermal treatment, microwave, and pulsed electric field processing on the antimicrobial potential of açai (*Euterpe oleracea*), stevia (*Stevia rebaudiana* Bertoni), and ginseng (*Panax quinquefolius* L.) extracts. *Food Control* **2018**, *90*, 98-104.
3. Kumari, M.; Chandra, S. Stevioside glycosides from *in vitro* cultures of *Stevia rebaudiana* and antimicrobial assay. *Brazilian Journal of Botany* **2015**, *38*, 761-770.
4. Garcia, D.; Ramos, A.J.; Sanchis, V.; Marín, S. Effect of *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts on growth and mycotoxin production by *Aspergillus flavus* and *Fusarium verticillioides* in maize seeds as affected by water activity. *Int. J. Food Microbiol.* **2012**, *153*, 21-27.
5. Muanda, F.N.; Soulimani, R.; Diop, B.; Dicko, A. Study on chemical composition and biological activities of essential oil and extracts from *Stevia rebaudiana* Bertoni leaves. *LWT - Food Sci. Technol.* **2011**, *44*, 1865-1872.
6. Garcia, D.; Garcia-Cela, E.; Ramos, A.J.; Sanchis, V.; Marín, S. Mould growth and mycotoxin production as affected by *Equisetum arvense* and *Stevia rebaudiana* extracts. *Food Control* **2011**, *22*, 1378-1384.
7. Shukla, S.; Mehta, A.; Bajpai, V.K. Phytochemical screening and anthelmintic and antifungal activities of leaf extracts of *Stevia rebaudiana*. *J. Biol. Act. Prod. Nat.* **2013**, *3*, 56-63.
8. Pani, G.; Scherm, B.; Azara, E.; Balmas, V.; Jahanshiri, Z.; Carta, P.; Fabbri, D.; Dettori, M.A.; Fadda, A.; Dessì, A., et al. Natural and natural-like phenolic inhibitors of type B trichothecene *in vitro* production by the wheat (*Triticum* sp.) pathogen *Fusarium culmorum*. *J. Agric. Food. Chem.* **2014**, *62*, 4969-4978.
9. Matei, P.; Iacomì, B.; Martín-Gil, J.; Pérez-Lebeña, E.; Ramos-Sánchez, M.; Barrio-Arredondo, M.; Martín-Ramos, P. *In vitro* antifungal activity of composites of AgNPs and polyphenol inclusion compounds against *Fusarium culmorum* in different dispersion media. *Agronomy* **2018**, *8*.
10. Mhamdi, B.; Abbassi, F.; Smaoui, A.; Abdelly, C.; Marzouk, B. Fatty acids, essential oil and phenolics composition of *Silybum marianum* seeds and their antioxidant activities. *Pak J Pharm Sci* **2016**, *29*, 953-959.
11. Islam, T.; Yu, X.; Badwal, T.S.; Xu, B. Comparative studies on phenolic profiles, antioxidant capacities and carotenoid contents of red goji berry (*Lycium barbarum*) and black goji berry (*Lycium ruthenicum*). *Chem. Cent. J.* **2017**, *11*.

X CONGRESO IBÉRICO DE AGROINGENIERÍA
X CONGRESSO IBÉRICO DE AGROENGENHARIA

3 – 6 septiembre 2019, Huesca - España

12. O'Donnell, K.; Kistler, H.C.; Cigelnik, E.; Ploetz, R.C. Multiple evolutionary origins of the fungus causing Panama disease of banana: Concordant evidence from nuclear and mitochondrial gene genealogies. *Proc. Natl. Acad. Sci.* **1998**, *95*, 2044-2049.
13. Karlsson, I.; Edel-Hermann, V.; Gautheron, N.; Durling, M.B.; Kolseth, A.-K.; Steinberg, C.; Persson, P.; Friberg, H.; Cullen, D. Genus-specific primers for study of *Fusarium* communities in field samples. *Appl. Environ. Microbiol.* **2016**, *82*, 491-501.
14. Wadley, F.M. *The evidence required to show synergistic action of insecticides and a short cut in analysis*; U.S. Government Printing Office: Washington DC, USA, 1945.
15. Bajpai, V.K.; Kim, H.R.; Hou, C.T.; Kang, S.C. Microbial conversion and *in vitro* and *in vivo* antifungal assessment of bioconverted docosahexaenoic acid (bdHA) used against agricultural plant pathogenic fungi. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **2009**, *36*, 695-704.
16. Salehi, M.; Hasanloo, T.; Mehrabian, S.; Farahmand, S. Effects of *Silybum marianum* (L.) Gaertn seeds extract on dermatophytes and saprophytes fungi *in vitro* compare to clotrimazol. *Pharmaceutical Sciences* **2010**, *16*, 203-210.
17. Skenderidis, P.; Mitsagga, C.; Giavasis, I.; Hadjichristodoulou, C.; Leontopoulos, S.; Petrotos, K.; Tsakalof, A. In *Assessment of antimicrobial properties of aqueous UAE extracts of goji berry fruit and pomegranate fruit peels in vitro*, International Conference on Food and Biosystems Engineering, Rhodes, Greece, 2017; Rhodes, Greece, pp 542-549.
18. Song, Y.; Xu, B. Diffusion profiles of health beneficial components from goji berry (*Lyceum barbarum*) marinated in alcohol and their antioxidant capacities as affected by alcohol concentration and steeping time. *Foods* **2013**, *2*, 32-42.
19. Nguyen, D.-M.-C.; Seo, D.-J.; Lee, H.-B.; Kim, I.-S.; Kim, K.-Y.; Park, R.-D.; Jung, W.-J. Antifungal activity of gallic acid purified from *Terminalia nigrovenulosa* bark against *Fusarium solani*. *Microb. Pathog.* **2013**, *56*, 8-15.
20. de Oliveira, B. Biotransformation of the diterpenoid, isosteviol, by *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum* and *Rhizopus arrhizus*. *Phytochemistry* **1999**, *51*, 737-741.
21. Chang, S.-F.; Yang, L.-M.; Lo, C.-H.; Liaw, J.-H.; Wang, L.-H.; Lin, S.-J. Microbial transformation of isosteviol and bioactivities against the glucocorticoid/androgen response elements. *J. Nat. Prod.* **2008**, *71*, 87-92.
22. Cotoras, M.; Folch, C.; Mendoza, L. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 β -hydroxy-kaurenoic acid. *J. Agric. Food. Chem.* **2004**, *52*, 2821-2826.
23. de Oliveira, B.H.; Strapasson, R.A. Biotransformation of isosteviol by *Fusarium verticilloides*. *Phytochemistry* **1996**, *43*, 393-395.
24. Parkinson, A.; Ogilvie, B.W.; Buckley, D.B.; Kazmi, F.; Czerwinski, M.; Parkinson, O. Chapter 6: Biotransformation of Xenobiotics. In *Casarett & Doull's Essentials of Toxicology*, Third edition. ed.; Klaassen, C.D.; Watkins, J.B., Eds. McGraw-Hill: New York, 2015; pp 78-108.
25. Lin, C.-L.; Lin, S.-J.; Huang, W.-J.; Ku, Y.-L.; Tsai, T.-H.; Hsu, F.-L. Novel ent-beyeran-19-oic acids from biotransformations of isosteviol metabolites by *Mortierella isabellina*. *Planta Med.* **2007**, *73*, 1581-1587.