

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Evaluación de Extractos Antifúngicos para el Control de los Hongos Postcosecha  
*Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en Frutos de Manzana (*Malus domestica*)

**KARINA MORENO LEÓN**

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITOLÓGO**

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre del 2012

La presente tesis fue financiada por el proyecto DESARROLLO Y TRANSFERENCIA DE TECNOLOGÍA PARA EL CONTROL DE PATÓGENOS POSTCOSECHA EN FRUTO DE MANZANA (*Malus domestica*) COMO CULTIVO MODELO, COAH-2012-C20-187470 del Fondo Mixto de Fomento a la Investigación Científica y Tecnológica CONACYT-Gobierno del estado de Coahuila.

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGIA

Evaluación de Extractos Antifúngicos para el Control de los Hongos Postcosecha  
*Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* en Frutos de Manzana (*Malus domestica*)

Por:

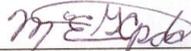
**KARINA MORENO LEÓN**

Tesis

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

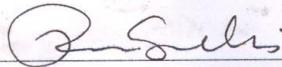
**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada

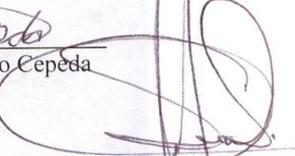


Dra. Ma. Elizabeth Galindo Cepeda

Asesor Principal



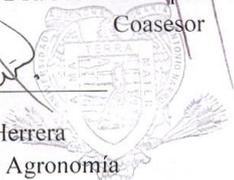
M.C. Rebeca Casique Valdés  
Coasesor



DR. Melchor Cepeda Siller  
Coasesor



Dr. Leobardo Bañuelos Herrera  
Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación  
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Diciembre del 2012

## DEDICATORIA

*A DIOS. Por permitirme vivir, por darme la paz y fuerzas necesarias para seguir en este camino aún en los momentos más difíciles.*

*A MI MADRE. Por ser la mujer que me dio la vida, por cuidar con amor y paciencia de mis sueños por permitirme tomar mis propias decisiones aun cuando fueron equivocadas, por alentarme en los momentos difíciles, por alegrarte en mis triunfos y sobre todo por ser la maravillosa mujer que eres.*

*A MIS HERMANAS. Que siempre han estado conmigo en las alegrías, en las lágrimas y los momentos difíciles que juntas hemos compartido y que han hecho de nosotras las personas que somos.*

*A MI HERMANO. Porque a pesar del tiempo y la distancia seguimos unidos por el gran amor y los bellos momentos que vivimos.*

*A MI PADRE. Por ser el ángel que cuida mis pasos desde el cielo.*

*A TI. Que sin saber me inspiraste para perseguir este sueño dándome ánimo para comprender que nunca es tarde para luchar por lo que uno quiere, a ti que me motivaste a llegar tan lejos y saber que mis miedos no son más que fortalezas para continuar en este gran sueño que es la vida.*

*“Los sueños para lo único que sirven es para hacerse realidad”*

*Walt Disney*

## **AGRADECIMIENTOS**

***A LA UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO.** Por haberme permitido realizar uno de los sueños más importantes en mi vida, por permitirme ser parte de sus alumnos y tener el orgullo de llamarme Buitre.*

***A BIORGANIX MEXICANA.** Por abrirme sus puertas para poder realizar mi tesis, por todo el apoyo brindado para el desarrollo de este trabajo. Así mismo agradezco a cada una de las personas que forman parte de él por sus enseñanzas apoyo y compañerismo en mi estancia.*

***A TI MAESTRO.** Que de una u otra manera contribuiste en mi formación de manera positiva o negativa, con tus consejos, regaños y enseñanzas me diste las herramientas no solo para mi vida profesional, si no también para mi vida personal.*

***A MIS ASESORES.** Por su apoyo incondicional para que este trabajo se llevara acabo, por estar siempre ahí, apoyándome en el desarrollo de cada actividad, por su tiempo, paciencia y las grandes enseñanzas que hicieron posible la realización de mi tesis.*

***A MIS COMPAÑEROS.** Por el viaje que compartimos a lo largo de 4 años y medio, por las cosas buenas y malas que vivimos a lo largo de esta aventura.*

***A MIS AMIGOS.** Que siempre estuvieron ahí cuando los necesité, que cuidaron de mi cuando estuve enferma, me hicieron reír cuando estaba triste y me regañaron cuando me equivoqué, a los que con un mensaje o llamada me hicieron sentir querida y apoyada.*

***A TI MUGROSITO (WZM).** Por todo lo vivido, por los buenos y malos ratos que hemos compartido, por tus regaños, consejos y sueños compartidos.*

**GRACIAS A TODOS**

## INDICE DE CONTENIDO

<b>I. INTRODUCCIÓN</b> .....	1
<b>II. JUSTIFICACIÓN</b> .....	4
<b>III. OBJETIVOS</b> .....	5
3.1 OBJETIVO GENERAL .....	5
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	5
<b>IV. REVISIÓN DE LITERATURA</b> .....	6
4.1 Origen del cultivo.....	6
4.1.1 Generalidades del cultivo.....	6
4.1.2 Importancia del cultivo .....	7
4.1.3 Importancia del cultivo a nivel mundial .....	7
4.1.4 Importancia del cultivo a nivel nacional y regional.....	7
4.1.4.1 Nivel regional.....	8
4.2 Pérdida postcosecha .....	8
4.3 Principales enfermedades postcosecha .....	9
4.4 <i>Penicillium expansum</i> .....	9
4.4.1 Taxonomía .....	10
4.4.2 Síntomas.....	10
4.4.3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad.....	11
4.4.4 Morfología .....	11
4.5 <i>Botrytis cinerea</i> .....	12
4.5.1 Taxonomía .....	13
4.5.2 Síntomas.....	13
4.5.3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad.....	14
4.5.4 Morfología .....	15
4.6 Métodos de Control .....	16
4.6.1 Cultural .....	16
4.6.2 Físico .....	17
4.6.3 Químico .....	17
4.6.4 Biológico.....	18
4.6.3.1 Microorganismos .....	18

4.6.3.2 Aceites esenciales .....	19
4.7 Plantas utilizadas en el control de hongos postcosecha .....	20
4.7.1 Gobernadora ( <i>Larrea tridentata</i> ).....	20
4.7.1.1 Descripción .....	20
4.7.2 Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> ).....	21
4.7.2.1 Descripción .....	21
4.7.3 Canela ( <i>Cinnamomun spp.</i> ).....	22
4.7.3.1 Descripción .....	22
4.7.4 Terpenos.....	22
4.7.4.1 Descripción .....	23
<b>V. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>24</b>
5.1 Aislamiento e identificación de <i>Penicillium expansum</i> y <i>Botrytis cinerea</i> .....	24
5.2 Selección y evaluación <i>in vitro</i> de extractos botánicos y metabolitos microbianos con potencial funguicida. ....	25
5.2.1 Obtención de extractos botánicos. ....	25
5.2.2 Obtención de metabolitos microbianos .....	26
5.2.3 Primera evaluación <i>in vitro</i> de extractos botánicos contra <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium expansum</i> .....	26
5.2.4 Segunda evaluación <i>in vitro</i> de extractos botánicos contra <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium expansum</i> .....	28
5.3 Concentración Mínima Inhibitoria .....	28
<b>VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>29</b>
6.1 Aislamiento e identificación de <i>Penicillium expansum</i> y <i>Botrytis cinerea</i> .....	29
6.2 Primera evaluación <i>in vitro</i> de extractos botánicos contra <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Penicillium expansum</i> .....	32
6.2.1 <i>Penicillium expansum</i> .....	32
6.2.2 <i>Botrytis cinerea</i> .....	34
6.2.3 Plantas evaluadas en el desarrollo de <i>Penicillium expansum</i> .....	37
6.2.4 Plantas evaluadas en el desarrollo de <i>Botrytis cinerea</i> .....	39
6.4. Concentración mínima inhibitoria de los extractos de canela comercial, orégano comercial y terpenos comerciales en el desarrollo de <i>P. expansum</i> y <i>B. cinerea</i> . ....	48
<b>VII. CONCLUSIONES.....</b>	<b>56</b>
<b>VIII LITERATURA CITADA .....</b>	<b>57</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Producción nacional y estatal 2011 .....	8
Tabla 2. Producción de manzana a nivel regional .....	8
Tabla 3. Extractos vegetales y microorganismos utilizados en el control de hongos postcosecha. ...	19
Tabla 4. Tratamientos utilizados en la primera evaluación .....	27
Tabla 5. Tratamientos utilizados en la segunda evaluación .....	28
Tabla 6. Análisis de varianza de los tratamientos evaluados contra <i>P. expansum</i> .....	32
Tabla 7. Valores de media expresados en cm de crecimiento de <i>P. expansum</i> ± error estándar .....	32
Tabla 8. Análisis de varianza de extractos evaluados contra <i>B. cinerea</i> .....	34
Tabla 9. Valores de media expresados en cm del crecimiento de <i>B. cinerea</i> ± error estándar .....	35
Tabla 10. Análisis de varianza de acuerdo al tipo de solvente y concentraciones utilizadas en 5 plantas evaluadas en el desarrollo de <i>P. expansum</i> .....	37
Tabla 11. Valores de media de 5 plantas evaluadas en el desarrollo de <i>P. expansum</i> ± error estándar. ....	37
Tabla 12. Medias expresadas en cm del crecimiento de <i>P. expansum</i> de acuerdo a concentraciones evaluadas de cada extracto. ....	38
Tabla 13. Medias expresadas en cm del crecimiento de <i>P. expansum</i> de acuerdo al tipo de solvente utilizado para la obtención de extracto.....	39
Tabla 14. Análisis de varianza de acuerdo al tipo de solvente y concentraciones utilizadas en 5 plantas evaluadas en el desarrollo de <i>B. cinerea</i> .....	39
Tabla 15. Valores de media de 5 plantas evaluadas en el desarrollo de <i>B. cinerea</i> ± error estándar. ....	40
Tabla 16. Medias expresadas en cm del crecimiento de <i>B. cinerea</i> de acuerdo a concentraciones evaluadas de cada extracto. ....	40
Tabla 17. Medias expresadas en cm del crecimiento de <i>B. cinerea</i> de acuerdo al tipo de solvente utilizado para la obtención de extracto.....	41
Tabla 18. Análisis de varianza de los tratamientos evaluados contra <i>Botrytis cinerea</i> .....	41
Tabla 19. Valores de media expresados en cm del crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> .....	42
Tabla 20. Crecimiento radial expresado en centímetros de <i>Botrytis cinerea</i> de acuerdo a la concentración utilizada.....	44
Tabla 21. Análisis de varianza de extractos evaluados contra <i>Penicillium expansum</i> .....	45
Tabla 22. Valores de media expresados en cm del crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> .....	45
Tabla 23. Valores de media expresados en cm del crecimiento de <i>Penicillium expansum</i> .....	48
Tabla 24. Media del crecimiento radial en cm para los 3 extractos evaluados contra <i>P. expansum</i> . ....	49
Tabla 25. Media expresada en cm del crecimiento radial del hongo <i>P. expansum</i> de acuerdo a la Concentración utilizada.....	49
Tabla 26 Medias en cm del desarrollo de <i>P. expansum</i> de acuerdo a la interacción de extracto y concentración.....	49
Tabla 27. Análisis de varianza para <i>Botrytis cinerea</i> .....	52
Tabla 28. Crecimiento radial del hongo de acuerdo al extracto evaluado.....	52
Tabla 29. Crecimiento radial del hongo de acuerdo a la concentración utilizada.....	53
Tabla 30. Medias en cm del crecimiento radial de <i>B. cinerea</i> de acuerdo a la interacción extracto y concentración.....	53

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Árbol de manzana .....	7
Figura 2. Sintomatología del patógeno <i>P. expansum</i> en el fruto .....	10
Figura 3. Morfología macroscópica de <i>P. expansum</i> .....	11
Figura 4. Morfología microscópica de <i>P. expansum</i> .....	12
Figura 5. Síntoma de ablandamiento causado por <i>B. cinerea</i> .....	14
Figura 6. Manchas ocasionadas por <i>B. cinerea</i> .....	14
Figura 7. Morfología macroscópica de <i>B. cinerea</i> .....	15
Figura 8. Morfología microscópica de <i>B. cinerea</i> .....	15
Figura 9. Ciclo infectivo de <i>B. cinerea</i> (Agrios, 1998).....	16
Figura 10. Planta de orégano y orégano seco. ....	21
Figura 11. Planta de canela y corteza.....	22
Figura 12. Estructura de terpenos. ....	23
Figura 13. Pudrición de frutos de manzana en cámara húmeda al cabo de 2 meses .....	30
Figura 14. Pudrición de manzana de la huerta 3 después de 6 semanas .....	30
Figura 15. Manzanas de la huerta 3 en refrigeración después de 4 semanas .....	31
Figura 16. Morfología macroscópica (izquierda) y microscópica (derecha) de <i>B. cinerea</i> .....	31
Figura 17. Morfología macroscópica (izquierda) y microscópica (derecha) de <i>P. expansum</i> .....	31
Figura 18. Extractos evaluados contra <i>P. expansum</i> .....	33
Figura 19. Comparación del efecto inhibitorio del P205 sobre el crecimiento radial de <i>P. expansum</i> comparado con el testigo.....	34
Figura 20. Comparación del efecto inhibitorio del testigo positivo sobre el crecimiento radial de <i>P. expansum</i> comparado con el testigo.....	34
Figura 21. Extractos evaluados contra <i>B. cinerea</i> .....	36
Figura 22. Comparación del efecto inhibitorio de P205 sobre el crecimiento radial de <i>B. cinerea</i> comparado con el testigo.....	36
Figura 23. Evaluación de 5 plantas contra el hongo <i>P. expansum</i> .....	38
Figura 24. Extractos evaluados contra <i>Botrytis cinerea</i> .....	42
Figura 25. Inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> con gobernadora. ....	43
Figura 26. Canela comercial al 1 y 2% contra <i>Botrytis cinerea</i> . ....	43
Figura 27. Orégano comercial al 1 y 2% contra <i>Botrytis cinerea</i> .....	44
Figura 28. Terpenos comerciales al 1 y 2% contra <i>Botrytis cinerea</i> .....	44
Figura 29. Extractos evaluados contra <i>Penicillium expansum</i> segunda evaluación.....	46
Figura 30. Extracto de Canela al 1 y 2% contra <i>Penicillium expansum</i> , .....	47
Figura 31. Extracto de Orégano al 1 y 2% contra <i>Penicillium expansum</i> , .....	47
Figura 32. Extracto de Terpenos comerciales al 1 y 2% contra <i>Penicillium expansum</i> , .....	47
Figura 33. Inhibición del hongo <i>P. expansum</i> de acuerdo a extracto y concentración. ....	50
Figura 34. Inhibición de <i>P. expansum</i> utilizando canela como extracto. ....	51
Figura 35. Inhibición de <i>P. expansum</i> utilizando orégano como extracto.....	51
Figura 36. Inhibición de <i>P. expansum</i> utilizando terpenos como extracto.....	52

Figura 37. Interacción extracto y concentración en el crecimiento de <i>B. cinerea</i> . .....	54
Figura 38. Inhibición de <i>B. cinerea</i> utilizando canela comercial a diferentes concentraciones en comparación al testigo.....	54
Figura 39. Inhibición de <i>B. cinerea</i> utilizando orégano como extracto. ....	55
Figura 40. Inhibición de <i>B. cinerea</i> utilizando terpenos como extracto.....	55

## I. INTRODUCCIÓN

México es uno de los 20 principales países productores de manzana en el mundo reportando en el 2010 una producción de 589,216 Ton, con rendimientos de 10,337 Ton por hectárea (SIAP, SAGARPA, 2010).

La manzana ocupa en nuestro país un lugar importante, se coloca en el sexto lugar en producción con el 4.2% del volumen total de los productos frutícolas, está dentro de las frutas más consumidas con 6.5 kg por persona al año y primer lugar en las importaciones de este rubro (SIAP, SAGARPA, 2010).

Se estima que a nivel mundial las pérdidas postcosecha de frutas y hortalizas causadas por microorganismos, son del orden de 5-25% en países desarrollados y 20-50% en países en desarrollo. La diferencia en la magnitud del daño obedece a que en los países desarrollados la disponibilidad de recursos tecnológicos y económicos previene las pérdidas postcosecha, ya que se pueden manejar las condiciones climatológicas que permiten el desarrollo de estas enfermedades, en cambio en los países en desarrollo no se cuenta con la tecnología que favorezca el manejo de los frutos (Hernández, 2007).

Las frutas y hortalizas frescas son generalmente las más susceptibles al deterioro postcosecha, lo cual puede deberse a las siguientes razones: 1) cambios fisiológicos como la senescencia y la maduración, 2) daños físico-mecánicos causados por magulladuras por roce, compresión o impacto, 3) daños químicos y 4) descomposición por microorganismos, los cuales son considerados causas patológicas.

Existe un gran número de patógenos causantes de las pérdidas postcosecha entre los que podemos encontrar bacterias (*Erwinia* y *Pseudomonas*) y hongos, siendo éstos últimos los que se encuentran con mayor frecuencia.

Los patógenos postcosecha que causan las mayores pérdidas en la producción de manzana son los hongos, se conocen más de 90 especies fúngicas que causan enfermedades durante el almacenaje. Las enfermedades postcosecha más importantes en manzana son la podredumbre azul y la podredumbre gris causadas por *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* respectivamente (Sholberg y Haag, 1996) y son favorecidas por las heridas ocasionadas por un mal manejo de los frutos (Spadaro y Gullino, 2004).

Existen muchos métodos de control que son utilizados para el manejo postcosecha de los productos hortofrutícolas, entre ellas la aplicación de tratamientos hidrotérmicos, irradiación, el almacenamiento a bajas temperatura, la utilización de empaques de plástico para crear un microclima y las más recientes, formulaciones que

contengan agentes biológicos; el conjunto de todos estos métodos ejercen un control en la incidencia de los patógenos postcosecha.

En los últimos años el control biológico ha tomado un gran auge mediante la aplicación de microorganismos donde se han observado excelentes resultados para el control de enfermedades en los productos hortofrutícolas después de ser cosechados.

El uso de microorganismos antagonistas para controlar las enfermedades postcosecha se plantea mediante dos enfoques importantes, que consisten en la estimulación y el manejo de los antagonistas presentes sobre la superficie del fruto, y en la introducción artificial de antagonistas contra los patógenos. Este último, es favorecido bajo condiciones actuales de almacenamiento controlado de los productos.

Los extractos botánicos son sustancias que se obtienen de hojas, tallos, flores o semillas, según sea la parte que contenga el ingrediente activo que actúa contra el patógeno. Para obtenerlos se macera la parte seleccionada y se coloca en infusión a la que se agrega alcohol como agente extractor.

Los extractos de plantas constan de una combinación de elementos activos producto del metabolismo vegetal. Todo el conjunto de sustancias del vegetal forman un *totum*; la gran cantidad de sustancias químicas que contiene interacciona de modo sinérgico, es decir, dan como resultado efectos superiores al efecto de los mismos elementos por separado (Morales, 1997).

Las películas o filmes comestibles han recibido intensa investigación en los últimos años para evitar la pérdida de los alimentos e incrementar la vida de anaquel, reduciendo los costos de manejo postcosecha. Existen diversos materiales con los que pueden ser elaboradas las películas, pero la importancia de éstas radica en los microorganismos que se puedan adherir para inhibir del crecimiento fúngico.

Las ventajas del uso de películas comestibles son cuantiosas, entre las principales se encuentran: costo generalmente bajo, reducción de desechos y contaminación ambiental, pueden mejorar las propiedades organolépticas, mecánicas y nutricionales de los alimentos, proporcionan protección individual a pequeñas piezas o porciones de alimentos.

Las películas comestibles no están diseñadas con la finalidad de remplazar los materiales de empaque sintéticos ni a las películas no comestibles. La importancia de éstas, radica en la capacidad de actuar en conjunto para mejorar la calidad del alimento en general, extender el tiempo de vida de anaquel y mejorar la eficiencia económica de los materiales de empaque. La función más importante de las películas comestibles es la reducción en cuanto a la pérdida de humedad se refiere, debido a que este factor es el

detonante de la aparición de los hongos fitopatógenos trayendo como consecuencia la pérdida del fruto en su totalidad.

El presente trabajo tiene como objeto la evaluación de extractos vegetales y metabolitos que inhiban el crecimiento de los hongos fitopatógenos, *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*, para la formulación de una película comestible que reduzca las pérdidas postcosecha sin afectar el medio ambiente o la salud humana.

## II.JUSTIFICACIÓN

México ocupa un lugar importante en la producción de manzana a nivel mundial pero, esta producción se ve mermada por las enfermedades que son causadas principalmente por los hongos *P. expansum* y *B. cinerea* provocando cuantiosas pérdidas directas e indirectas, siendo las directas aquellas que corresponden al desecho de las frutas sin valor comercial y las indirectas disminuyendo el valor comercial del fruto (Hernández, 2007).

Para prolongar la vida de anaquel de los frutos, se utilizan diversos métodos donde, de acuerdo a las posibilidades del productor, se aplica la técnica más económica y favorable para garantizar productos de calidad. Algunas de las técnicas son naturales, físicas, químicas y biológicas; las naturales consisten en realizar una buena cosecha evitando golpes, magulladuras o alguna lesión que favorezca el desarrollo de los patógenos; físicas, radica en el almacenamiento a bajas temperaturas y recubrimiento con bolsas de plástico creando un microclima deteniendo de esta manera su actividad fisiológica evitando así la proliferación de las enfermedades; químicas esta es una de las mas cuestionadas pues el control radica en la aplicación de cualquier tipo de plaguicidas ocasionando daños a la salud humana, pues al ser productos listos para el consumo aún llevan restos de químicos que al ser ingeridos provocan daños severos a la salud; y el biológico, que consiste en la aplicación de microorganismos benéficos capaces de inhibir el crecimiento fúngico o en la aplicación de sustancias provenientes de ellos con propiedades fungicidas, bacterias, etc., es relativamente nuevo y no ocasiona perjuicio en la salud humana ni deterioro al medio ambiente; por esta razón, es muy importante realizar investigaciones que favorezcan la generación de nuevas tecnologías aplicables al control de patógenos postcosecha buscando un compromiso con la producción de alimentos inocuos.

Los aceites esenciales son las fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas y que son importantes en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), de alimentos (condimentos y saborizantes) y farmacéutica (saborizantes), (Martínez, 2001).

Los aceites esenciales son compuestos formados por varias sustancias orgánicas volátiles, que pueden ser alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos, y que se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas (Bruneton, J. 2001).

Es por ello que es necesario continuar con la búsqueda de extractos vegetales y metabolitos producidos por microorganismos con potencial para reducir las pérdidas postcosecha y alargar la vida de anaquel de la manzana *Malus domestica*.

El presente trabajo se plantea como una alternativa de control para el problema que ocasionan los hongos postcosecha causantes de grandes pérdidas en el mercado.

## **HIPÓTESIS**

Al menos un extracto botánico y/o metabolito microbiano presentará propiedades antifúngicas contra los hongos *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*.

## **III.OBJETIVOS**

### **3.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar las propiedades antifúngicas de extractos botánicos y metabolitos microbianos contra los hongos postcosecha *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*.

### **3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

1. Aislar e identificar *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea* a partir de manzanas enfermas.
2. Seleccionar y evaluar *in vitro* extractos botánicos y metabolitos microbianos con potencial antifúngico.
3. Obtener la concentración mínima inhibitoria para el control de los patógenos de manzana.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1 Origen del cultivo

El cultivo del manzano crece espontáneamente en montes de Europa y Asia Central. Por su adaptación a un amplio rango de condiciones climáticas, a diversos suelos y sistemas de cultivo, el manzano se cultiva extensamente en Europa, Norte y SurAmérica, Nueva Zelanda, Australia y Asia. Sus cultivares se cuentan en gran número en la mayoría de los países con climas templados (Alayón *et al.*, 2004).

Se cree que el manzano es originario de Europa Oriental, de las regiones del Cáucaso y Asia Central. Su cultivo se extendió desde muy antiguo por el continente asiático, Europa y África. Los españoles llevaron este frutal a América, y hoy en día se encuentra cultivado por las zonas templadas de todo el mundo (Navarro, 2001).

#### 4.1.1 Generalidades del cultivo

El manzano (Figura 1) es un frutal caducifolio de gran desarrollo vegetativo, alcanzando alturas de hasta 10 m. tiene la copa de forma globosa con las ramificaciones abiertas y casi en posición horizontal con el tronco alto y derecho. La corteza es lisa y de color ceniciento verdoso en las ramas jóvenes y agrietadas, de un gris pardo en el tronco y ramas viejas. Sus hojas son ovoides-elípticas u elíptico-oblongas, de 4-13x3-7 cm, con el borde finamente aserrado, el ápice agudo, base redondeada y peciolo de 1-3 cm de longitud. Tiene el haz lampiño y de una coloración verde oscura, mientras que por el envés son pubescentes y de un verde más claro. Flores hermafroditas de tamaño grande (3-5 cm de diámetro), muy aromáticas y agrupadas en ramilletes de 3-6 flores. Están formadas por 5 pétalos blancos con manchas color rosa o púrpura por la cara exterior, siendo el cáliz persistente. Los frutos o manzanas, realmente están formados por el receptáculo floral que se vuelve carnoso. Son pomos globosos de 2-15 cm de diámetro, achatados y deprimidos en ambos extremos. Según variedades pueden tener la piel de color verde, amarillo o rojo con una amplia gama de tonalidades y combinaciones. La pulpa puede ser dura o blanda pero siempre es refrescante, teniendo un sabor que puede ir desde dulzón a extremadamente acidulo. En su interior se encuentran varias semillas (pepitas) brillantes de color pardo. Su sistema radicular es mas bien rastrero, menos ramificado que el peral (Navarro, 2001).



Figura 1. Árbol de manzana

#### **4.1.2 Importancia del cultivo**

De las diferentes especies de fruta dulce, la manzana es la que ocupa el primer lugar en volumen respecto a las exportaciones e importaciones mundiales, debido en gran parte a su aptitud para el transporte de larga distancia, al régimen de conservación, a su capacidad de ser manipulada para la carga y para la palatización (FAO, 2000).

#### **4.1.3 Importancia del cultivo a nivel mundial**

El manzano es la especie más cultivada a escala mundial. Asia es el continente de mayor producción, seguida por América del Norte donde destaca E.U. como segundo productor del mundo; por último se encuentra América del sur, África y Oceanía (FAO, 2000).

Las cifras de la FAO muestran que la superficie mundial plantada con manzanos en el año 2009 alcanzó a 4,92 millones de hectáreas, registrando una caída de 8,2% entre 2000 y 2009 (FAO, 2009).

Según esa fuente, China es el país que en 2009 muestra la mayor superficie plantada con manzanos a nivel mundial, cubriendo el 41% de ella. La siguen la Federación Rusa, con 7,1%, India (5,7%), Irán (3,6%) y Polonia (3,5%) (FAO, 2009).

La producción mundial de manzanas, de acuerdo a la FAO, alcanzó a 71,2 millones de toneladas en el 2009, con un crecimiento de 21% entre los años 2000 y 2009, permaneciendo bastante estancada en la primera parte de la década e incrementándose en forma el segundo quinquenio.

#### **4.1.4 Importancia del cultivo a nivel nacional y regional**

Según cifras del SIAP (2011), la superficie cultivada en el país fue 61, 292. 25 ha con una producción de 630,533.40 mil toneladas (Tabla 1). Según datos de la FAO (1995-1998) los principales estados productores son: Chihuahua, Durango, Coahuila y

Puebla aportando entre estos 76.6% de la superficie sembrada y el 86.6 % de la producción nacional. Chihuahua es el estado más importante a nivel nacional, entre 1980 y 1998 concentró en promedio el 57% del valor económico de la producción nacional de manzana (FAO, 2000).

Tabla 1. Producción nacional y estatal 2011

Cultivo	Sup. Sembrada (Ha)	Sup. Cosechada (Ha)	Producción (Ton)	Rendimiento (Ton)	PMR (s/Ton)	Valor producción miles de pesos
Manzana Nacional	61,292.25	56,845.44	630,533.40	11.09	4,952.47	3,122,698.66
Manzana Estatal	7,028.00	7,018.00	36,984.17	5.27	6,368.42	235,530.61

Fuente: SIAP, 2011.

#### 4.1.4.1 Nivel regional

Coahuila ocupa el tercer lugar a nivel nacional, siendo el municipio de Arteaga el que aporta la tercera parte de esta producción (Tabla 2).

Tabla 2. Producción de manzana a nivel regional

Cultivo	Superficie cosechada (Ha)	Producción (Tons)	Lugar Nacional	Municipio líder	Sup. Sembrada (Ha)*
Manzana	6,968	56,050	3°	Arteaga	7,028

Fuente: SAGARPA, 2010.

#### 4.2 Pérdida postcosecha

Las pérdidas debidas a las enfermedades de postcosecha se estiman en un 10 a un 30% de la pudrición total de los cultivos, y en algunos cultivos percederos no son raras las disminuciones superiores al 30%, sobre todo en los países en vías de desarrollo. Las pérdidas de frutos frescos, hortalizas y flores debidas a las enfermedades de postcosecha a menudo son directas, es decir, disminuyen la calidad y cantidad de los productos afectados (Agrios, 1998).

A nivel mundial las mermas postcosechade frutas y hortalizas causadas por microorganismos, son del orden de 5-25% en países desarrollados y 20-50% enpaíses en desarrollo (Hernández, 2007).

Se ha reportado que durante el manejo postcosecha de los productos vegetales se puede desperdiciar hastael 40% del total cosechado, estovaría entre productos, área de

producción y época del año; dentro de las principales razones que generan estas derramas está la incidencia de enfermedades causadas principalmente por hongos de diversos géneros (Hernández, 2007).

### 4.3 Principales enfermedades postcosecha

Las enfermedades de postcosecha que afectan a las manzanas, provocan anualmente pérdidas por desecho que pueden superar el 5% por temporada considerando la lejanía de los mercados de destino, junto a los largos períodos de almacenamiento en frío, es imprescindible el buen manejo de las enfermedades de post cosecha (Pinilla y Álvarez, 2001).

Dentro de las enfermedades de post cosecha que afectan a las manzanas, se encuentran la “Pudrición Calicinal” causada por *Botrytis cinerea* “Podredumbre Azul” causada por *Penicillium expansum*, “Corazón Mohoso” causado por *Alternaria alternata*, “Pudrición Blanca” causada por *Botryosphaeria dothidea* más recientemente “Pudrición Negra” y “Pudrición Lenticelar” u “Ojo de Buey” provocadas por *Botryosphaeria obtusa* (Montealegre et al, 2004).

Las pérdidas postcosecha ocasionadas por microorganismos que atacan durante el periodo de traslado de la huerta hacia el empaque pueden ser muy importantes ya que en este proceso se dan los factores ambientales favorables para el desarrollo del hongo, así como los daños mecánicos que son aprovechados para entrar (Gonzales, 2011).

Los hongos causantes de deterioro poscosecha generalmente muestran crecimiento óptimo a 20-25 °C (dependiendo de la especie), aunque algunos de ellos responden óptimamente a temperaturas ligeramente superiores. En general, las temperaturas máximas que toleran los hongos para su crecimiento son 32 a 38 °C, aunque algunas especies pueden crecer aún a mayores temperaturas, por ejemplo *Rhizopus*. Las temperaturas inferiores a 15 °C usualmente inhiben el desarrollo de patógenos, aunque existe un grupo selecto de hongos (como *Penicillium expansum*, *Botrytis cinerea*, *Alternaria alternata* y *Cladosporium herbarum*) que pueden crecer y causar deterioro a temperaturas entre -1 y 1 °C (Rivera, 2008).

#### 4.4 *Penicillium expansum*

Las distintas especies de este género causan las "pudriciones por los mohos azules" y las "pudriciones por los mohos verdes" a las cuales se les denomina también pudriciones por *Penicillium*. Son las más comunes y a menudo las más destructivas de todas las enfermedades de postcosecha, ya que afectan a todo tipo de cítricos, manzanas, peras, membrillos, uvas, cebollas, melones, higos, camotes y muchos otros frutos y hortalizas (Agrios, 1998).

#### 4.4.1 Taxonomía

De acuerdo con Alexopoulos y Mims (1996) esta es la clasificación taxonómica vigente para *P. expansum*.

Reino: Mycetae

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Penicillium*

Especie: *P.expansum*

#### 4.4.2 Síntomas

Se trata de una podredumbre blanda, acuosa y en general de color marrón claro.(Figura 2), Si bien los tonos de marrones pueden variar de una fruta a otra el elemento principal que distingue a esta enfermedad es la consistencia acuosa de la podredumbre. En general comienza a desarrollarse a partir de una herida. Sobre esta herida aparece el hongo, primero de color blanco y luego se recubre de la esporulación azul característica que le da el nombre a la enfermedad (Mondino, 2012).

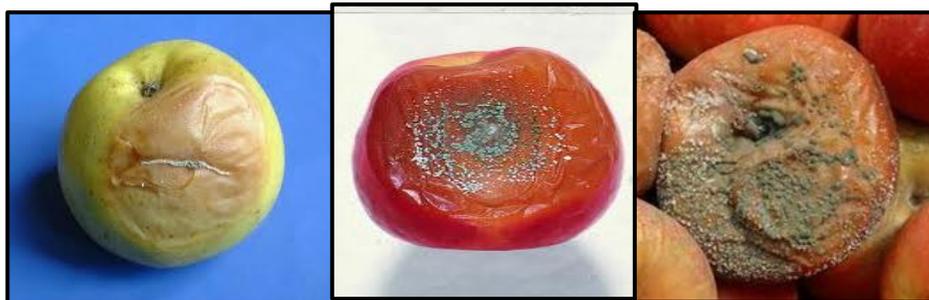


Figura 2.Sintomatología del patógeno *P. expansum* en el fruto

#### 4.4.3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad

Este género se caracteriza por formar conidios en una estructura ramificada semejante a un pincel que termina en células conidiógenas llamadas fiálides. En la Figura 4 se esquematizan los tipos de conidióforos del género *Penicillium*, cuyas ramificaciones se ubican formando verticilos. Si hay sólo un verticilo de fiálides el pincel es monoverticilado. Las ramificaciones de un pincel poliverticilado son ramas, râmulas, métulas y fiálides. Los conidios generados en fiálides suelen llamarse fialoconidios para indicar su origen. En la fiálide, al dividirse el núcleo, se extiende simultáneamente el extremo apical del que luego se estrangula separando a la espora recién formada. Se llama conectivo a la porción de pared que une entre sí a los conidios permitiendo la formación de cadenas, y en algunas especies se aprecia claramente con el microscopio óptico (Webster 1986).

Los filamentos o hifas alcanzan un diámetro entre dos o tres micrómetros y tienen septos con un poro central que no es visible al microscopio óptico. Las paredes del estípito, las ramas o las métulas pueden ser lisas, rugosas o equinuladas. La pared de las fiálides es siempre lisa. Las fiálides pueden tener forma de ánfora o bien ser casi cilíndricas con la porción apical en forma de cono. El tamaño máximo de las fiálides es de 15 µm y la parte terminal no supera los 3 µm de largo. Los conidios son esféricos o elipsoidales, unicelulares, hialinos que en masa se ven de color verde, verde azulado, verde aceituna o gris. La pared de los conidios es lisa o rugosa según las especies (Webster 1986).

#### 4.4.4 Morfología

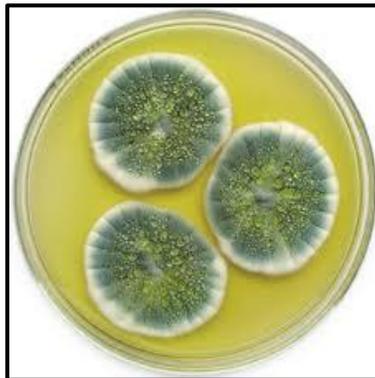


Figura 3. Morfología macroscópica de *P. expansum*



Figura 4. Morfología microscópica de *P. expansum*.

#### **4.5 Botrytis cinerea**

Es probablemente el hongo que causa más daño en la agricultura, ya que es un hongo oportunista de amplio espectro que no necesita de heridas o daños para penetrar los tejidos. Además, puede desarrollarse a bajas temperaturas manifestándose los primeros síntomas después de dos meses de almacenaje en frío (Pinilla y Álvarez, 1998).

Causa los "mohos grises" o las "pudriciones por el moho gris" de frutos y hortalizas, tanto en el campo como durante el almacenamiento. Prácticamente no hay fruto fresco, hortaliza, bulbo u otros órganos que no sean atacados por *Botrytis* cuando son almacenados. La pudrición puede iniciarse en la inflorescencia o en el extremo del pedúnculo del fruto, o bien en cualquier herida, hendidura o incisión de los tejidos de los órganos almacenados. Dicha pudrición tiene el aspecto de un área bien definida, pardusca y aguanosa, la cual penetra profundamente y avanza con gran rapidez en los tejidos del órgano (Agris, 1998).

La infección por *B. cinerea* puede producirse en el huerto durante el período de floración (septiembre) y se ve favorecida por el nivel de humedad ambiental de la estación. El hongo permanece latente en restos florales adheridos a los frutos, activándose durante el almacenaje y mostrando los primeros síntomas que consisten en una pudrición que se inicia en el extremo y avanza hacia el interior del fruto provocando en la pulpa una pudrición color marrón (Pinilla *et al.*, 1998).

En la mayoría de los hospederos y bajo condiciones de humedad se desarrolla una capa de moho aterciopelado, granular y de color grisáceo o gris parduzco sobre la superficie de las áreas putrefactas. Los mohos grises muestran mayor severidad en ambientes húmedos y fríos, continúan desarrollándose, aunque con mayor lentitud,

incluso a 0°C ocasionan anualmente pérdidas considerables en muchas hortalizas y frutos carnosos almacenados, particularmente en peras, manzanas, fresas, cítricos, tomates y cebollas (Agrios, 1998).

#### 4.5.1 Taxonomía

De acuerdo con Alexopoulos y Mims (1996) esta es la clasificación taxonómica vigente para *Botrytis cinerea*.

Reino: Mycetae

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Botrytis*

Especie: *B. cinerea*

#### 4.5.2 Síntomas

Este hongo ocasiona pudriciones y tizones en frutos, flores y hojas en cultivos como fresa, berenjena, cártamo, haba, chile, jitomate, lechuga, cebolla, zanahoria, y en frutales como cerezo, ciruelo y manzano. También causa pudriciones en muchas plantas ornamentales como rosas, crisantemos y noche buena. En todas ocasiona pérdidas en calidad y cantidad, tanto en el campo como en el transporte y almacenamiento y se hace mención señalando que en los frutos en maduración, el síntoma típico es una lesión café claro, oval o redondeada, ligeramente blanda, pero no acuosa que después se torna café rojizo y cubierta por un crecimiento grisáceo y polvoso, que al avanzar la enfermedad puede llegar a cubrir todo el fruto y posteriormente secarlo y momificado (Gordillo, 2004).

También se le conoce como pudrición seca, es una enfermedad altamente destructiva que se puede manifestar en el fruto en dos formas características: una es comenzando a atacar por el extremo del pedúnculo y la otra es en la parte apical del fruto.

El ataque de *B. cinerea* ocurre durante el estado de flor o fruta muy pequeña, generalmente la infección se extiende hacia el cáliz y pedúnculo, produciendo una deshidratación total y posteriormente la muerte. En frutos desarrollados, próximos a madurar, los síntomas empiezan con la pérdida de su firmeza (Figura 5) y posteriormente aparecen manchas descoloridas y opacas (Figura 6) (Gordillo, 2004).



Figura 5. Síntoma de ablandamiento causado por *B. cinerea*



Figura 6. Manchas ocasionadas por *B. cinerea*

#### 4.5.3 Epidemiología y ciclo de la enfermedad

La humedad ambiental es el factor más importante que regula la presencia del moho gris. Las lluvias frecuentes inducen la máxima incidencia de la enfermedad. Las condiciones óptimas en campo para el desarrollo de esta son de un ambiente de 15 a 20°C con 90% de humedad relativa (Gordillo, 2004).

La infección causada por el patógeno se lleva a cabo de diferentes maneras: por acarreo de esporas por el viento y agua, por el contacto de los frutos con el suelo o con otros que estén enfermos. Si las condiciones son favorables el daño ocurre, no importa en qué estado de desarrollo se encuentre el fruto (Gordillo, 2004).

#### 4.5.4 Morfología



Figura 7. Morfología macroscópica de *B. cinerea*



Figura 8. Morfología microscópica de *B. cinerea*

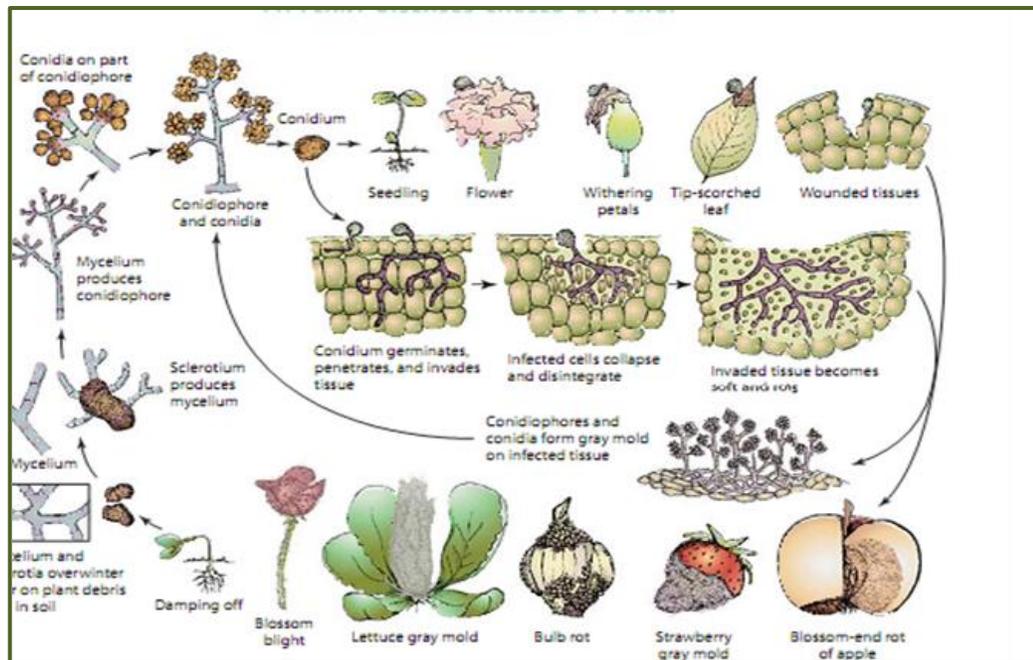


Figura 9. Ciclo infeccioso de *B. cinerea*(Agrios, 1998)

## 4.6 Métodos de Control

Los distintos métodos de control pueden clasificarse como reguladores, culturales, biológicos, físicos y químicos, dependiendo de la naturaleza de los agentes que se utilicen para controlar las enfermedades. Las medidas reguladoras de control ayudan a eliminar los patógenos de sus hospedantes o de cierta área geográfica. La mayoría de las prácticas culturales y métodos de control evitan que las plantas entren en contacto con el patógeno y permiten erradicar o reducir la abundancia de este último en las plantas, en un campo o un área geográfica. Los métodos de control biológico y algunos métodos culturales ayudan a mejorar la resistencia del hospedante o favorecen el crecimiento de microorganismos que son antagonistas del patógeno. Por último, los métodos de control físicos y químicos ayudan a proteger a las plantas contra el inóculo del patógeno y a curar una infección que ya está en desarrollo (Agrios, 1998).

### 4.6.1 Cultural

En el estudio realizado por Gordillo (2004), cita que para reducir considerablemente la incidencia de *Botrytis cinerea* es recomendable realizar diversas prácticas culturales para minimizar o reducir el efecto de este hongo como son las siguientes:

- Surcos altos para promover una buena aireación.

- Tener un buen cuidado de los drenes para evitar los encharcamientos en el campo.
- Acolchado con películas plásticas para evitar el contacto de los frutos con el terreno.
- Eliminar después de la cosecha los residuos vegetales tales como hojas viejas y frutos afectados.
- Retirar de los contenedores los frutos en los que haya empezado la infección o los lesionados.
- En cultivos protegidos se deberá tener una adecuada ventilación durante todo el ciclo.

#### **4.6.2 Físico**

El enfriamiento inmediatamente después de la cosecha y mantener el producto en refrigeración es el método más efectivo para retardar el deterioro de la mayoría de las frutas y hortalizas, ya que se retrasa el envejecimiento natural, la producción de calor resultante de la respiración, la producción de etileno, la pérdida de agua y la descomposición debido a la invasión por microorganismos (Hernández, 2007).

El manejo adecuado de la temperatura es el factor más importante que influye en la vida postcosecha y la calidad de mercado de todos los cultivos hortícolas. La tasa de deterioro del producto está directamente relacionada con la temperatura de manejo postcosecha. Es imperativo enfriar los productos hasta su temperatura óptima de almacenamiento tan pronto como sea posible después de la cosecha, idealmente en una hora o menos luego de recogerlos (Picha, 2004).

Gordillo (2004) señala que para tener buenos resultados en el control de enfermedades posteriores a la cosecha, es recomendable lo siguiente:

1. Tener el máximo cuidado para no empacar frutas infectadas.
2. Tener cuidado de no dañar la fruta durante el corte y el manejo de empaque.
3. El rápido enfriamiento a temperaturas cercanas a 0°C.
4. El uso de camiones refrigerados, de gran velocidad, para la entrega de la fruta a los mercados norteamericanos o aviones para embarques transoceánicos.

#### **4.6.3 Químico**

Después de la cosecha, los frutos y vegetales que lo permiten son lavados y tratados con químicos desinfectantes. El agua de lavado es cambiada en repetidas ocasiones y las soluciones desinfectantes son monitoreadas constantemente para mantener la fuerza germicida deseable. El cloro es el desinfectante de amplio espectro

utilizado universalmente y con frecuencia se utilizan fungicidas para prevenir específicamente el daño provocado por hongos (Hernández, 2007).

El uso de fungicidas de síntesis química es una alternativa no del todo aceptada debido a los daños causados al medio ambiente, a los riesgos en la salud humana y a la formación de cepas resistentes al fungicida (Soto, 2009).

La termonebulización es un proceso que convierte un producto químico líquido en una niebla fina, que se aplica directamente a la fruta en almacenaje. Esta técnica ha sido usada constantemente en tratamientos de postcosecha en Europa para la aplicación de antioxidantes, fungicidas y agentes esterilizantes (Soto, 2003).

#### **4.6.4 Biológico**

El control biológico es uno de los más adecuados por ser inocuo a los seres humanos y no presentar residualidad en el fruto como los fungicidas o agroquímicos en general (Guédez, 2009).

Constituye una alternativa eficaz al uso de fungicidas químicos para reducir las pudriciones de frutas y hortalizas en postcosecha, puesto que es un medio de lucha que respeta el medio ambiente. Además, los microorganismos antagónicos no son patógenos para el ser humano y pueden ser más persistentes durante el almacenamiento que los productos químicos (Soto, 2009).

##### **4.6.3.1 Microorganismos**

Los microorganismos antagonistas (bacterias, levaduras y hongos) tienen la capacidad de ejercer un efecto de control biológico sobre diferentes patógenos de interés y se han empleado para control de diversas enfermedades en frutos y hortalizas. En los últimos años el control biológico ha sido objeto de estudio y ha demostrado ser efectivo en el control de enfermedades postcosecha; la superficie del fruto o fructoplano es el mejor lugar para el aislamiento de microorganismos antagonistas, los cuales pueden suprimir el desarrollo de la enfermedad en el fruto (Hernández, 2007).

##### ***Bacilluslicheniformis***

Este considerado como un saprófito y no patógeno para el humano, sin embargo, es capaz de contaminar algunos alimentos. Aunque raramente causa intoxicaciones alimenticias, sus esporas tienen la capacidad de sobrevivir a altas temperaturas lo que provoca que sea complicado de eliminar. Esta facultad para formar endosporas de gran resistencia, le proporciona una ventaja para subsistir en condiciones extremas, incluso como las que se encuentran en el espacio exterior. Dicha cualidad le otorga a estas células una clasificación entre las más resistentes del planeta. Normalmente estas bacterias crecen en un pH alrededor de 7 y 7.4 y de 12 a 45°C; pero tiene la capacidad de

adaptarse a las condiciones que estén a su alrededor, reflejando la configuración correspondiente, ya sea en su forma vegetativa o latente (Fajardo *et al.*, 2006).

### ***Trichoderma* sp.**

Este hongo se ha utilizado en el control de hongos como *Botrytis cinerea* postcosecha en uvas, controlando parcialmente la enfermedad *in situ*. También se ha usado contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en manzanas, protegiendo durante dos meses al fruto *in situ* (Guédez, 2009).

### **4.6.3.2 Aceites esenciales**

Diversos productos derivados de las plantas han mostrado un efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas, polipéptidos y resinas (Hernández *et al.*, 2007).

La milenaria experiencia sobre el uso, enseña que la efectividad no depende exclusivamente del producto; es decir, no solo de sus principios activos según la química, sino también, y con la misma importancia, de su preparación y posibles combinaciones (Gonzales, 2004).

Contienen en alguno de sus órganos, principios activos, las cuales, administrados en dosis suficientes, producen efectos curativos en las enfermedades de los hombres, animales y plantas. Se calcula que de las 260,000 especies de plantas que se conocen en la actualidad el 10 % se pueden considerar medicinales, se estima que en México existen 5 mil plantas medicinales distintas (Cosme, 2008).

En la Tabla 3, se mencionan algunas plantas y microorganismos con los que se han realizado algunas investigaciones en el control de patógenos poscosecha y con la cual se basó para elegir extractos para la evaluación contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* en el presente ensayo.

Los aceites esenciales también llamados compuestos volátiles, son líquidos de consistencia aceitosa, aromáticos, obtenidos de los materiales vegetal (flores, los brotes, semillas, hojas, corteza, hierbas, madera, frutas y raíces). Pueden ser obtenidos por varios métodos, pero el más utilizado en la producción comercial es por destilación con vapor. Se conocen aproximadamente 3000 aceites esenciales, de los cuales 300 son comercialmente importantes en el mercado de las fragancias (Van y Leijten, 1999).

Tabla 3. Extractos vegetales y microorganismos utilizados en el control de hongos postcosecha.

PLANTA/ MICROORGANI SMO	PARTE UTILIZADA	HONGO QUE CONTROLA	AUTOR
<i>Bacillus</i> sp.	Cepa	<i>B. cinerea</i> y <i>P. expansum</i>	Bautista-Baños. 2006; Reynoso <i>et al.</i> , 2006.
<i>Trichoderma</i> sp.	Cepa	<i>B. cinerea</i> , <i>Penicillium</i> sp., <i>Aspergillus</i> <i>Rhizopus</i>	Guédez <i>et al.</i> , 2010; Reynoso <i>et al.</i> , 2006; Guédez <i>et al</i> 2009.
Gobernadora	Hojas, tallos	<i>Penicillium</i> , <i>Aspergillus</i> , <i>Fusarium</i> sp., <i>Alternaria</i> <i>alternata</i>	Tequeda <i>et al.</i> , 2002; Calvalho, 2011.
Canela	Corteza	<i>A. alternata</i> , <i>B. cinerea</i> , <i>R. stolonifer</i>	Calvalho, 2011; Torres-Sanhueza, 2007; Alvarado, 2009.
Orégano	Hojas, tallos	<i>B. cinerea</i> , <i>M. fijiensis</i> , <i>R. stolonifer</i>	Hernandez <i>et a.</i> , 2007; Bolívar <i>et al.</i> , 2009; Torres- Sanhueza, 2007; Velázquez del Valle <i>et a.</i> , / 2008.
Tomillo	Hojas, tallos	<i>B. cinerea</i> , <i>R. stolonifer</i>	Hernández <i>et a.</i> , / 2007; Velázquez del Valle <i>et al.</i> .,2008.
Menta	Hojas, tallos	<i>B. cinerea</i> , <i>R. stolonifer</i>	Hernández <i>et al.</i> , 2007; Velázquez del Valle <i>et a.</i> , / 2008.
Neem	Hojas	<i>B. cinerea</i> y <i>M. fijiensis</i>	Bolívar <i>et al.</i> ,2009.
Oleorresinas	Frutos	<i>B. cinerea</i>	Restrepo, 2006.

Fuente: creación propia

#### 4.7 Plantas utilizadas en el control de hongos postcosecha

Se han evaluado diversos extractos vegetales de perejil (*Petroselinumsativum*), ruda (*Ruta graveolens*), tomillo (*Thymusvulgaris*), y gobernadora (*Larrea tridentata*); además de los aceites esenciales de clavo (*Syzygiumaromaticum*) y orégano (*Lippiagraveolens*); así mismo, se ha establecido la relación entre los componentes químicos y las propiedades biológicas contra hongos fitopatógenos (García, 2010).

El uso de extractos de plantas para el manejo de enfermedades de cultivos se remonta al origen de la agricultura. Esta técnica a través de ensayo error, se fue perfeccionado hasta que se fueron olvidando y cambiando por productos de síntesis química, que fueron saturando los mercados al ofrecer aparentemente más efectividad pero, también dieron origen a la extinción de muchos organismos, a la generación de patógenos más resistentes, a la contaminación del ambiente y al desequilibrio agroecológico (Philbrick& Helen, 1984).

##### 4.7.1 Gobernadora (*Larrea tridentata*)

###### 4.7.1.1 Descripción

Es un arbusto perteneciente a la familia Zygophyllaceae, de porte erecto, ramificado desde la base, perennifolio, de 0.6 a 3 m de altura. Se distribuye abundantemente en el norte del país, de la península de Baja California a Tamaulipas e Hidalgo en altitudes que van en el rango de 400 a 1800 msnm. Crece en los sitios más secos de México (Moreno, 2011).

Los extractos obtenidos a partir de la resina de hojas de gobernadora han mostrado actividad fungicida contra *Alternariasolani*, *Pythiumsp*, *Rhizoctoniasolani*, *Fusariumoxysporum*, los extractos de este arbusto no han mostrado control contra hongos postcosecha (Sánchez, 2002).

La actividad antifúngica del extracto de resina hidrosoluble de gobernadora (*L.tridentata*) fue investigada in vitro contra *Botrytiscinerea*, *Colletotrichumcoccodesy* *F.oxysporum f.splicopersici*, aislados de rosas de invernadero y de lotes comerciales de papa y tomate, respectivamente. El extracto manifestó su efecto fungicida a 1000 y 2 000 ppm (Lira-Saldivar et al., 2003).

## 4.7.2 Orégano (*Origanumvulgare*)

### 4.7.2.1 Descripción

El *O. vulgare*(Figura 10)es una planta vivaz, con rizoma rastrero, de tallos erguidos, de hasta 1 m de altura, vellosos, generalmente ramificado en su parte superior, de color rojizo. Hojas de 1 a 4 cm, ovales, enteras, puntiagudas, lampiñas por el haz y vellosas en el envés, pecioladas. Las flores, reunidas en glomérulos densos dispuestos en panojas terminales, las espiguillas de 5 a 30 mm; las brácteas, mas largas que el cáliz pero sin duplicar su longitud, de 4 a 5 mm, son violáceas; cáliz tubulosos, con los 7 dientes casi iguales; corola con tubo erguido, saliente de 4 a 7 mm de color generalmente rojizo, a veces blancas; de los 4 estambres, son mayores los anteriores. El fruto es un tetraquenio, con cada parte ovoidea y lisa. Florece de junio a octubre (Muños, 2002).



Figura 10. Planta de orégano y orégano seco.

El aceite esencial, de composición variable según las razas, esta constituido fundamentalmente por carvacrol y timol, fenoles que pueden alcanzar hasta el 90% del total; contiene también pineno, sexquiterpenos, cimeno, etc (Muños, 2002).

El orégano es un ejemplo de estos recursos. Tanto las hojas de orégano como los extractos obtenidos de éstas, han inhibido la oxidación lipídica en sistemas alimentarios,

atribuyéndose la acción a la presencia de varios compuestos fenólicos entre los que destacan: ácido rosmarínico, ácido gálico, ácido cafeico, ácido protocatechuico, derivados de estos ácidos, flavonoides, carvacrol y timol; adicionalmente, se han identificado algunos tocoferoles. (Yanishlieva et al., 2006).

Esta planta posee propiedades antioxidantes, antifúngicas, antiespasmódicas, antisépticas, y sobre todo se caracteriza por la potente acción de sus principios activos carvacrol y timol que le otorgan a esta planta un gran poder antibacteriano. (Albado, 2001).

### 4.7.3 Canela (*Cinnamomun spp.*)

#### 4.7.3.1 Descripción

La planta de canela (Figura 11) es nativa de las regiones de Sri Lanka de la India. Las hojas son ovaladas- lanceoladas, de textura áspera, de unos 20 cm de longitud. La corteza de la planta es la que se utiliza.



Figura 11. Planta de canela y corteza.

El aceite esencial de canela es el que se utiliza es de color amarillo claro que se torna rojizo con el tiempo, es volátil, con un olor característico. Contiene aproximadamente 60-80 % p/p de aldehídos, eugenol (4-10%), trazas de carburo terpénico (pineno, cinelo, felandreno, linalol) y de metilamilcetona; entre otros (Hall *et al.*, 2002).

Otro de los extractos que han sido ensayados para el control de hongos postcosecha se obtiene de la canela, se aislaron los hongos patógenos y se trataron *in vitro* con el extracto de aceite de la corteza de canela, observándose un efecto fungistático y fungicida en el rango de concentraciones de 0,64-1,00 mg/ml. (Ranasinghe et al., 2003).

### 4.7.4 Terpenos

#### 4.7.4.1 Descripción

Se encuentran en la mayoría de los organismos, pero constituyen el grupo más abundante de los aceites vegetales, de hecho son los responsables de los aromas y sabores específicos de las plantas, mientras mayor sea la cantidad de oxígeno en la molécula, mayor será su aroma. Estos compuestos, se forman a partir del isopreno (unidad de 5 átomos de carbono); pueden contener desde una hasta ocho unidades. Las unidades pueden arreglarse linealmente (como en el escualeno) o cíclicamente (como en la limonina). Dentro de los terpenos se clasifica a los carotenoides que son tetraterpenos muy importantes en los mamíferos, especialmente el b-caroteno que es precursor de la vitamina A (11-cis-retinal). También las vitaminas liposolubles D (colecalfiferol) y K son consideradas como terpenos (Vázquez, 2003).

Los aceites esenciales son líquidos a temperatura ambiente, muy raramente tienen color y en general su densidad es inferior a la del agua (las esencias de azafrán o de clavo constituyen excepciones) casi siempre dotadas de poder rotatorio y tiene un índice de refracción elevada. Solubles en alcoholes y en disolventes orgánicos habituales, son liposolubles y muy poco soluble en agua son arrastrables por el vapor de agua(Contreras, 2012).

Los terpenos son hidrocarburos complejos de forma general  $C_nH_{2n-4}$ , de la serie del isopreno, el que está formado por dos dobles enlaces y que unidos por cadenas orgánicas forman un grupo de compuestos con características propias y que determinan la variedad de los efectos terapéuticos que se presentan en las plantas que los contienen. Se encuentran en los aceites esenciales de las plantas. Sus estructuras guardan relación con el cimeno (para-metilisopropilbenceno) por formar una molécula derivada de la condensación de dos isoprenos (Ruiz, 2012).

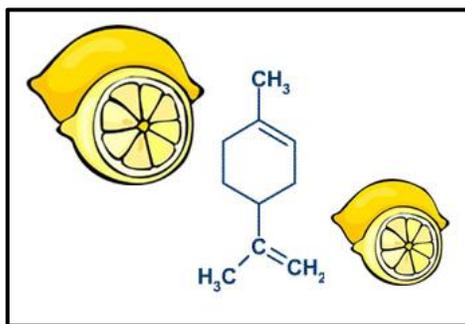


Figura 12. Estructura de terpenos.

## V. MATERIALES Y MÉTODOS

Este trabajo se realizó en el Centro de Investigación y Desarrollo BIORGANIX MEXICANA S.A. de C.V. en el Laboratorio de Microbiología ubicado Ramos Arizpe, Coahuila.

### **5.1 Aislamiento e identificación de *Penicillium expansum* y *Botrytis cinerea*.**

Los hongos fueron aislados a partir de frutos de manzana colectados en huertas de San Antonio de las Alazanas, municipio de Arteaga, Coahuila. Se visitaron 3 huertas cultivadas con la variedad Brotadory se colectaron 10 frutos de 5 árboles al azar por huerta dando un total de 30 manzanas que fueron procesadas e identificadas de acuerdo

al lugar de colecta. Adicionalmente del suelo se tomaron 10 frutos al azar de cada una de las huertas.

Los 30 frutos colectados en las 3 huertas fueron pesados y medidos, 4 fueron colocados en cámara húmeda, 3 en refrigeración y 3 se utilizaron para el aislamiento de los hongos.

Los 4 frutos colocados en cámara húmeda se tuvieron en observación por 2 meses, monitoreando cada semana si presentaban crecimiento fungoso o algún cambio físico.

Los 3 frutos que se mantuvieron en refrigeración, se colocaron en una bolsa de plástico y se almacenaron a 4°C por un período de 2 meses, observando cada 7 días si presentaban algún cambio o crecimiento fungoso.

Las manzanas destinadas para el aislamiento de los hongos se sometieron a un proceso de desinfección que se describe a continuación: se lavaron con agua para eliminar los restos de tierra y otras partículas, se cortaron trozos de aproximadamente 1 cm por lado de la parte superior, media y baja de cada manzana; los trozos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 10% y etanol al 70% durante un minuto cada uno, utilizando agua estéril para enjuagar entre cada lavado y al finalizar los mismos. Los trozos desinfectados se secaron sobre papel filtro estéril y se colocaron 3 trozos de cada manzana en cajas petri con Agar Papa Dextrosa (PDA), se realizaron 3 repeticiones por fruto. Las cajas se incubaron a 27° C durante 7 días. Los restos de manzana se colocaron en una charola buscando crear un clima favorable para el crecimiento fúngico.

De las manzanas colectadas en suelo la mitad fue desinfectada como se mencionó anteriormente para sembrar en medio PDA, mientras que el resto fue sembrado sin desinfección.

Se seleccionaron las cajas que presentaron crecimiento fúngico con la morfología correspondiente a cada hongo, estos cultivos fúngicos se purificaron mediante cultivos monospóricos y por punta de hifa. Se realizaron observaciones macroscópicas y microscópicas, una vez puras las cepas se enviaron al Centro Internacional de Servicios Fitosanitarios (CISEF) para su identificación a nivel especie.

Las cepas se crioconservaron de dos maneras: en una solución de leche descremada al 5% mas glicerol 10% y en glicerol 60%.

## **5.2 Selección y evaluación *in vitro* de extractos botánicos y metabolitos microbianos con potencial fungicida.**

### **5.2.1 Obtención de extractos botánicos.**

Se evaluaron 5 especies vegetales: Tomillo (*Thymus vulgaris*), Gobernadora (*Larrea tridetata*), Zacate de limón (*Cymbopogon citratus*), Orégano (*Origanum vulgare*) y Menta (*Mentha spicata*).

El material vegetal fue adquirido de manera comercial, se utilizaron tallos y hojas, se lavaron y secaron a 60° C por 48 h, se molieron en un mortero de porcelana para disminuir el tamaño de partícula y posteriormente se identificó y colocó en bolsas de plástico para ser almacenado hasta su uso.

Los extractos botánicos se obtuvieron por el método de separación sólido-líquido utilizando el sistema de extracción Soxhlet con agentes extractores de diversa polaridad como agua, etanol y acetato de etilo; es importante señalar que esta sección experimental dependió fuertemente de los agentes extractantes permitidos por el National Organic Program para la producción orgánica de agroinsumos. Se colocaron 350 mL de cada solvente en un matraz bola y en filtros cilíndricos de celulosa se pusieron 15g de material vegetal en polvo, se mantuvieron en extracción durante 24h utilizando diferentes temperaturas para cada solvente (acetato de etilo 55 °C, etanol 75°C y agua a 100°C). Transcurrido el tiempo de extracción, los extractos fueron concentrados en un rotavapor Yamato RE 300 para eliminar el solvente y posteriormente almacenados en frascos ámbar.

Se evaluaron también extractos de Canela, Neem, Ajo, Cáscara de nuez, Hierbabuena, Tepezcohuite, Oleorresinas, Terpenos, Propóleo, Santa Isabel, Rosa de castilla, Árnica morada, Equinácea, proporcionados por Biorganix Mexicana.

### **5.2.2 Obtención de metabolitos microbianos**

Se utilizó una cepa del género *Bacillus licheniformis* (denominada internamente como BsM) y 2 del género *Trichoderma* (Th y Th9) pertenecientes a la colección microbiana de Biorganix Mexicana. La bacteria se cultivó en medio líquido T8 (diseñado por Biorganix) a 32°C durante 24h a 150rpm en un shaker mcrScientific instruments, mientras que para los hongos se utilizó el medio líquido Th (diseñado por Biorganix) durante 96 h a 27°C con agitación constante en el shaker mcrScientific instruments a 150 rpm. Los cultivos se filtraron mediante un embudo buchner para retirar la biomasa y posteriormente se filtraron por membranas de 0.2 µ para obtener los metabolitos los cuales se refrigeraron hasta su uso.

### **5.2.3 Primera evaluación *in vitro* de extractos botánicos contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum***

Se evaluaron los extractos previamente obtenidos con etanol, agua y acetato de etilo a partir de tomillo, gobernadora, zacate de limón, orégano y menta; además, se probaron los metabolitos obtenidos de BsM, Th y Th9, así como extractos de canela, neem y ajo

proporcionados por el laboratorio de Fisicoquímicos de Biorganix Mexicana en concentraciones de 0.25, 0.5 y 1%. Se incluyeron en la prueba 2 testigos, uno absoluto (sin aplicación) y un testigo positivo (químico), además de un prototipo orgánico (P205) desarrollado en Biorganix Mexicana, los últimos 2 a la dosis recomendada 0.5%. En la Tabla 4 se muestran los tratamientos utilizados en el experimento en los cuales se colocaron 5 repeticiones.

Para la evaluación del efecto inhibitorio de los agentes antifúngicos se utilizó la técnica del medio envenenado. Se preparó PDA de acuerdo a las especificaciones del fabricante y se esterilizó a 121°C y 15 psi, se dejó enfriar a una temperatura aproximada de 40° C y se agregó cada extracto y metabolito microbiano a la concentración deseada, se vació en cajas petri y se dejó solidificar. Para el inóculo se utilizaron discos de PDA con micelio de *P. expansum* y *B. cinerea* de 0.8 cm que se colocaron en el centro. Se incubaron a 27°C realizando observaciones cada 48 h, la prueba concluyó cuando el testigo invadió al menos el 70% de la placa. Posteriormente se midió el crecimiento radial expresado en centímetros y se obtuvo el porcentaje de inhibición.

Tabla 4. Tratamientos utilizados en la primera evaluación

Extracto	Solvente	Concentración
Orégano	Etanol	0.25, 0.5 y 1 %
Orégano	Acetato de etilo	0.25, 0.5 y 1%
Orégano	Agua	0.25, 0.5 y 1 %
Zacate limón	Etanol	0.25, 0.5 y 1 %
Zacate limón	Acetato de etilo	0.25, 0.5 y 1 %
Zacate limón	Agua	0.25, 0.5 y 1 %
Menta	Etanol	0.25, 0.5 y 1 %
Menta	Acetato de etilo	0.25, 0.5 y 1 %
Menta	Agua	0.25, 0.5 y 1 %
Gobernadora	Etanol	0.25, 0.5 y 1 %
Gobernadora	Acetato de etilo	0.25, 0.5 y 1 %
Gobernadora	Agua	0.25, 0.5 y 1 %
Tomillo	Etanol	0.25, 0.5 y 1 %
Tomillo	Acetato de etilo	0.25, 0.5 y 1 %
Tomillo	Agua	0.25, 0.5 y 1 %
Canela	Etanol	0.25, 0.5 y 1 %
Ajo	Etanol	0.25, 0.5 y 1 %
Neem	Etanol	0.25, 0.5 y 1 %
<i>Trichoderma</i>		0.25, 0.5 y 1%
<i>Trichoderma-9</i>		0.25, 0.5 y 1 %
<i>B. licheniformis</i>		0.25, 0.5 y 1 %
Testigo positivo		0.5 %
P205		0.5 %
Testigo		0 %

Los resultados fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación múltiple de medias de Tukey para conocer cual es el mejor tratamiento en base a comparaciones estadísticas.

### 5.2.4 Segunda evaluación *in vitro* de extractos botánicos contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*

Los extractos utilizados fueron canela, orégano, terpenos, cáscara de nuez, hierbabuena, tepezcohuite, oleorresina, propóleo, santa isabel, rosa de castilla, árnica morada, equinácea y gobernadora (Tabla 5); los primeros 3 son extractos comerciales y el resto producidos por Biorganix. Se probaron concentraciones de 1 y 2% incluyendo un testigo absoluto.

Tabla 5. Tratamientos utilizados en la segunda evaluación

Extracto	Solvente	Concentración		
Yerbabuena	Etanol	1 y 2 %		
Propóleo	Etanol	1 y 2 %		
Rosa de castilla	Etanol	1 y 2 %		
Gobernadora	Etanol	1 y 2 %		
Se utilizó	Equinácea	Etanol	1 y 2 %	la técnica de medio anteriormente los resultados sometidos a un varianza y comparación de medias por la prueba Tukey 0.05 para conocer las diferencias entre
envenado	Tepezcohuite	Etanol	1 y 2 %	
descrita,	Cáscara de nuez	Etanol	1 y 2 %	
fueron	Santa Isabel	Etanol	1 y 2 %	
análisis de	Árnica morada	Etanol	1 y 2 %	
	Oleorresinas	Etanol	1 y 2 %	
múltiple	Terpenos comerciales		1 y 2 %	
	Orégano comercial		1 y 2 %	
	Canela comercial		1 y 2 %	
para	Testigo		1 y 2 %	

tratamientos.

Se seleccionaron los extractos botánicos y/o metabolitos microbianos que presentaron mayor inhibición del crecimiento micelial de *P. expansum* y *B. cinerea* para la obtención de la Concentración Mínima Inhibitoria (CMI).

### 5.3 Concentración Mínima Inhibitoria

Se determinaron las concentraciones de 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8% para trabajar con los extractos seleccionados que presentaron mayor inhibición frente a *B. cinerea* y *P. expansum* en la segunda evaluación. Para el análisis de resultados, los datos fueron sometidos a un análisis de varianza y comparación múltiple de medias por la prueba Tukey (0.05) para conocer las diferencias entre tratamientos.

## **VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN**

### **6.1 Aislamiento e identificación de *Penicilliumexpansum* y *Botrytis cinerea***

Las manzanas colocadas en cámaras húmedas y monitoreadas por 2 meses maduraron rápidamente al estar a temperatura ambiente, presentaron pudriciones blandas a las 4 semanas, siendo las de la huerta 3 las más afectadas, esto se debe probablemente a que es la huerta menos tratada; las pudriciones se presentaron hasta en un 70 % de los frutos al cabo de los 2 meses. En las huertas 1 y 2 la pudrición fue menor con un 25 y 30 % respectivamente como se muestra en la Figura 13, en estos frutos no se observó ningún crecimiento fungoso.

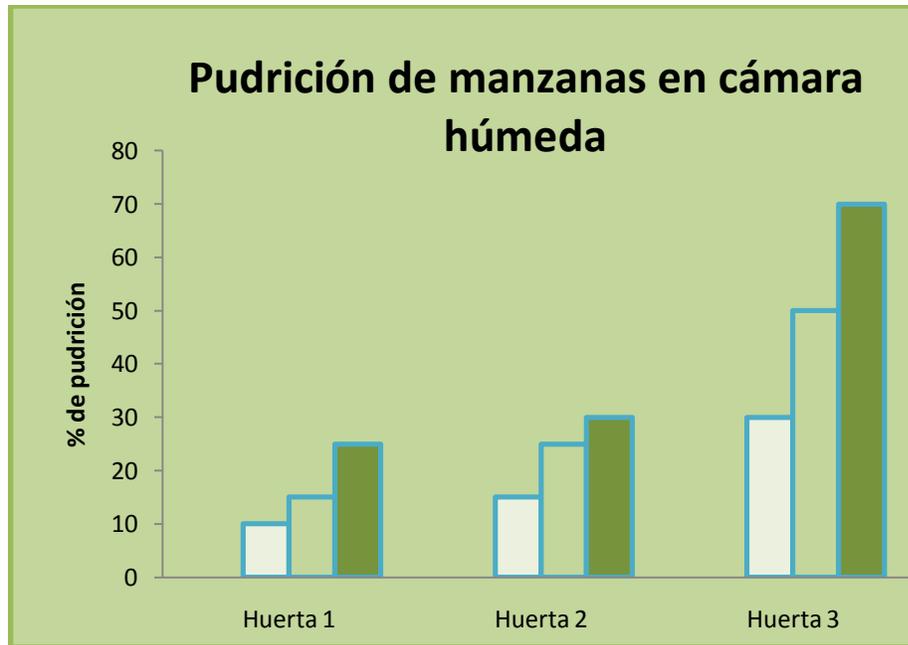


Figura 13. Pudrición de frutos de manzana en cámara húmeda al cabo de 2 meses



Figura 14. Pudrición de manzana de la huerta 3 después de 6 semanas

En las manzanas que se colocaron en refrigeración a 4°C durante 2 meses, sólo se observó una madurez mínima, ningún fruto de las 3 huertas presentó crecimiento fungoso ni pudriciones blandas(Figura 15).



Figura 15. Manzanas de la huerta 3 en refrigeración después de 4 semanas

El crecimiento fúngico en cajas petri proveniente de las manzanas destinadas para la obtención de los hongos fue observado cada tercer día, se prepararon tinciones con azul de lactofenol para observar la morfología microscópica característica de los hongos (Figuras 16 y 17). Las cajas Petri presentaron contaminación inclusive cuando se sembraron en repetidas ocasiones, esto debido a que a pesar de ser desinfectados los frutos colectados no se eliminó por completo los microorganismos provenientes del campo. Por lo anterior se dificultó el aislamiento de *B. cinerea* a partir de manzana, razón por la cual la cepa fue aislada de fresas (fruta muy susceptible a este patógeno). La identificación de *B. cinerea* a nivel especie fue confirmada por el CISEF. En el caso de *Penicillium*, según resultados de del CISEF se identificó como *Penicillium italicum*. Para continuar con el experimento se adquirió una cepa de *Penicillium expansum* en el CISEF.

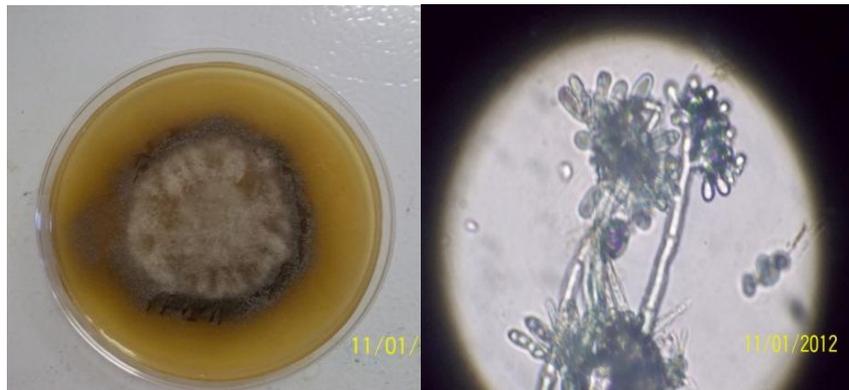


Figura 16. Morfología macroscópica (izquierda) y microscópica (derecha) de *B. cinerea*

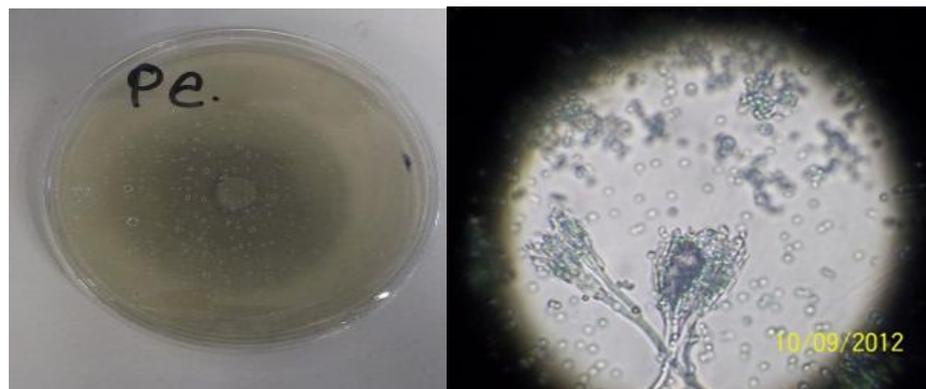


Figura 17. Morfología macroscópica (izquierda) y microscópica (derecha) de *P. expansum*

## 6.2 Primera evaluación *in vitro* de extractos botánicos contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*

### 6.2.1 *Penicillium expansum*

De acuerdo al análisis de varianza mostrado en la Tabla 6, se indica que al menos uno de los tratamientos evaluados es diferente estadísticamente a los demás, sin embargo, los cinco extractos obtenidos con su respectivo solvente, no mostraron inhibición mayor al 13% (Tabla 7). Así mismo, se observó un incremento del 18 % en el crecimiento radial del hongo al utilizar los metabolitos microbianos de *Bacillus licheniformis* y *Trichoderma sp.* en comparación al testigo, esto debido probablemente a que el medio de cultivo conteniendo los metabolitos microbianos pudo aportar nutrientes y favorecer su crecimiento.

Tabla 6. Análisis de varianza de los tratamientos evaluados contra *P. expansum*

	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr(>F)
Tratamiento	13	201.17	15.4746	6.0239	4.541e-10***
Residuales	326	837.45	2.5689		

Códigos de significancia: 0 \*\*\*\* 0.001 \*\*\* 0.01 \*\* 0.05 \* 0.1 ' ' 1

Tabla 7. Valores de media expresado en cm de crecimiento de *P. expansum* ± error estándar

Nombre	Diámetro en (cm)	Repetición	Agrupamiento estadístico (Tukey 0.05)
<i>B. licheniformis</i>	6.4 ± 0.18	15	a
Ajo	4.5 ± 0.29	15	ab
Canela	5.3 ± 0.36	15	ab
Gobernadora	4.7 ± 0.33	45	ab
Menta	4.5 ± 0.29	45	ab
Neem	4.5 ± 0.38	15	ab
Orégano	4.6 ± 0.20	45	ab
Testigo	5.2 ± 0.68	15	ab
<i>Trichoderma</i>	6.2 ± 0.23	15	ab
<i>Trichoderma-9</i>	5.8 ± 0.35	15	ab

Tomillo	6.0 ± 0.14	45	ab
Zacate limón	5.3 ± 0.18	45	ab
P205	4.3 ± 0.99	5	b
Testigo positivo	1.6 ± 0.67	5	c

La Tabla 7 muestra el agrupamiento estadístico de los extractos evaluados contra *P. expansum* donde se observó que existe diferencias altamente significativas entre los tratamientos evaluados encontrando que el testigo positivo y el prototipo P205 fueron los que presentaron control frente a *P. expansum* con una inhibición del 69.23 y 17.3% respectivamente.

El bajo porcentaje de inhibición contra *P. expansum* puede atribuirse a un posible error en el método de extracción, ya que los extractos estuvieron expuestos a la luz hasta por 48 h, estudios de estabilidad en extractos de *Cymbopogon citratus* realizado por Rodríguez *et al.* (2003) encontraron que el producto sufre variaciones importantes por la influencia de la temperatura, luz y el medio ambiente; De la Cerda (2012) mencionó que una temperatura mayor a 65°C desnaturaliza muchos de los fitoquímicos siendo estos factores que modifican las propiedades de las plantas.

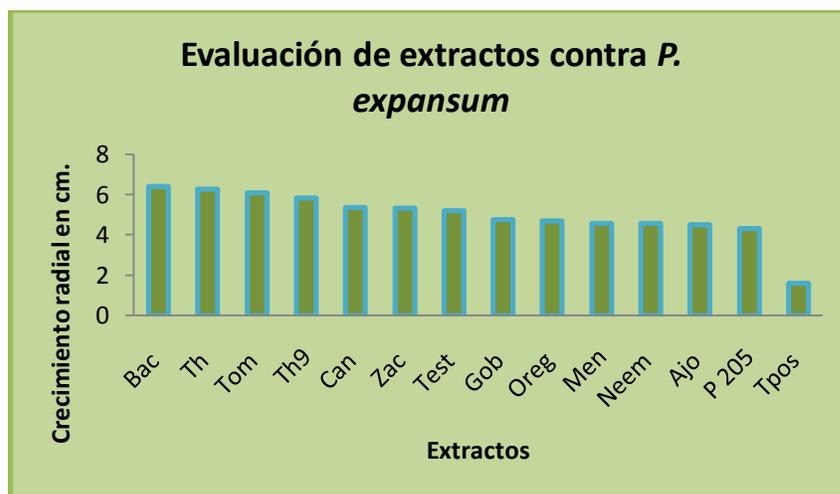


Figura 18. Extractos evaluados contra *P. expansum*

Bac=*B.licheniformis*, Th=*Trichoderma*, Tom=Tomillo, Th-9=*Trichoderma*-9, Can=canela, Zac=Zacate limón, Test=Testigo, Gob=Gobernadora, Oreg=Orégano, Men=Menta, Neem, Ajo, P205, T pos=Testigo positivo.

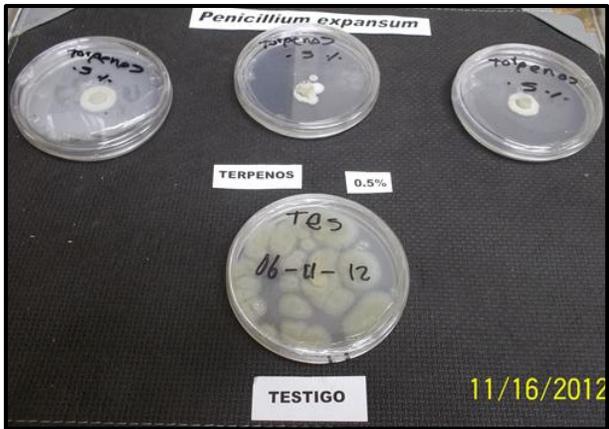


Figura 19. Comparación del efecto inhibitorio del P205 sobre el crecimiento radial de *P. expansum* comparado con el testigo

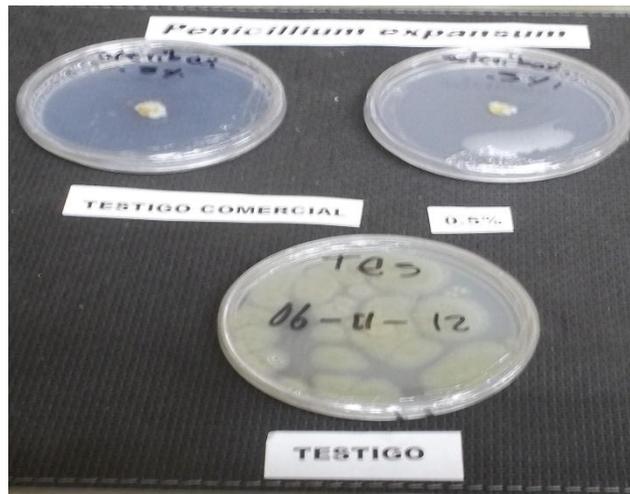


Figura 20. Comparación del efecto inhibitorio del testigo positivo sobre el crecimiento radial de *P. expansum* comparado con el testigo

### 6.2.2 *Botrytis cinerea*

El análisis de varianza realizado indica que al menos uno de los tratamientos evaluados contra *B. cinerea* es diferente (Tabla 8).

Tabla 8. Análisis de varianza de extractos evaluados contra *B. cinerea*

	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr(>F)
Tratamiento	13	371.76	28.5970	17.432	2.2e-16 ***
Residuales	326	534.81	1.6405		

Códigos de significancia 0 (\*\*\*) 0.001 (\*\*\*) 0.01 (\*) 0.05 (.) 0.1 (.) 1

En la Tabla 9 se observa la media de crecimiento radial  $\pm$  el error estándar expresado en cm, donde se observa que el testigo positivo (Producto químico), nuevamente fue el que presentó mayor efecto inhibitorio con un porcentaje del 100 % para *B. cinerea*.

Tabla 9. Valores de media expresado en cm del crecimiento de *B. cinerea*  $\pm$  error estándar

Nombres	Media en (cm)	Repeticiones	Agrupamiento estadístico (Tukey 0.05)
Zacate limón	8 $\pm$ 0	45	a
Ajo	6.53 $\pm$ 0.28	15	ab
<i>B. licheniformis</i>	6.80 $\pm$ 0.21	15	ab
Canela	6.7 $\pm$ 0.28	15	ab
Gobernadora	6.82 $\pm$ 0.15	45	ab
Menta	7.1 $\pm$ 0.37	45	ab
Neem	6.8 $\pm$ 0.30	15	ab
Orégano	6.28 $\pm$ 0.12	45	ab
Testigo	6.8 $\pm$ 0.24	15	ab
<i>Trichoderma</i>	7.1 $\pm$ 0.18	15	ab
<i>Trichoderma</i> -9	7.2 $\pm$ 0.13	15	ab
Tomillo	6.4 $\pm$ 0.18	45	ab
P205	3.7 $\pm$ 0.94	5	c
Testigo positivo	0 $\pm$ 0	5	d

La Figura 21 muestra de manera gráfica el comportamiento de dichos tratamientos. El agrupamiento Tukey realizado para *B. cinerea* indicó que no existe diferencia estadística entre el zacate limón, metabolitos microbianos, menta, gobernadora, neem, canela, ajo, tomillo y orégano respecto al testigo. Sin embargo, el P205 mostró un porcentaje de inhibición del 45% (Figura 22).

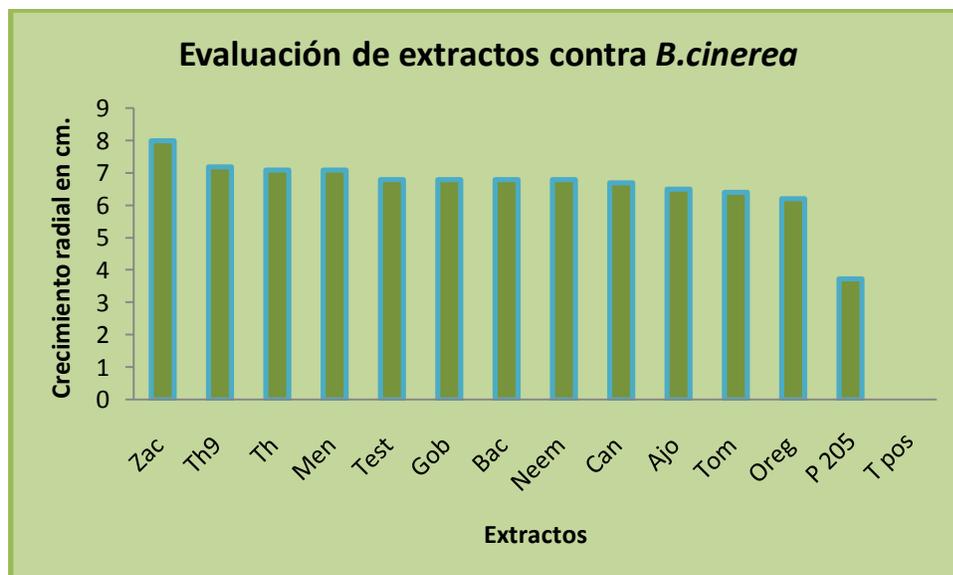


Figura 21. Extractos evaluados contra *B cinerea*

Zac-Zacate limón, Th-9=*Trichoderma*-9, Th-*Trichoderma*, Men= Menta, Test=Testigo, Gob=Gobernadora, Bac=*B. licheniformis*, Neem, Can=Canela, Ajo, Tom=Tomillo, Oreg=Orégano, P 205, Tpos=Testigo positivo.



Figura 22. Comparación del efecto inhibitorio de P205 sobre el crecimiento radial de *B. cinerea* comparado con el testigo

A pesar de que los metabolitos microbianos no presentaron efecto alguno contra *P. expansum* y *B. cinerea*, Michel (2001) encontró un efecto positivo de los metabolitos de *Trichoderma* contra especies del género *Fusarium sp.*, Memenza (2009) utilizó metabolitos secundarios extraídos de *Bacillus* y *Trichoderma* para el control de *B. cinerea*, mencionando una inhibición de hasta un 54.67 %. Además, se ha reportado en la literatura la evaluación de extractos etanólicos de ajo, tomillo y gobernadora frente a patógenos postcosecha encontrando que la gobernadora tiene una actividad del 41.5 % de inhibición (Tequida, 2002).

Viveros (2006) comentó que evaluando diversos extractos de plantas extraídos mediante Soxhlet con etanol y agua obtuvo resultados de 75 % de inhibición utilizando los extractos de canela y neem en patógenos postcosecha utilizando concentraciones de 25, 50, 75 y 100 %, sin embargo estas concentraciones son muy elevadas. De acuerdo a los autores mencionados, las plantas evaluadas en el presente ensayo poseen actividad antifúngica, sin embargo no presentaron altos porcentajes de inhibición debido a las concentraciones utilizadas, al método de extracción y a otros factores anteriormente mencionados.

### 6.2.3 Plantas evaluadas en el desarrollo de *Penicillium expansum*

La tabla 10 muestra el análisis de varianza entre los tratamientos evaluados según el tipo de concentración y solvente utilizado.

Tabla 10. Análisis de varianza de acuerdo al tipo de solvente y concentraciones utilizadas en 5 plantas evaluadas en el desarrollo de *P. expansum*.

	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr(>F)
Tratamiento	4	72.28	18.07	13.51	< 1.179e-09 ***
Solvente	2	73.28	36.643	27.48	4.063e-0911 ***
Concentración	2	29.47	4.73	3.54	0.0309985 *
Tratamiento: solvente	8	162.05	20.257	15.15	< 2.2e-16 ***
Tratamiento: concentración	8	26.24	3.307	2.47	0.0144197 *
Solvente concentración	4	10.92	2.73	2.04	0.0903986
Tratamiento: solvente concentración	1	664.19	4.012	3.00	0.0001858 ***
Residuales	180	240.644	1.337		

Códigos de significancia: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Tabla 11. Valores de media de 5 plantas evaluadas en el desarrollo de *P. expansum* ± error estándar.

Planta	Media en cm	Repetición	Agrupamiento según Tukey (0.05)
Tomillo	6.08 ± 0.14	45	a
Orégano	4.68 ± 0.20	45	ab
Gobernadora	4.75 ± 0.33	45	ab

Zacate limón	5.32 ± 0.18	45	b
Menta	4.56 ± 0.29	45	c

En la Tabla 11 se observa que según el análisis por planta, la menta inhibió en mayor proporción el desarrollo del hongo seguido del zacate limón; sin embargo, el tomillo tuvo un efecto contrario al buscado incrementando el crecimiento radial del hongo. Así mismo, se observó que no existe diferencia significativa entre el zacate limón, la gobernadora y el orégano. En la Figura 23 se puede apreciar de manera gráfica los tratamientos evaluados.



Figura 23. Evaluación de 5 plantas contra el hongo *P. expansum*.

Tom= Tomillo, Zac= Zacate limón, Gob= Gobernadora, Oreg= Orégano, Men= Menta.

La Tabla 12 expresa el crecimiento radial de el hongo *P. expansum* de acuerdo a la concentración utilizada, donde se encontró que la concentración al 1 % fue la que mostró mejor inhibición.

Tabla 12. Medias expresadas en cm del crecimiento de *P. expansum* de acuerdo a concentraciones evaluadas de cada extracto.

Concentración %	Media (cm)	Repeticiones	Agrupamiento Tukey (0.05)
0.25	5.30 ± 0.16	75	a
0.5	5.13 ± 0.18	75	ab
1	4.40 ± 0.23	75	b

En la Tabla 13 se expresa el crecimiento radial en cm del hongo *P. expansum* de acuerdo a los solventes utilizados donde se encontró que no existen diferencias significativas entre el acetato de etilo y el etanol los cuales muestran mayor control del hongo comparado con el solvente agua.

Tabla 13. Medias expresadas en cm del crecimiento de *P. expansum* de acuerdo al tipo de solvente utilizado para la obtención de extracto.

Solvente	Media (cm)	Repetición	Agrupamiento Tukey (0.05)
Agua	5.88 ± 0.14	75	a
Acetato de etilo	4.78 ± 0.2	75	b
Etanol	4.57 ± 0.18	75	b

#### 6.2.4 Plantas evaluadas en el desarrollo de *Botrytis cinerea*

El análisis de varianza realizado para *B. cinerea* indica que existen diferencias altamente significativas entre tratamiento, solvente y concentración como lo muestra la Tabla 14.

Tabla 14. Análisis de varianza de acuerdo al tipo de solvente y concentraciones utilizadas en 5 plantas evaluadas en el desarrollo de *B. cinerea*.

	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr(>F)
Tratamiento	4	21.11	84.46	113.125	<2.2e-16***
Residuales		25.33	2.66	14.29	1.735e-16***
Concentración	2	33.40	16.7	89.470	<2.2e-06***
Tratamiento : solvente	8	150.32	18.79	100.66	< 2.2e-16***
Tratamiento : concentración	8	47.25	5.90	31.64	< 2.2e-16***
Solvente: concentración	4	20.35	5.08	27.256	<2.2e-16***
Tratamiento : solvente : concentración	16	140.66	8.79	47.096	< 2.2e-16***
Suma de cuadros y medias	180	33.60	0.186		
F valor Pr (>F) Residual					

Códigos de significancia 0 \*\*\*\*) 0.001 (\*\*\*) 0.01 (\*) 0.05 (.) 0.1 (.) 1 0 \*\*\*\*) 0.001 (\*\*\*) 0.01 (\*) 0.05 (.) 0.1 (.) 1

La Tabla 15 muestra que no existen diferencias significativas entre el orégano y el tomillo, siendo estos los que presentaron mejor inhibición de *B. cinerea* con un 21.5 % más en comparación con el zacate limón. De los resultados obtenidos, difieren de los expresados por Rodríguez (2000) quien encontró que la gobernadora fue efectivo contra diversos hongos postcosecha, además, Hernández (2007) probó las oleorresinas

las cuales fueron efectivas contra algunos hongos postcosecha causantes de pudriciones en frutos.

Tabla 15. Valores de media de 5 plantas evaluadas en el desarrollo de *B.cinerea* ± error estándar.

Planta	Nombre	Media (cm)	Repeticiones	Agrupamiento estadístico (tukey 0.05)
Zac	Zacate limón	8.0 ± 0.0	45	a
Men	Menta	7.10 ± 0.37	45	b
Gob	Gobernadora	6.82 ± 0.15	45	c
Or	Orégano	6.28 ± 0.121	45	d
Tom	Tomillo	6.40 ± 0.18	45	d

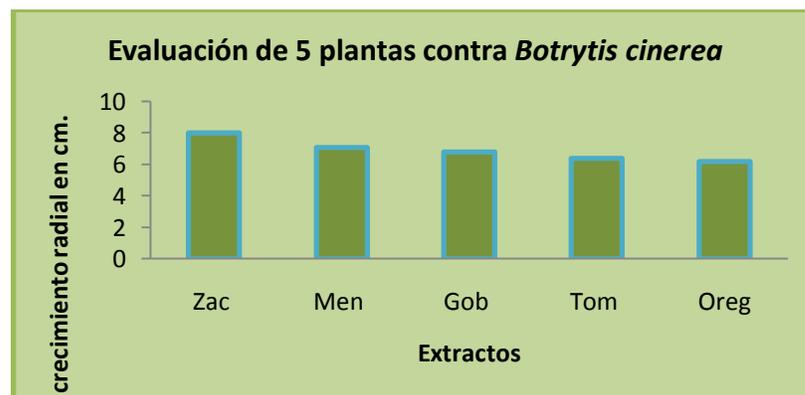


Figura 24. Evaluación de plantas contra *Botrytis cinerea*.

Zac=Zacate limón, Men=Menta, Gob=Gobernadora, Tom=Tomillo, Oreg=Orégano.

En la Tabla 16 se observan los resultados obtenidos para *B. cinerea* de acuerdo a las concentraciones utilizadas siendo la del 1 % la que presentó mayor inhibición no hubo diferencias significativas entre el 0.25 y el 0.5%.

Tabla 16. Medias expresadas en cm del crecimiento de *B. cinerea* de acuerdo a concentraciones evaluadas de cada extracto.

Concentración (%)	Media (cm)	Repetición	Agrupamiento Tukey (0.05)
0.25	7.24 ± 0.11	75	A
0.5	7.14 ± 0.12	75	A

1	6.38 ± 0.24	75	B
---	-------------	----	---

Los resultados obtenidos en el análisis según el tipo de solvente, indica que, el etanol presentó mejor inhibición del hongo *B. cinerea* en comparación con acetato de etilo y agua (Tabla 17).

Tabla 17. Medias expresadas en cm del crecimiento de *B. cinerea* de acuerdo al tipo de solvente utilizado para la obtención de extracto.

Solvente	Nombres	Media (cm)	Repetición	Agrupamiento Tukey (0.05)
Ac	Acetato de etilo	6.97 ± 0.23	75	A
Ag	Agua	7.08 ± 0.12	75	A
Et	Etanol	6.71 ± 0.15	75	b

### 6.3 Segunda evaluación *in vitro* de extractos botánicos contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*

De acuerdo al análisis de varianza expresado en la Tabla 18 de 13 extractos vegetales para el control de *B. cinerea*, se encontró que existen diferencias altamente significativas entre el tipo de extracto (tratamiento), solvente y concentración utilizada.

Tabla 18. Análisis de varianza de los tratamientos evaluados contra *Botrytis cinerea*.

	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr(>F)
Tratamiento	13	892.03	68.618	266.404	< 2.2e-16 ***
Concentración	1	21.84	21.843	84.806	2.21e-15 ***
Tratamiento: Concentración	13	45.13	3.472	13.479	< 2.2e-16 ***
Residual	112	28.85	0.258		

Códigos de significancia: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

Los resultados obtenidos y expresados en la Tabla 19 muestran cual es el mejor tratamiento contra *B. cinerea* de la segunda evaluación de extractos; siendo la canela comercial, orégano comercial y terpenos comerciales los que presentaron una inhibición del 100% (Figura 26,27 y 28). Se puede destacar, que la gobernadora tiene un porcentaje de inhibición del 59 % en comparación con el testigo (Figura 25). La cáscara

de nuez favoreció el crecimiento del hongo con un incremento del 10% respecto al testigo.

Tabla 19. Valores de media expresado en cm del crecimiento de *Botrytis cinerea* ± error estándar.

Nombre	Diámetro en (cm)	Repeticiones	Agrupamiento Tukey 0.05
Cascara de nuez	<u>7.27 ± 0.22</u>	10	a
Oleorresinas	<u>6.67 ± 0.14</u>	10	ab
Test	<u>6.40 ± 0.16</u>	10	ab
Rosa de castilla	<u>6.26 ± 0.36</u>	10	bc
Hierbabuena	<u>6.40 ± 0.12</u>	10	bc
Equinácea	<u>5.74 ± 0.19</u>	10	cd
Propóleo	<u>5.15 ± 0.19</u>	10	d
Santa Isabel	<u>5.37 ± 0.70</u>	10	d
Tepezcohuite	<u>4.26 ± 0.28</u>	10	e
Árnica morada	<u>4.23 ± 0.34</u>	10	e
Gobernadora	<u>2.66 ± 0.21</u>	10	f
Canela comercial	<u>0.0 ± 0.0</u>	10	g
Orégano comercial	<u>0.00 ± 0.00</u>	10	g
Terpenos	<u>0.00 ± 0.00</u>	10	g

En la Figura 24 se observan la disminución del crecimiento radial del hongo de manera grafica.

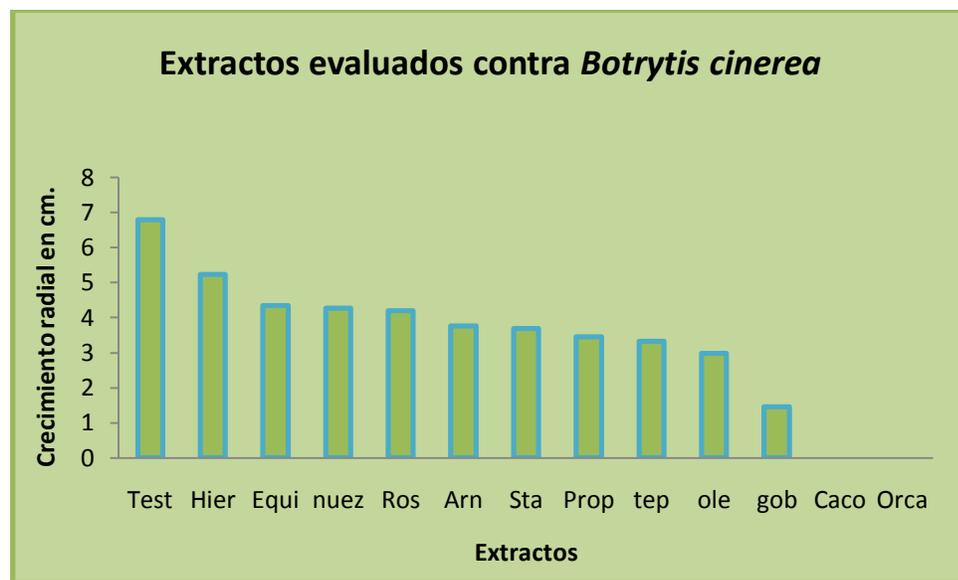


Figura 24. Extractos evaluados contra *Botrytis cinerea*.

Nuez=Cáscara de nuez, Ole=oleorresinas, Hier=Hierbabuena, Ros=Rosa de castilla, Equi=Equinácea, San=Santa Isabel, Prop=Propóleo, Tep=Tepezcohuite, Arn=Árnica morada, Gob=Gobernadora, Caco=Canela comercial, Orco=Orégano comercial, Terp=Terpenos.



Figura 25. Inhibición de *Botrytis cinerea* con gobernadora.



Figura 26. Canela comercial al 1 y 2% contra de *Botrytis cinerea*.



Figura 27. Orégano comercial al 1 y 2% contra de *Botrytis cinerea*.



Figura 28. Terpenos de cítricos al 1 y 2% contra de *Botrytis cinerea*.

Tabla 20. Crecimiento radial expresado en centímetros de *Botrytis cinerea* de acuerdo a la concentración utilizada.

Concentración	Diámetro en (cm)	Repeticiones	Agrupamiento Tukey
1%	4.71 ± 0.33	70	a
2%	3.92 ± 0.29	70	b

La Tabla 20 muestra el análisis estadístico de acuerdo a la concentración utilizada en el desarrollo de *B. cinerea* donde se encontró que la concentración del 2% fue más efectiva contra el hongo mencionado con un 16.7 % más que la del 1%.

Tabla 21. Análisis de varianza de extractos evaluados contra *Penicillium expansum*

	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr(>F)
Tratamiento	13	553.38	42.568	77.8307	< 2.2e-16 ***
Concentración	1	0.19	0.186	0.3397	0.5612
Tratamiento: Concentración	13	26.00	2.000	3.6561	7.946e-05 ***
Residual	112	61.26	0.547		

Códigos de significancia: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 '.' 1

En el análisis realizado para el diámetro expresado en cm contra el hongo *P. expansum* podemos apreciar que la canela comercial, orégano comercial y terpenos comerciales son los que presentan una inhibición del 100% comparado con los otros tratamientos (Tabla 22, Figura 30, 31 y 32).

Tabla 22. Valores de media expresados en cm del crecimiento de *Penicillium expansum*

± error estándar.

Nombre	Diámetro en (cm)	Repeticiones	Agrupamiento Tukey (0.05)
Testigo	6.92 ± 0.32	10	a
Hierbabuena	5.23 ± 0.34	10	b
Equinacea	4.35 ± 0.22	10	bc
Cascara de nuez	4.27 ± 0.23	10	bc
Rosa de castilla	4.20 ± 0.33	10	bc
Árnica morada	3.77 ± 0.26	10	cd
Santa Isabel	3.70 ± 0.58	10	cd
Propóleo	3.46 ± 0.17	10	cd
Tepezcohuite	3.33 ± 0.37	10	cd
Oleorresinas	2.98 ± 0.42	10	d
Gobernadora	1.46 ± 0.21	10	e
Tepezcohuite	3.6 ± 0.23	10	cd
Terpenos	0.0 ± 0.0	10	f

Canela comercial	0.0 ± 0.0	10	f
Orégano comercial	<u>0.0</u> ± 0.0	10	f

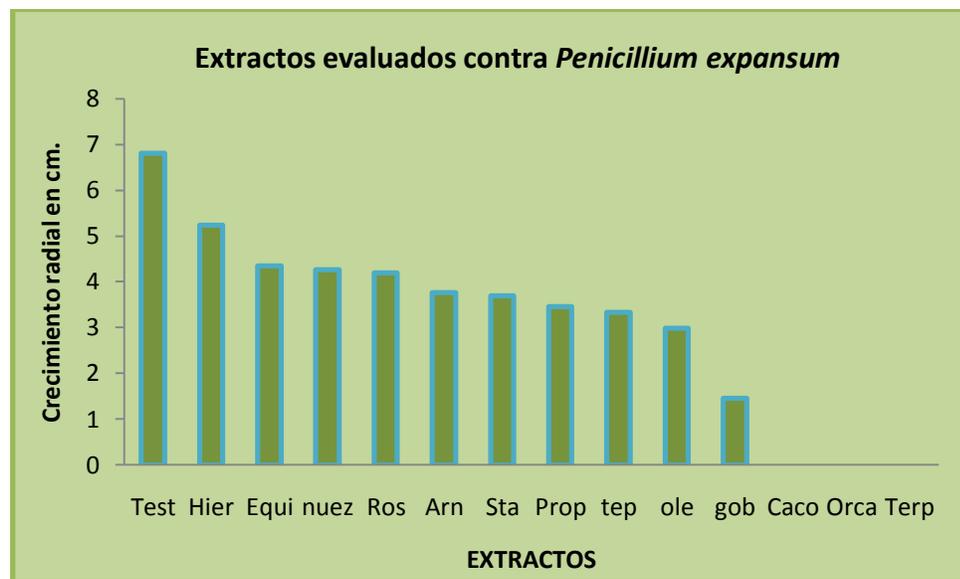


Figura 29. Extractos evaluados contra *Penicillium expansum* segunda evaluación.

Test=Testigo, Hier=Hierbabuena, Equi=Equinácea, Nuez=Cáscara de nuez, Ros=Rosa de castilla, Prop=Propóleo, Tep=Tepozcouhte, Ole=Oleorecinas, Gob=Gobernadora, Caco=Canela comercial, Orco=Orégano comercial, Terp=Terpenos.

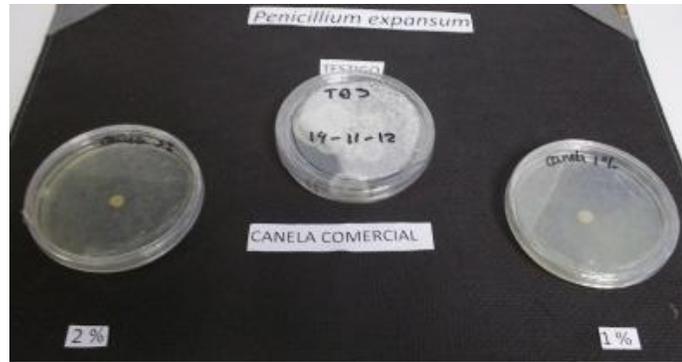


Figura 30. Extracto de Canela al 1 y 2% contra *Penicillium expansum*

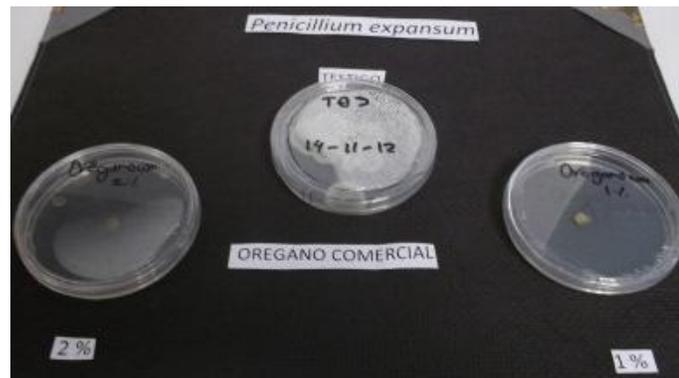


Figura 31. Extracto de Orégano al 1 y 2% contra *Penicillium expansum*



Figura 32. Extracto de Terpenos comerciales al 1 y 2% contra *Penicillium expansum*

El análisis de varianza respecto a la concentración utilizada indicó que no existen diferencias significativas entre ambas concentraciones, los mejores resultados se obtuvieron con canela, orégano y terpenos los cuales coinciden con lo reportado por diversos autores (Tabla 3).

**6.4. Concentración mínima inhibitoria de los extractos de canela comercial, orégano comercial y terpenos comerciales en el desarrollo de *P. expansum* y *B. cinerea*.**

La Tabla 23 muestra el análisis de acuerdo a la concentración mínima inhibitoria realizada de los extractos que presentaron mejor inhibición de los hongos *P. expansum* y *B. cinerea* de la segunda evaluación *in vitro* (canela, orégano y terpenos comerciales) donde se observó que los extractos mencionados a una concentración del 1% inhibieron totalmente el desarrollo de los hongos; en base a esto se abrió una ventana biológica evaluando 0.1, 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8 %.

La Tabla 23 muestra que existen diferencias altamente significativas entre concentración, y tratamiento (extractos) para el control de los hongos postcosecha.

Tabla 23. Valores de media expresados en cm del crecimiento de *Penicillium expansum* ± error estándar de la concentración mínima inhibitoria.

	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr(>F)
Tratamiento	2	31.058	15.52	210.60	<2.2e-16***
Concentración	4	53.41	13.35	181.112	<2.2e-16***
Tratamiento: Concentración	8	31.46	3.93	53.349	<2.2e-16***
Residual	60	4.424	0.073		

Códigos de significancia: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

De acuerdo a la Tabla 24, se observa que, el orégano comercial inhibió por completo el crecimiento del patógeno siendo estadísticamente diferente de la canela y los terpenos.

Tabla 24. Media del crecimiento radial en cm para los 3 extractos evaluados contra *P. expansum*

Extracto	Diámetro en cm.	Repetición	Grupo
Canela	2.45 ± 0.35	25	a
Terpenos	1.84 ± 0.15	25	b
Orégano	0.88 ± 0.04	25	c

En la Tabla 25 podemos observar el análisis realizado para la concentración utilizada; indicando que no hay diferencia significativa entre la concentración del 0.6 y 0.8%; sin embargo, en la Tabla 26 podemos observar el análisis de la interacción de los extractos y concentración donde el orégano desde la concentración del 0.2% mostró inhibición del 100 % en comparación con canela y los terpenos al 0.6% y 0.8% respectivamente. Con estos resultados podemos concluir que el orégano al 0.2 % es el mejor tratamiento para el control de *P. expansum* (Figura 35) con lo cual favorece el ahorro en el aspecto económico y en el ecológico en la utilización mínima de extracto.

Tabla 25. Media expresada en cm del crecimiento radial del hongo *P. expansum* de acuerdo a la Concentración utilizada.

Concentración	Diámetro en cm.	Repetición	Grupo
0.1	3.02 ± 0.40	15	a
0.2	2.39 ± 0.36	15	b
0.4	1.37 ± 0.120	15	c
0.6	0.93 ± 0.05	15	d
0.8	0.90 ± 0.04	15	d

Tabla 26. Medias en cm del desarrollo de *P. expansum* de acuerdo a la interacción de extracto y concentración

Grupo	Extracto y/o concentración	Media en cm
a	0.1: Canela	4.88
b	0.2: Canela	4.02
c	0.1 :Terpenos	2.96
cd	0.2 :Terpenos	2.36
de	0.4 :Canela	1.76

ef	0.4 :Terpenos	1.56
efg	0.1:Orégano	1.24
efg	0.6:Terpenos	1.20
fg	0.8 :Terpenos	1.12
g	0.2 :Orégano	0.8
g	0.4:Orégano	0.8
g	0.6 :Canela	0.8
g	0.6 :Orégano	0.8
g	0.8 :Canela	0.8
g	0.8 :Orégano	0.8

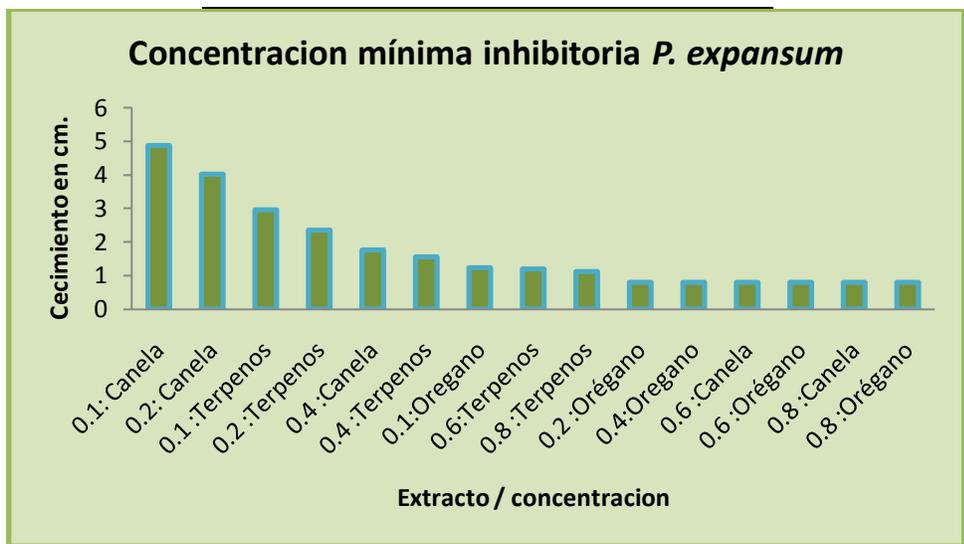


Figura 33. Inhibición del hongo *P. expansum* de acuerdo a extracto y concentración.

En la Figura 34 observamos que canela al 0.6 % presenta una inhibición del 100 % en comparación al testigo.

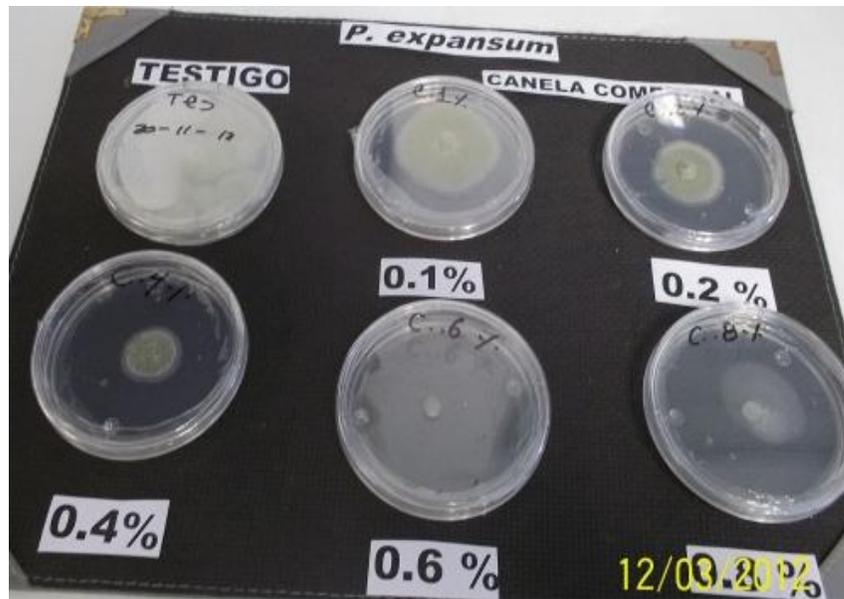


Figura 34. Inhibición de *P. expansum* utilizando canela como extracto.

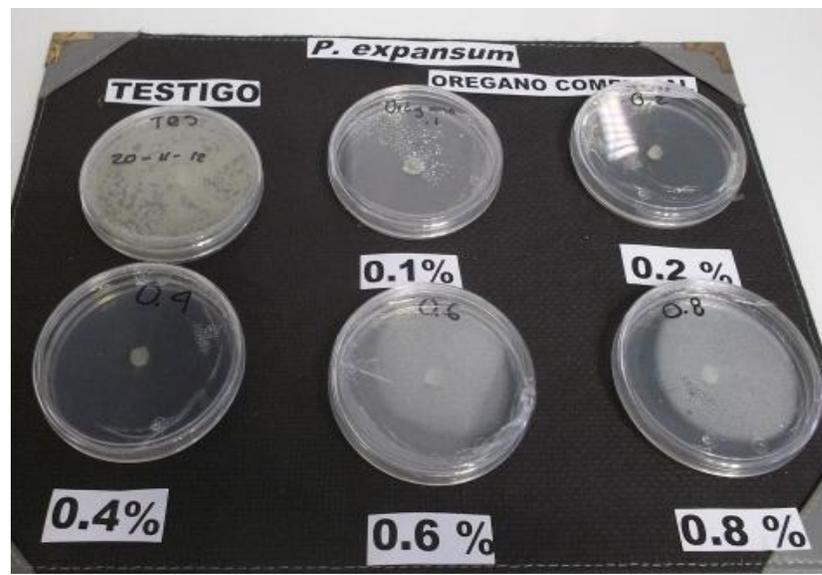


Figura 35. Inhibición de *P. expansum* utilizando orégano como extracto.

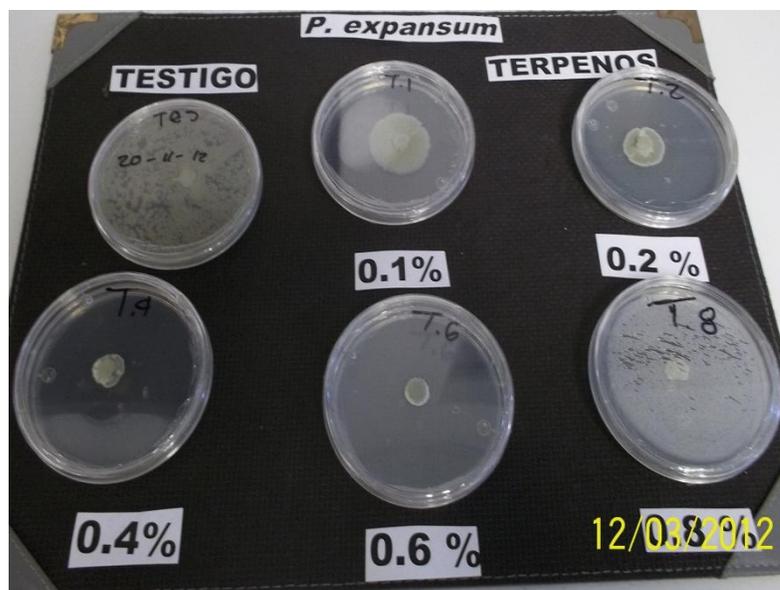


Figura 36. Inhibición de *P. expansum* utilizando terpenos como extracto.

En la Tabla 27 observamos el análisis de varianza para *B. cinerea* donde indica que existen diferencias altamente significativas entre tratamiento y concentración utilizada.

Tabla 27. Análisis de varianza para *Botrytis cinerea*

	Grados de libertad	Suma de Cuadrados	Cuadrados medios	Valor F	Pr(>F)
Tratamiento	2	17.96	8.98	6.85	0.00**
Residuales	4	51.21	12.80	9.76	3.745e-06***
Tratamiento : concentración	8	52.19	6.52	4.97	9.368e-05***
Residual	60	78.63	1.31		

Códigos de significancia: 0 '\*\*\*' 0.001 '\*\*' 0.01 '\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

En la Tabla 28 se muestra que el orégano es el extracto que presenta mayor inhibición de los tres extractos evaluados; sin embargo, no es estadísticamente diferente a los terpenos comerciales.

Tabla 28. Crecimiento radial del hongo de acuerdo al extracto evaluado

Extracto	Diámetro en cm	Repetición	Grupo
Canela	2.06 ± 0.52	25	a
Terpenos	1.40 ± 0.15	25	ab
Orégano	0.87 ± 0.07	25	b

Para el caso de *B. cinerea*, la concentración del 0.2% es la más efectiva (Tabla 29) pues no existen diferencias significativas entre las concentraciones del 0.2, 0.4, 0.6 y 0.8%

Tabla 29. Crecimiento radial del hongo de acuerdo a la concentración utilizada.

Concentración	Diámetro en cm	Repetición	Grupo
0.1	3.00 ± 0.69	15	a
0.2	1.54 ± 0.45	15	b
0.4	0.80 ± 0.0	15	b
0.6	0.80 ± 0.0	15	b
0.8	1.08 ± 0.15	15	b

En la Tabla 30 se observa el agrupamiento estadístico de la interacción de extractos y concentraciones, donde se observa que de todos los tratamientos, solo la canela al 0.1 % es diferente en comparación con las demás concentraciones. Esto indica que tanto los terpenos como el orégano son efectivos a la concentración más baja para el control de *Botrytis cinerea* y la canela comercial desde la concentración del 0.2%. (Figura 38). En la Figura 37 observamos el comportamiento de manera gráfica de la interacción de los extractos con su concentración.

Tabla 30. Medias en cm del crecimiento radial de *B. cinerea* de acuerdo a la interacción extracto y concentración.

Grupo	Extracto y/o concentración	Media en cm
a	0.1:Canela	5.8
b	0.1:Terpenos	2.42
b	0.2 : Canela	2.14
b	0.8:Terpenos	1.64
b	0.2Terpeno :	1.34
b	0.2:Orégano	1.16
b	0.1:Orégano	0.8
b	0.4:Canela	0.8
b	0.4:Orégano	0.8
b	0.4:Terpenos	0.8
b	0.6:Canela	0.8
b	0.6:Orégano	0.8
b	0.6: Terpenos	0.8
b	0.8:Canela	0.8
b	0.8:Orégano	0.8

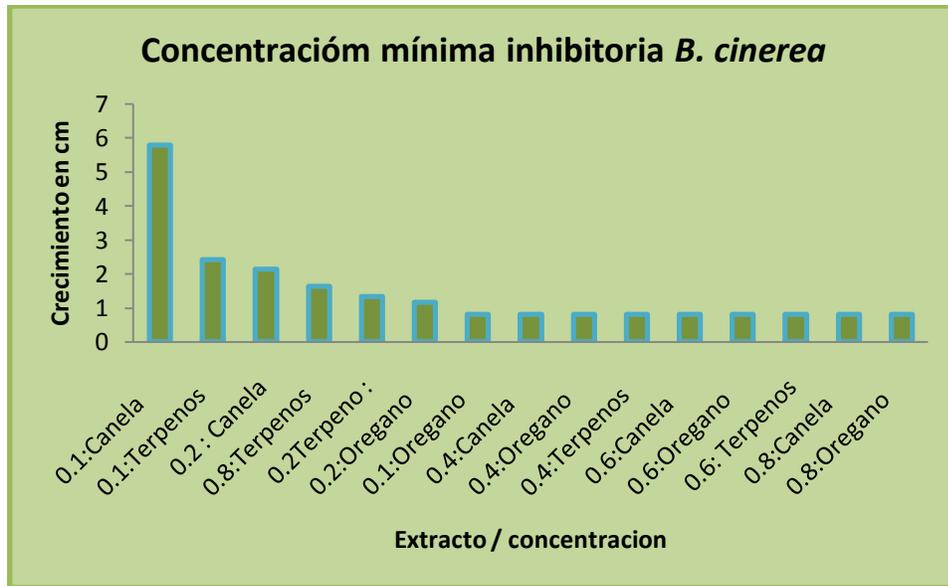


Figura 37. Interacción extracto y concentración en el crecimiento de *B. cinerea*.

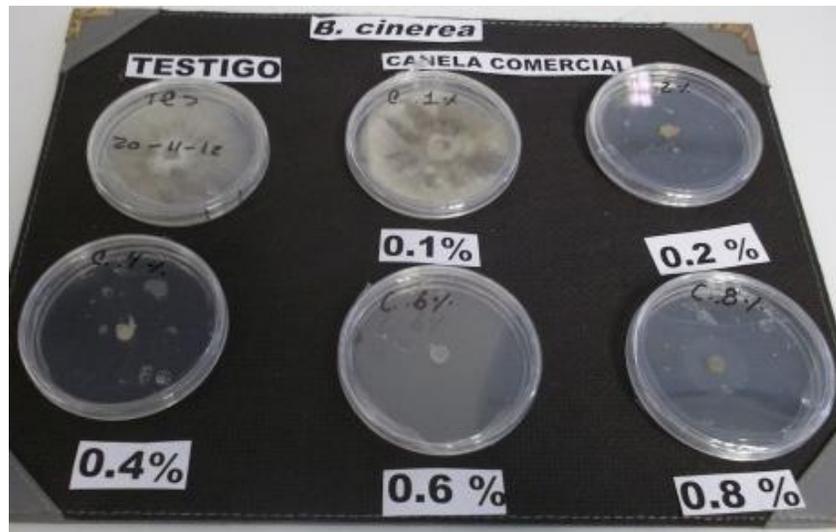


Figura 38. Inhibición de *B. cinerea* utilizando canela comercial a diferentes concentraciones en comparación al testigo.

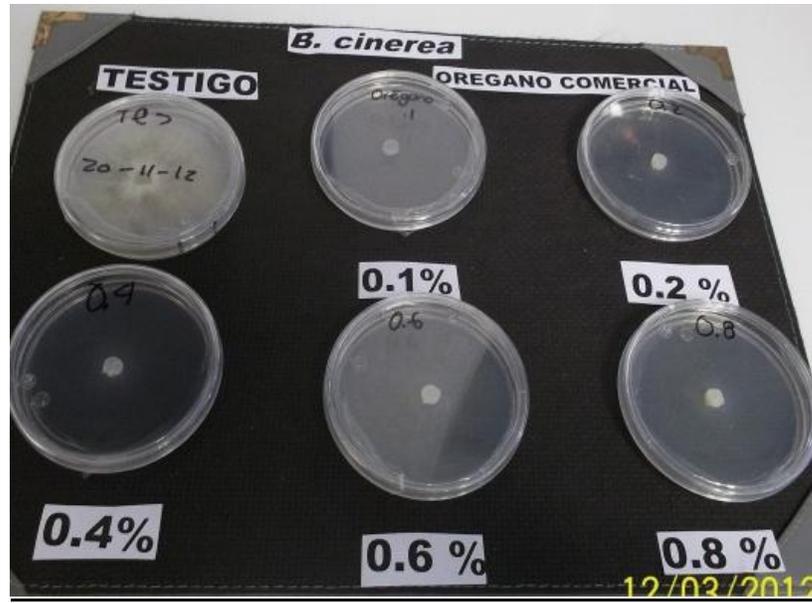


Figura 39. Inhibición de *B.cinerea* utilizando orégano como extracto.

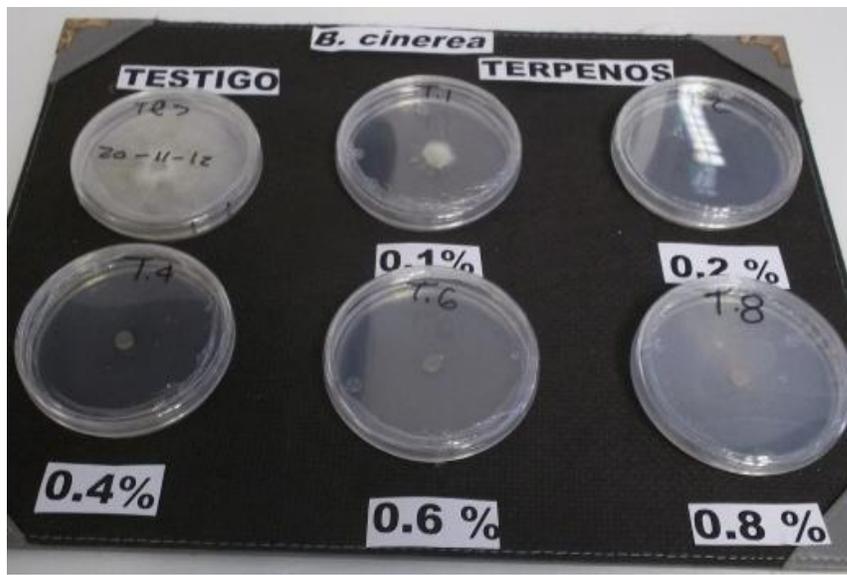


Figura 40. Inhibición de *B. cinerea* utilizando terpenos como extracto.

## VII. CONCLUSIONES

- 1- De las manzanas colectadas en huertas, y monitoreadas por dos meses se encontró que las refrigeradas a 4 ° C no presentaron ningún crecimiento fungoso.
- 2- De las muestras de cámara húmeda se observó que las de la huerta 3 fueron las más afectadas al presentar pudrición de hasta un 70 % en los frutos.
- 3- De los aislamientos realizados de los frutos colectados en huerta, se encontró una gran cantidad de hongos y bacterias, de los cuales *Botrytis cinerea* no pudo aislarse de manera pura por lo cual se recurrió a frutos de fresa contaminados por dicho patógeno.
- 4- Se logró aislar *Penicillium italicum* de manzana sin embargo para fines del estudio se recurrió a trabajar con *Penicillium expansum* proporcionada por el CISEF.
- 5- Los extractos obtenidos por el método soxhlet no resultaron efectivos contra *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum* mostrando como máximo una inhibición del 13%. No se encontró el efecto deseado y reportado por otros autores debido a un posible error en el método de extracción y mal manejo de los extractos.
- 6- El extracto etanólico de gobernadora al 1% presentó un 65.9% de inhibición para *P. expansum* y de 0% para *B. cinerea*.
- 7- Los metabolitos secundarios de *Bacillus* y *Trichoderma* no presentaron inhibición sobre los hongos patógenos. Además se encontró que estos incrementaron el desarrollo del hongo hasta en un 18%.
- 8- Para la segunda evaluación, los extractos de oleorresinas, tepezcohuite, rosa de castilla y santa Isabel favorecieron el crecimiento de los hongos evaluados principalmente en *B. cinerea* hasta un 10 % en comparación al testigo. Para el caso de orégano y canela comercial al igual que terpenos mostraron una inhibición favorable del 100% desde la concentración del 1 % la cual sirvió de margen para abrir ventana biológica para conocer la concentración mínima inhibitoria.

- 9- Se encontró que el orégano comercial presentó inhibición del 100% desde la concentración de 0.2% para *P. expansum* y *B. cinerea*; en el caso de canela y terpenos se observó que a partir de la concentración de 0.4 % inhibieron el desarrollo de ambos patógenos.

## VIII LITERATURA CITADA

AlayónLuaces, Paula - Rodríguez, Víctor A. - Bertuzzi, Silvia M. 2004. El cultivo del manzano (*Malus domestica* Borkh.) en Corrientes. Primer año de investigación. UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE Comunicaciones Científicas y Tecnológicas. <http://www.unne.edu.ar/unnevieja/Web/cyt/com2004/5-Agrarias/A-029.pdf>(Octubre, 2012).

Albado E, Saez G, Grabiél S. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial del *Origanum vulgare* (orégano). *Rev Med Hered.* 2001; 12: 17-19

Alexopoulos C. J., Mims C. W. y Blackwell M. 1996. *Introductory Micology*. John Wiley & Sons. 4a edición.

Bruneton, J. (2001). *Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales*. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A.

Contreras M. 2012. Terpenos <http://apuntesdebioquimica.tripod.com/botanica/id8.html>

Cosme. Pérez I. 2008. Efectos antifúngicos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición in vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Revista intercultural*; Volumen 36 pp. 1-3.

Fajardo et al, 2006. Influencia del crecimiento de *Bacillus subtilis* conteniendo varias copias del gen *vgb* de *Vitrioscillaster coraria* a diferentes concentraciones de oxígeno y diferentes presiones.

[http://catarina.udlap.mx/u\\_dl\\_a/tales/documentos/lbi/sanchez\\_q\\_a/capitulo7.pdf](http://catarina.udlap.mx/u_dl_a/tales/documentos/lbi/sanchez_q_a/capitulo7.pdf)

(Noviembre, 2012).

FAO. 2000 <http://www.fao.org/docrep/004/y1669s/y1669s0h.htm> (Octubre 2012).

FAO. 2008

[http://www.chilealimentos.com/medios/Servicios/noticiero/EstudioMercadoCoyuntura2011/Frutas\\_Hortalizas/Mercado\\_manzana.pdf](http://www.chilealimentos.com/medios/Servicios/noticiero/EstudioMercadoCoyuntura2011/Frutas_Hortalizas/Mercado_manzana.pdf) (Octubre 2012).

García Luján, Concepción; Martínez R., Aurora; Ortega S., José Luis; Castro B., Fernando. 2010. Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales *Química Viva*, vol. 9, núm. 2, agosto, 2010, pp. 86-96 Universidad de Buenos Aires Argentina.

De la Cerda Suárez P. C. 2012 Caracterización y aprovechamiento del residuo del tallado de *Agave lechuguilla* Torrey (guishe). Tesis de licenciatura. Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

George N. Agrios. 2006. Fitopatología 2ª edición Editorial LIMUSA p 454, 460, 464 y 467.

Gonzales F. Paulina. 2011. Tesis de maestría Colegio de Posgraduados Control postcosecha de *Penicillium digitatum* en frutos de naranja.

González Nelbuby MsC. Unersur. 2004. Manual de plantas medicinales Pp. 3-4.

Gordillo Meza Oscar. 2004. Inhibición in Vitro del Crecimiento Micelial de la Enfermedad Moho Gris (*Botrytis cinerea*) por Tres Diferentes Extractos Hidrosolubles de Gobernadora [*Larrea tridentata* (D.C.) Coville] Tesis de licenciatura Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro.

Guédez. Clemencia, Luis Cañizález, Carmen Castilloa y Rafael Olivar. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* spp). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología, vol. 29, núm. 1, enero-junio, 2009, pp. 34-38 Sociedad Venezolana de Microbiología Caracas, Venezuela

Hall Ramírez, V. Rocha, Palma, M. 2002. 30 Plantas medicinales volumen II centro Nacional de Información de Medicina. Centro Internacional de Medicamentos pp 3-18-78

Hernández, L.A.N., Bautista, B.S. y Velazquez, del V.M. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. Revista Fitotecnia Mexicana, abril-junio, año 2007/vol. 30, numero 002. Sociedad Mexicana de Fitogenética, A.C. Chapingo, México. pp. 119-123.

[http://www.fhia.org.hn/downloads/proteccion\\_veg\\_pdfs/hojatecnica1detrrioroposcosecha%20.pdf](http://www.fhia.org.hn/downloads/proteccion_veg_pdfs/hojatecnica1detrrioroposcosecha%20.pdf) (Septiembre 2012).

Lira-Saldívar, R.H; Sanchez, M.R; Gamboa, R; Jasso. D; Rodríguez, R., 2003. "Fungitoxic effect of *Larrea tridentata* resin extracts from the Chihuahua and Sonora deserts on *Alternaria solani*". *Agrochimica*, 47: 50-60.

Martínez M., 2001., aceites esenciales Universidad de Antioquia <http://farmacia.udea.edu.co/~ff/esencias2001b.pdf> (Noviembre del 2012).

Memenza Zegarra M. C. 2009 control biológico in vitro de *Botrytis cinerea* (pers) mediante el uso de hongos antagonistas in vitro (*Vitis vinifera*). Tesis doctoral Universidad Nacional Autónoma La Molina.

Michel Aceves A. C. 2001 cepas nativas de *Trichoderma* spp. *Eurocomycetes* hipocreas su antibiosis y micoparasitismo sobre *Fusarium subglutinans* y *Fusarium*

oxisporumhiphomyceshyphakes. Ppp 52-53 Tesis de doctorado en la Universidad de Colima

Mondino. P. 2012. Enfermedades fúngicas del manzano [http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Penicillium\\_exp.html](http://www.pv.fagro.edu.uy/fitopato/enfermedades/Penicillium_exp.html) (Noviembre 2012).

Montealegre, J., P. Venegas y R Herrera, 2004 Etiología de la pudrición negra del manzano. XIV CONGRESO NACIONAL DE FITOPATOLOGÍA RESÚMENES – POSTERS Facultad de Ciencias Agrarias Universidad de Talca 30 de Noviembre al 03 de Diciembre TALCA - VII REGIÓN – CHILE.

<http://www.fitopatologiachile.cl/trabajos02/XIV.html> (Noviembre, 2012).

Morales, L. (1997). Evaluación del potencial insecticida de cinco especies forestales. Tesis (Maestría en Entomología, Ingeniería Forestal), Universidad Nacional de Colombia sede Medellín. p. 5-7, 11-16, 34-36.

Moreno-Limón S. Gonzáles-Solís L.N. Salcedo-Martínez S.M. 2011. Núm 32, pp. 193-205, ISSN 1405-2768; México. <http://www.herbario.encb.ipn.mx/pb/pdf/pb34/efec.pdf> (Noviembre, 2012).

Muños Fernando. 2002. Ediciones mundi-prensa cuarta reimpresión, plantas medicinales y aromáticas. [http://redbiblio.unne.edu.ar/pdf/0603-003080\\_I.pdf](http://redbiblio.unne.edu.ar/pdf/0603-003080_I.pdf)(Octubre, 2012).

Navarro J. 2001. Guía de las frutas cultivadas Edición Mundi- prensa. pp. 136

Philbrick, J. & Helen, P. (1984). El libro de los insectos, control inofensivo de los insectos. 3ra ed. México. 119 p.

Picha H. David mayo del 2004. Manejo postcosecha y análisis de empaque de productos frescos y recomendaciones para mejorar el diseño de la línea de empaque. [http://pdf.usaid.gov/pdf\\_docs/PNACY607.pdf](http://pdf.usaid.gov/pdf_docs/PNACY607.pdf) (Septiembre, 2012).

Pinilla B. y Álvarez M. 1998. Pudriciones en cámaras frigoríficas. Rev. Tierra Adentro 22: 10-13.

Pinilla B., Álvarez M. y Villafranca J. 1998. Efecto de tratamientos por hidrocooler sobre la incidencia de la pudrición calicinal causada por *Botrytis cinerea* en manzanas. En: actas curso Chileno de Manzana. Centro de pomáceas y Soc. Chilena de fruticultura: 109-115.

Pinilla, B y M. Álvarez. 2001. Estudios epidemiológicos de la “podrición calicinal” de las pomáceas causada por *Botrytis cinerea*. Resúmenes de trabajo presentado en el XI Congreso SOCHIFIT. Disponibles <http://www.fitopatogiachile.cl/publicaciones.html>. (Noviembre, 2012).

Ranasinghe, L.S., Bimali, J. y Krishanthi, A. (2003). Use of waste generated from cinnamon bark oil (*Cinnamomum zeylanicum*) extraction as a post Harvest treatment for Embul banana. *Journal of Food, Agriculture and Environment* 1 (2): 340-344.

Rivera C. 2008. Deterioro postcosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias. Fundación Hondureña de Investigación Agrícola Departamento de protección vegetal, hoja técnica No. 1.

Rodríguez, Aida T.; Morales, Daysi; Ramírez, M. A. Efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento in vitro de hongos fitopatógenos *Cultivos Tropicales*, vol. 21, núm. 2, abril-junio, 2000, pp. 79-82 Instituto Nacional de Ciencias Agrícolas (INCA) La Habana, Cuba.

Rodríguez *et al* 2003. Estudio de estabilidad en extractos *Cymbopogon citratus*.

Ruiz P. 2012 terpenos <http://www.plantas-medicinal-farmacognosia.com/temas/aceites-esenciales/terpenos/> (Noviembre del 2012).

SAGARPA. 2010 <http://www.sagarpa.gob.mx/Paginas/default.aspx> (Octubre del 2012).

Sánchez O. M. R. 2002. Acción Antifúngica in vitro sobre *Alternaria solani* de Cuatro Extractos Hidrosolubles de *Larrea tridentata* de los Desiertos Chihuahuense y Sonorense. Universidad Autónoma de Coahuila. Tesis de Licenciatura. Saltillo Coahuila, México. 39 p.

Sholberg, P.L. y Haag, P.D. 1996. Incidence of postharvest pathogens of stored apples in British Columbia. *Can. J. Plant Pathol.* 18, 81-85.

SIAP. 2010. Producción Agrícola. Ciclo: Cíclicos y Perennes. 2010. Modalidad: Riego + Temporal. <http://www.siap.gob.mx> (Septiembre del 2012).

Soto Alvear Sylvana de los Ángeles. 2003. Evaluación de la aplicación en poscosecha del fungicida “pyrimethanil” viatermonebulización en el control de *B. cinerea* en manzanas.

Soto-Muñoz L; R. A. Martínez-Peniche, 2009. Efecto de levaduras antagónicas y bicarbonato de sodio sobre *P. expansum* en dos variedades de manzana. *Revista Chapingo. Serie horticultura*, Vol. 15, , pp. 211-216 Universidad Autónoma Chapingo México

Spadaro, D. y Guillino, M.L. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology* 91(2), 185–194.

Tequida-Meneses, M. Cortez-Rocha M. Rosas- Burgos E. López-Sandoval S. y Corrales- C.Maldonado. 2002 Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*. *Revista Iberoamericana de Micología Apdo.* 699.

Van de Braak S.A. and Leijten G.C.J.J. 1999. *Essential Oils and Oleoresins: A Survey in the Netherlands and other Major Markets in the European Union*. CBI, Centre for the Promotion of Imports from Developing Countries, Rotterdam, p. 116.

Viveros Folleco J. Jairo Castaño Zapata, 2006 EVALUACIÓN IN VITRO DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE *Mycosphaerella fijiensis* MORELET *Revista Científica de Agronomía Volumen 14 Núm. 1*.

Vázquez, Contreras E. 2003 Terpenos. Universidad Nacional Autónoma de México UNAM <http://laguna.fmedic.unam.mx/~evazquez/0403/terpenos.html>( Noviembre 2012).

Webster J. 1986. *Introduction to Fungi*. 2<sup>o</sup> ed. Cambridge University Press. pp. 58 72 (Noviembre del 2012).

Yanishlieva, N.V., E. Marinova and J. Pokorny. 2006. Natural antioxidants from herbs and spices. *European Journal of Lipid Science and Technology*. 108(9):776-793.