

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA



Efecto Inhibitorio *in vitro* de Aceites Esenciales Contra Oomicetos de Importancia Económica que Afectan el Cultivo del Aguacate

Por:

**RAMIRO GÓMEZ AYALA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2018

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

DIVISIÓN DE AGRONOMÍA

DEPARTAMENTO DE PARASITOLOGÍA

Efecto Inhibitorio *in vitro* de Aceites Esenciales Contra Oomicetos de Importancia Económica que Afectan el Cultivo del Aguacate

Por:

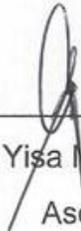
**RAMIRO GÓMEZ AYALA**

TESIS

Presentada como requisito parcial para obtener el título de:

**INGENIERO AGRÓNOMO PARASITÓLOGO**

Aprobada por el Comité de Asesoría:



Dra. Yisa María Ochoa Fuentes

Asesor Principal



Dr. Ernesto Cerna Chávez

Coasesor



M.C. Anselmo Hernández Pérez

Coasesor



Dr. Gabriel Gallegos Morales

Coordinador de la División de Agronomía



Coordinación  
División de Agronomía

Saltillo, Coahuila, México

Mayo, 2018

## AGRADECIMIENTOS

A **Dios**, por darme la oportunidad de vivir, por darme las fuerzas para continuar y seguir adelante. Por cuidar de mí y mi familia durante el tiempo que estuve lejos de casa. Gracias porque hasta ahora todo ha salido como lo había planificado, porque sigo con mi familia unida y porque a donde vaya sé que siempre contaré con su protección y con su ayuda.

A mi querida **Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro**, por darme la oportunidad de ser parte de ella y darme los conocimientos necesarios para formar una carrera profesional.

A la **Dra. Yisa Maria Ochoa Fuentes** por el apoyo brindado, por sus consejos y darme la oportunidad de realizar esta investigación.

Al **M.C. Anselmo Hernández Pérez** por darme la confianza para ser parte de este proyecto, por las enseñanzas y conocimientos compartidos, además de brindarme su amistad.

Al **Dr. Juan Carlos Delgado Ortiz** por el apoyo brindado en la realización de este proyecto.

Al **Dr. Omegar Hernández Bautista** por el apoyo brindado en la realización de este proyecto.

A mis compañeros de la **Generación CXXIV** sin excluir a ninguno, porque con ustedes viví grandes momentos dentro y fuera de la universidad que jamás olvidaré.

## DEDICATORIA

### **A mis padres**

#### **Marcos B. Gómez Álvarez y Ernestina M. Ayala Salgado**

Por brindarme su amor, comprensión, apoyo incondicional y porque nunca me han dejado sólo cuando los necesito. Por el sacrificio realizado para que yo pudiera cumplir esta meta. Gracias por creer en mí, los amo, son mi orgullo y mi fuerza para seguir adelante.

### **A mis hermanos**

**Margarita Gómez Ayala, Mariela Gómez Ayala, José Alberto Gómez Ayala**, por todo lo que hemos vivido, gracias por el apoyo incondicional y creer en mí.

### **A mis amigos**

**Joel Calixto Vázquez Gómez, Avimael Santos Cruz, Enrique Robles Hernández, Micaela Melgar Rodríguez, Raquel Fajardo Peregrina, Daniela Tapia Rodríguez**. Por su valiosa amistad que nunca me ha faltado y con quienes he vivido grandes experiencias.

## INDICE GENERAL

AGRADECIMIENTOS .....	i
DEDICATORIA.....	ii
ÍNDICE DE CUADROS .....	vi
ÍNDICE DE FIGURAS .....	vii
RESUMEN .....	viii
INTRODUCCIÓN .....	1
Objetivos.....	3
Objetivo general .....	3
Objetivo específico .....	3
Hipótesis .....	3
REVISIÓN DE LITERATURA.....	4
Historia y Origen del Aguacate .....	4
Clasificación taxonómica Fersini (1975). .....	4
Condiciones Agroecológicas.....	5
Producción.....	6
Nivel mundial .....	6
Nivel nacional .....	7
Importancia Económica .....	8
Enfermedades del Aguacate.....	9
Oomicetos .....	9
Características morfológicas .....	10
<i>Phytophthora cinnamomi</i> Rands (tristeza del aguacatero) .....	10
Clasificación taxonómica (Agrios, 2005).....	12

Ciclo biológico .....	12
Sintomatología.....	14
Estrategias de control de <i>Phytophthora cinnamomi</i> .....	15
Control químico .....	15
Control cultural .....	15
Control biológico.....	15
<i>Phytophthora vexans</i> Lévesque y Cock .....	16
Clasificación taxonómica Lévesque y Cock (2004). .....	18
Descripción morfológica .....	18
Sintomatología.....	19
Control químico .....	19
Aceites Esenciales.....	20
Importancia de los aceites esenciales .....	20
Composición química .....	21
Aceite Esencial de Clavo ( <i>Syzygium aromaticum</i> ).....	21
Distribución.....	21
Características físicas.....	22
Composición química .....	22
Estudios de aceite esencial de clavo .....	23
Aceite Esencial de Pimenta Negra ( <i>Piper nigrum</i> ).....	24
Distribución.....	24
Características físicas.....	24
Composición química .....	25
Estudios de aceite esencial de pimienta.....	25
MATERIALES Y MÉTODOS.....	26

Ubicación del Experimento .....	26
Aislamiento del patógeno .....	26
Microorganismos evaluados .....	26
Aceites esenciales evaluados.....	27
Bioensayo. Concentraciones empleadas de los diferentes tratamientos sobre los fitopatógenos <i>P. cinnamomi</i> y <i>P. vexans</i> .....	27
Variables evaluadas .....	29
Diseño experimental.....	29
RESULTADOS Y DISCUSIONES.....	30
CONCLUSIÓN .....	38
BIBLIOGRAFÍA .....	39
ANEXOS .....	53

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Principales estados productores de aguacate en México.....	7
<b>Cuadro 2.</b> Principales municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán.....	8
<b>Cuadro 3.</b> Porcentajes de inhibición de los tratamientos evaluados. ....	30
<b>Cuadro 4.</b> Concentración efectiva media de aceites esenciales para patógenos de raíz del cultivo del aguacate.....	34
<b>Cuadro 5.</b> Análisis de varianza para el aceite esencial de clavo contra <i>P. vexans</i> . .....	34
<b>Cuadro 6.</b> Comparación de medias mediante Scheffe ( $\alpha=0.05$ ) del porcentaje de inhibición del aceite esencial de clavo contra <i>P. vexans</i> .....	35
<b>Cuadro 7.</b> Análisis de varianza para el aceite esencial de pimienta contra <i>P. vexans</i> . .....	35
<b>Cuadro 8.</b> Comparación de medias mediante Scheffe ( $\alpha=0.05$ ) del porcentaje de inhibición del aceite esencial de pimienta contra <i>P. vexans</i> .....	36
<b>Cuadro 9.</b> Análisis de varianza para el aceite esencial de clavo contra <i>P. cinnamomi</i> . .....	36
<b>Cuadro 10.</b> Comparación de medias mediante Scheffe ( $\alpha=0.05$ ) del porcentaje de inhibición del aceite esencial de clavo contra <i>P. cinnamomi</i> . ....	37

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Árbol de aguacate <i>P. americana</i> Mill. ....	5
<b>Figura 2.</b> Porcentaje de producción de aguacate por continente. ....	6
<b>Figura 3.</b> Crecimiento del oomiceto <i>P. cinnamomi</i> en medio PDA. ....	10
<b>Figura 4.</b> Ciclo biológico de <i>P. cinnamomi</i> . (Tomado de A Hardham, The Australian National University, Canberra, A.C.T.). ....	13
<b>Figura 5.</b> Árbol con sintomatología de la tristeza del aguacatero. ....	14
<b>Figura 6.</b> Crecimiento del oomiceto <i>P. vexans</i> en medio PDA. ....	17
<b>Figura 7.</b> Sintomatología causada por <i>Phytophthium vexans</i> . ....	19
<b>Figura 8.</b> Botón floral del clavo de olor. ....	22
<b>Figura 9.</b> Cultivo de pimienta negra. ....	24
<b>Figura 10.</b> Porcentaje de inhibición de <i>P. vexans</i> con aceite esencial de clavo y pimienta a diferentes concentraciones. ....	32
<b>Figura 11.</b> Porcentaje de inhibición de <i>P. cinnamomi</i> con aceite esencial de clavo a diferentes concentraciones. ....	33
<b>Figura 12.</b> Efecto inhibitorio del aceite esencial de clavo contra <i>P. vexans</i> . ....	53
<b>Figura 13.</b> Efecto inhibitorio del aceite esencial de pimienta contra <i>P. vexans</i> . ...	53
<b>Figura 14.</b> Efecto inhibitorio del aceite esencial de clavo contra <i>P. cinnamomi</i> . ..	54

## RESUMEN

México es el principal productor de aguacate a nivel mundial, siendo Michoacán el principal estado productor. La tristeza del aguacatero causada por los oomicetos *Phytophthora cinnamomi* y *Phytophthora vexans* es la enfermedad de mayor importancia a nivel mundial. En México, incluso ha ocasionado la desaparición de regiones aguacateras. El uso continuo de productos de síntesis química (agroquímicos) para el control de esta enfermedad, ha generado la resistencia de estos fitopatógenos, además de representar un gran riesgo para la salud humana y el medio ambiente. En los últimos años, una alternativa en la agricultura para el manejo de enfermedades y que presenta un crecimiento exponencial es el uso de productos orgánicos. En este sentido, los aceites esenciales son productos de origen natural (botánicos) y han mostrado tener propiedades antifúngicas. Por tal motivo, el objetivo de la presente investigación fue evaluar el efecto inhibitorio de dos aceites esenciales de: clavo (*Syzygium aromaticum*) y pimienta negra (*Piper nigrum*) sobre *P. cinnamomi* y *P. vexans* mediante la técnica del medio de cultivo envenenado. Para la obtención de los fitopatógenos se realizó un muestreo dirigido (árboles sintomáticos de la enfermedad “tristeza de aguacatero”) en huertas del municipio de Tancítaro, Michoacán y en el laboratorio de toxicología de la Universidad Autónoma Agraria se realizó el aislamiento, purificación e identificación hasta especie con claves taxonómicas. Los resultados se sometieron a un análisis Probit, se sometió a un ANOVA mediante un diseño experimental completamente al azar y se realizó la comparación de medias mediante la prueba Scheffe, el análisis de los datos fue en el programa R Studio 3.2. Los aceites esenciales de clavo y pimienta a concentraciones de 0.3 ppm lograron inhibir el crecimiento micelial en un 100% para el caso de *P. vexans*, mientras que el aceite esencial de clavo logró inhibir el 100% del crecimiento micelial de *P. cinnamomi* a una concentración de 400 ppm.

**Palabras clave:** Aguacate, aceites esenciales, efecto inhibitorio, *Phytophthora vexans*, *Phytophthora cinnamomi*.

## INTRODUCCIÓN

El cultivo de aguacate se produce a nivel mundial rondando cerca de los 4,700,000 toneladas, de las cuales el continente americano es el de mayor aportación con un 70.3% de la producción, seguido del continente africano con 15.2%, Asia contribuye con 10.9% y los continentes de menor aportación son Europa y Oceanía con 1.9% y 1.6%, respectivamente (FAOSTAT, 2013).

México tiene una enorme cultura en el cultivo, además de ser el principal consumidor y productor de aguacate en el mundo teniendo una superficie sembrada de 203,732 ha distribuidas en 28 estados de la República Mexicana, obteniendo una producción estimada de 1.5 millones de toneladas, los principales estados productores son Michoacán, Jalisco, Estado de México, Nayarit, Guerrero y Morelos, los cuales aportan el 93 % de la producción nacional (WHT y USEO, 2006; SIAP, 2016). Es de importancia señalar que en México el 49% de la producción de aguacate se destina al mercado externo alcanzando un valor anual de exportación de 1.5 mil millones de dólares (SIAP, 2014).

En el estado de Michoacán, el aguacate se encuentra establecido en una franja que abarca 30 municipios, variando en superficie plantada, los 22 municipios principales están establecidos en 94,045.09 ha y se encuentran a una altitud de 1100-2900 msnm (Lara *et al.*, 2005; SIAP, 2014). El clima del estado se caracteriza por ser templado, húmedo y sub-húmedo, temperatura media de 8-21 °C y una precipitación anual de 1200-1600 mm (APROAM, 2005).

El aguacate en los últimos años ha sido afectado por enfermedades principalmente del sistema radical, lo cual conlleva a una baja calidad y producción del fruto (Morera, 1983). De las enfermedades que dañan al cultivo destacan la pudrición de raíces conocida como “tristeza del aguacatero” causado por el oomiceto *Phytophthora cinnamomi* Rands, está presente en el suelo y se caracteriza por causar la muerte súbita de los árboles (Zentmyer, 1980). En México, se ha detectado la presencia de la enfermedad conocida como tristeza del aguacatero en todas las zonas productoras,

en el estado de Michoacán se estima que alrededor de 4000 ha están afectadas por la enfermedad y en años recientes la incidencia ha ido en aumento, por lo que actualmente no existe una huerta en la cual no se presente este problema (Téliz, 2000; Ochoa, 2006).

Hernández (2016) reporta a *Phytophthium vexans* como agente causal de la tristeza del aguacatero en municipios productores de aguacate en Michoacán, México. Este patógeno comúnmente conocido por causar enfermedades como damping-off y la pudrición de semillas en emergencia y postemergencia, también causan pudrición de raíces en plantas maduras y pudriciones blandas en frutos carnosos (Fry y Grünwald, 2010). *P. vexans* fue aislado de *Metrosideros colinna* una planta ornamental leñosa junto a otros organismos patógenos, considerándose un organismo patógeno secundario; sin embargo, las inoculaciones de *P. vexans* sobre plantas sanas originaron síntomas de enfermedad, tratándose por tanto de un patógeno primario (Kliejunas y Ko, 1975; Van der Plaats-Niterink, 1981; Andrés, 2015).

Desde hace años el control de las enfermedades fúngicas, ha dependido en gran medida de los tratamientos con agroquímicos; sin embargo, su uso representa un severo riesgo para la salud humana y contribuye al aumento de la contaminación al medio ambiente (Abdel-Monahim *et al.*, 2011). Para reducir este problema, existe la necesidad de buscar y adoptar estrategias que sean accesibles, sencillas de aplicar y no tóxicas para seres humanos y animales (Naeini *et al.*, 2010)

En la actualidad, los productos naturales gozan de amplia aceptación y reemplazan cada vez más a los productos de síntesis química; como respuesta a esta tendencia, se ha producido un creciente interés en la investigación de la posible utilización de aceites esenciales y extractos de plantas como fungicidas naturales, que sean relativamente menos perjudiciales para el medio ambiente (Benites *et al.*, 2009; Bajpai y Kang, 2010). Se ha demostrado que los aceites esenciales y sus compuestos tienen un efecto fungicida (Wilson *et al.*, 1997 y Gogoi *et al.*, 1997). La agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental, ya que día con día va en aumento el porcentaje de consumidores

que demandan alimentos inocuos y libres de residuos de productos químicos, seguros para la salud y que sólo contengan ingredientes naturales (Ponce *et al.*, 2004).

Las especias de clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) y pimienta negra (*Piper nigrum*) han sido utilizadas principalmente para la extracción de aceites esenciales, los cuales diversos autores señalan que tienen un efecto inhibitorio contra hongos de la clase Deuteromycetes y Ascomycetes, por tal motivo en este trabajo se evaluó el efecto inhibitorio de estos aceites contra los oomicetos *P. vexans* y *P. cinnamomi*.

## Objetivos

### Objetivo general

- Evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* de aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y pimienta negra (*Piper nigrum*) sobre fitopatógenos del cultivo del aguacate (*Phytophthora cinnamomi* y *Phytophthora vexans*).

### Objetivo específico

- Evaluar el efecto inhibitorio *in vitro* de los aceites esenciales en fitopatógenos de aguacate.
- Determinar la concentración CL<sub>50</sub> de los aceites evaluados.

## Hipótesis

Los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y pimienta negra (*Piper nigrum*) podrán inhibir el crecimiento de *Phytophthora cinnamomi* y *Phytophthora vexans*.

## REVISIÓN DE LITERATURA

### Historia y Origen del Aguacate

Hasta la fecha, el origen del aguacate se ha buscado en áreas en las que actualmente existen poblaciones con gran diversidad o se han encontrado aguacates con características que son consideradas como silvestres (Kopp, 1966; Storey *et al.*, 1986; Bergh, 1992). La evidencia más antigua del consumo de aguacate fue encontrada en una cueva en Coxcatlán, región de Tehuacán, Puebla, México, que data entre los años 8,000-7,000 A.C. (Smith, 1966).

México es considerado como el país con mayor diversidad de aguacate en donde existen 20 diferentes especies emparentadas con el aguacate *Persea americana* Mill. De acuerdo con Barrientos y López (2000) se reconocen tres razas: la Mexicana, la Antillana y la Guatemalteca; sin embargo, Téliz *et al.* (2000) menciona otra raza llamada Costarricense, conocida como aguacate de monte. Bergh y Ellstrand (1986) clasificaron las variedades botánicas, quedando la raza mexicana como *P. americana* var. *drymifolia*, la raza antillana como *P. americana* y la raza Guatemalteca como *P. americana* var. *guatemalensis*.

#### Clasificación taxonómica Fersini (1975).

**Clase:** Dicotiledoneas

**Subclase:** Diapétales

**Orden:** Ranales

**Familia:** *Lauraceae*

**Género:** *Persea*

**Especie:** *americana*

El aguacate *P. americana* (Figura 1), pertenece a la familia *Lauraceae*, una familia que se caracteriza por su gran variabilidad morfológica y que incluye 92 géneros y entre 2840 y 3340 especies distribuidas en todas las regiones tropicales y subtropicales del mundo (Chanderbali *et al.*, 2001; Renner, 2004).



**Figura 1.** Árbol de aguacate *P. americana* Mill.  
Fuente: Unión Ibereoamericana

### **Condiciones Agroecológicas**

Benacchio (1982) y Ruíz *et al.* (1999) señalan que, dependiendo de la raza de origen del aguacate, este se puede establecer desde el nivel del mar hasta los 3,000 msnm, aunque en la práctica huertos a más de 2,400 m se consideran fuera del área apropiada para una producción rentable; la raza mexicana prospera en altitudes de 1,500 a 3,000 m; la guatemalteca de 1,000 a 2,000 m y la antillana de 0 a 1,000 m.

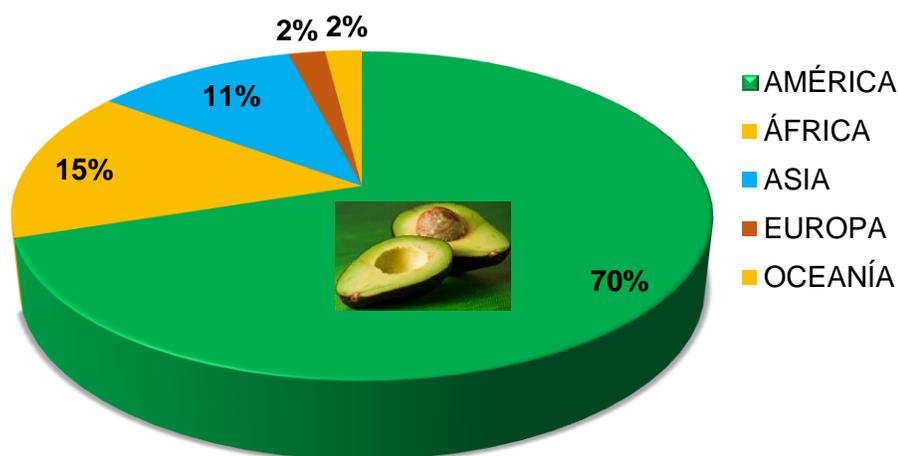
De acuerdo a Galán (1988) y Avilán *et al.* (1996) las condiciones ideales para el establecimiento del cultivo del aguacate son temperaturas diurnas que oscilan de 25-30 °C y nocturnas en 15-20 °C, destacando que las temperaturas altas (mayores de 35 °C) perjudican la floración y fructificación, afectando la fecundación y polinización; ocasionando desprendimiento de los frutos. En cuanto a la humedad del suelo el cultivo del aguacate requiere que las precipitaciones estén bien distribuidas durante el año; el período más crítico en el que la planta debe disponer de suficiente agua abarca desde el cuajado hasta la recolección, pero los excesos de precipitación durante las

etapas de floración y fructificación, además de reducir la producción, perjudican la calidad de los frutos (Medina *et al.*, 1978). Álvarez (1979) señala que los suelos más convenientes para el cultivo del aguacate son los de textura media y profundos, y destaca que los muy arenosos no son recomendables ya que los árboles no adquieren un buen desarrollo.

## Producción

### Nivel mundial

La producción mundial del cultivo del aguacate oscila en los 4,700,000 toneladas de fruto, siendo el continente americano el principal productor con el 70.3% de la producción (Figura 2), que equivale a 3,317,609.00 ton, y el 29.7% restante los demás continentes (FAOSTAT, 2013).



**Figura 2.** Porcentaje de producción de aguacate por continente.  
Fuente: FAOSTAT (2013).

Entre los principales países productores se encuentran México como el mayor productor mundial de aguacate con 1,467,837 millones de ton, seguido de República Dominicana aportando 387,546 ton, Colombia 303,340 ton, Perú 288,387 ton e Indonesia con 276,311 ton (FAOSTAT, 2013).

### Nivel nacional

México tiene una enorme cultura en el cultivo, además de ser el principal consumidor y productor de aguacate en el mundo, con una superficie sembrada de 203,732 ha, de las cuales se cosechan 178,706 ha, con una producción de 1,878,599 toneladas (SIAP, 2016). Se han reportado plantaciones comerciales de aguacate en casi todas las entidades federativas de México, a excepción de Chihuahua, Coahuila y Distrito Federal (SIAP, 2016). De acuerdo a SIAP (2016) los principales estados productores de aguacate a nivel nacional son Michoacán con una superficie sembrada de 147,720 ha, Jalisco con 17,812 ha, estado de México con 9,434 ha, Nayarit con 5,446 ha y Guerrero con 4,468 ha (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Principales estados productores de aguacate en México.

<b>Ubicación</b>	<b>Sup. Sembrada (Ha)</b>	<b>Sup. Cosechada (Ha)</b>	<b>Producción (Ton)</b>
<b>Michoacán</b>	147,720	134,703	1,456,748
<b>Jalisco</b>	17,812	13,655	146,141
<b>México</b>	9,434	8,412	115,423
<b>Nayarit</b>	5,446	4,499	32,311
<b>Guerrero</b>	4,468	3,347	21,581

Fuente: (SIAP, 2016).

Siendo el estado de Michoacán el principal productor, aportando 1,456,748 ton (SIAP, 2016). Los principales municipios productores en el estado de Michoacán son Tancítaro, Tacámbaro, Salvador Escalante, Uruapan y Ario de Rosales con las siguientes producciones (Cuadro 2).

**Cuadro 2.** Principales municipios productores de aguacate en el estado de Michoacán.

<b>Municipio</b>	<b>Sup. Sembrada (ha)</b>	<b>Sup. Cosechada (ha)</b>	<b>Producción (ton)</b>
<b>Tancítaro</b>	22,417	22,417	224,905
<b>Tacámbaro</b>	14,814	14,299	168,161
<b>Salvador Escalante</b>	15,715	13,465	156,461
<b>Uruapan</b>	14,616	14,616	147,110
<b>Ario de Rosales</b>	15,121	12,198	143,842

Fuente: (SIAP, 2016).

### **Importancia Económica**

México aporta 3 de cada 10 toneladas de aguacate que se producen en el mundo; posicionándolo como el país exportador número uno; seguido de Indonesia, quien exporta 294 mil 200 toneladas; en tanto nuestro país supera el millón 316 mil 104 toneladas anuales; es decir, exporta 4.4 veces más que el país asiático en mención (SIAP, 2014). Dado a que en México existe una gran cultura por este fruto, se registran un consumo per cápita del fruto de 7.4 kg (SAGARPA, 2015).

A nivel nacional, Michoacán aporta 8 de cada 10 toneladas que se producen en México; lo cual lo consolida como el líder productor de aguacate en la República Mexicana; los estados que lo siguen en mayor producción son: estado de México, Jalisco, Nayarit y Morelos, en conjunto generan el 95% de la producción nacional (SAGARPA, 2015).

Por otro lado, otro aspecto que muestra el impacto económico del cultivo es el empleo. Se estima que todo el proceso productivo genera alrededor de 300 mil empleos directos y 70 mil empleos indirectos, generando un ingreso de 1,270 millones de dólares anuales (SAGARPA, 2015).

## Enfermedades del Aguacate

### Oomicetos

En la clase de los oomicetes, también conocidos como "mohos acuáticos", se incluyen algunos de los patógenos más devastadores. Algunas de las principales enfermedades que ocasionan son: tizón de plántulas, damping-off, pudrición de raíces, tizones foliares y mildius vellosos (Fry y Grünwald, 2010). Los oomicetes fueron considerados por mucho tiempo como hongos inferiores, debido a su hábito de crecimiento filamentosos, a su nutrición por absorción y a su reproducción vía esporas; sin embargo, conforme se ha ido entendido las relaciones evolutivas, está claro que este grupo de organismos no está relacionado con los hongos verdaderos, ya que los hongos parecen estar más cercanamente relacionados con los animales que con los oomicetes, mientras que éstos a su vez se relacionan más con las algas y las plantas verdes (Fry y Grünwald, 2010).

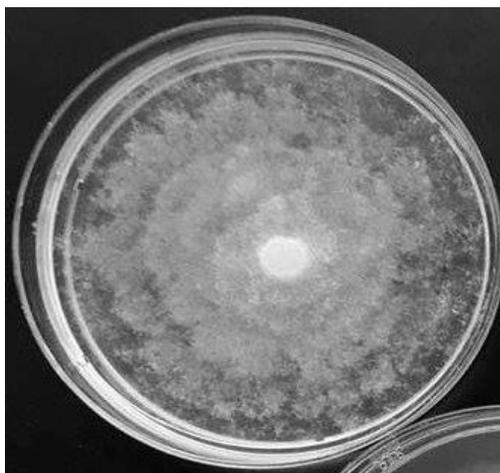
Dentro de esta clase se encuentran los oomicetos *Phytophthora citrícola*, *Phytophthora heveae*, *Phytophthora palmivora* y *Phytophthora boehmeriae*, que han sido asociados junto a otros patógenos causantes de la enfermedad conocida como el cancro de tronco en el cultivo de aguacate y a la pudrición de raíces, esta enfermedad se presenta en huertos sombreados y con exceso de humedad, llegando a alcanzar una alta incidencia. La enfermedad reviste una importancia secundaria, pero en casos extremos puede ocasionar la muerte del árbol. Los síntomas se presentan sobre el tronco principal y hasta una altura de un metro, el síntoma característico es una lesión húmeda oscura sobre la corteza, la cual se agrieta y segrega savia vegetal que se cristaliza y forma un polvillo blanco; la madera presenta pudrición firme en sentido radial y una coloración café rojiza. En las ramas se pueden observar los mismos síntomas, pudiendo haber constricción de estas. En casos severos se puede apreciar una clorosis y defoliación del follaje (Coffey *et al.*, 1988; Téliz, 2000; Machado, 2012).

## Características morfológicas

Las principales características que distinguen a la clase de los oomicetos son: micelio cenocítico, filamentososo y ramificado, la colonia micelial presenta un crecimiento en forma arrosetada, dando un aspecto de camelia, otra característica es que producen esporangios con zoosporas, estas pueden ser piriformes o reniformes dependiendo del orden a que pertenezcan, presentan dos flagelos de dos tipos, uno tipo látigo y el otro tipo pincel. Su pared celular está constituida por celulosa y no por quitina, compuesto presente en la pared celular de los hongos verdaderos (Alexopoulos, 1996; Saldarriaga, 2001).

### ***Phytophthora cinnamomi* Rands (tristeza del aguacatero)**

En el cultivo de aguacate la enfermedad conocida como “tristeza del aguacatero” es la de mayor importancia a nivel mundial detectándose en más de 70 países, es causada por el oomiceto *P. cinnamomi* (Figura 3), su importancia radica en que este patógeno puede llegar a ocasionar la muerte de los árboles, en México se reporta que provocó la desaparición de regiones aguacateras como Querétaro y Comonfort, Guanajuato (Zentmyer, 1980; Téliz y García, 1982; Zentmyer, 1985). En Australia en 1977 fue responsable de la fluctuación en el precio del producto en el mercado (Weste, 1994).



**Figura 3.** Crecimiento del oomiceto *P. cinnamomi* en medio PDA.

El primer reporte de esta especie se acredita a Rands, quien, en 1922, la aisló de canchales de árboles de canela *Cinnamomum burmani* Blume en Sumatra (Romero, 1993). Sin embargo, el primer reporte en aguacate lo hizo Tucker en 1927 en Puerto Rico, y Payer en 1942 en California, quien aisló al patógeno de árboles de aguacate que presentaban la sintomatología de la enfermedad (Álvarez, 1979). En la actualidad esta enfermedad se reporta en cerca de 1,000 hospederos, principalmente en plantas leñosas (Zentmyer, 1980). Este fitopatógeno se puede encontrar como agente causal de la pudrición de las raíces del aguacate en casi todas las áreas aguacateras del mundo incluyendo Australia, Nueva Zelanda, África, Israel, España, Marruecos, Estados Unidos, México, así como varios países de América y el Caribe donde se cultiva este frutal (Pegg *et al.*, 2008).

En México se reportó por primera vez en 1951 (Zentmyer, 1951). Actualmente se encuentra presente en los estados de Puebla, Chiapas, Veracruz, Nayarit, Morelos y Michoacán (Morales, 1990). En Michoacán, se detecta en la década de los setentas de tal manera que en 1979 se localizaron 13 mil árboles dañados en suelos pobres en materia orgánica (Vidales, 1996). En 1994 se efectuó un muestreo y se encontró la enfermedad distribuida en suelos del tipo andosol afectando a 100 mil árboles en los municipios de Uruapan, San Juan Nuevo, Tingüindín, Los Reyes, Tancítaro, Peribán y Ziracuaretiro, lo que provocó pérdidas a los productores de \$640 millones, tomando como base la estimación que hace FIRA 1996 de \$640 por árbol de 8 años de edad (Vidales, 1996).

## **Clasificación taxonómica (Agrios, 2005).**

**Reino:** Stramenopila

**Phylum:** Oomycota

**Clase:** Oomycetes

**Orden:** Peronosporales

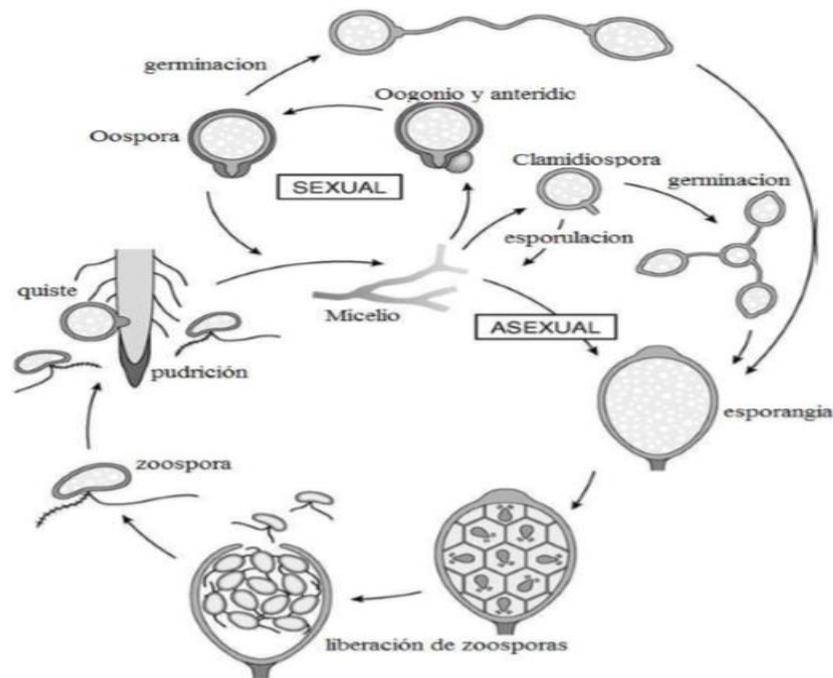
**Familia:** Pythiaceae

**Género:** *Phytophthora*

**Especie:** *cinnamomi*

## **Ciclo biológico**

Cuando las condiciones ambientales son desfavorables (bajas temperaturas y escasa humedad), *P. cinnamomi* se mantiene en el suelo o dentro de fragmentos de raíces necróticas en forma de estructuras de resistencia a corto plazo (clamidosporas) o largo plazo (oosporas, agregaciones de hifas) (Crone *et al.*, 2012; Jung *et al.*, 2013). La germinación de estas estructuras de resistencia se produce cuando las condiciones ambientales son favorables, es decir, cuando la temperatura ronda entre 24 y 28 °C (Davison y Ribeiro, 1996) o entre 26 y 30 °C en el caso de aislados españoles (Sánchez *et al.*, 2002) y cuando existe agua libre en el suelo, como ocurriría después de una lluvia. Las clamidosporas germinan y dan origen a hifas del hongo que se conocen en forma colectiva como micelio, reiniciando el ciclo de infección (figura 4), el micelio origina clamidosporas y otras estructuras especializadas (esporangios) que contienen zoosporas (Andrade *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Ciclo biológico de *P. cinnamomi*. (Tomado de A Hardham, The Australian National University, Canberra, A.C.T.).

Las zoosporas se desplazarán a través del agua libre y atraídas por las exudaciones de las raíces entrarán en contacto con éstas; para infectar la raíz, este patógeno precisa que el tejido vegetal este sano o recién herido, pero que no haya sido previamente invadido por otros organismos, ya que su baja capacidad competitiva hace de él un patógeno primario, no secundario (Robin *et al.*, 1998). Inicialmente, suele infectar las raíces finas no suberizadas encargadas de la absorción del agua y posteriormente raíces laterales e incluso la raíz principal y el cuello (Robin *et al.*, 1998). El avance de la infección pudre gran volumen de raíces y las plantas desarrollan los síntomas de la enfermedad conocida en México como la tristeza del aguacatero que cuando logra infectar la base del tronco el árbol de aguacate desarrolla la enfermedad del cancro (Zentmyer, 1980; Coffey, 1991 y Téliz *et al.*, 2007). Hasta hace algunos años solo se mencionaba a *P. cinnamomi* como el único patógeno responsable de esta sintomatología; sin embargo, algunos autores del continente europeo reportan nuevas especies causando marchitez tales como: *Cylindrocladium parasiticum*,

*Cylindrocarpon liriodendri*, *Nectria liriodendri*, *Ilyonectria macrodidyma* (Dann *et al.*, 2011; Vitale *et al.*, 2011).

## Sintomatología

Los árboles afectados por esta enfermedad muestran un progresivo decaimiento, un menor crecimiento y clorosis foliar (marchitez general), existiendo en árboles más afectados una severa defoliación (Figura 5) y muerte descendente de brotes (López, 2004). *P. cinnamomi* pudre las puntas de las raíces alimenticias con diámetro menor de 5 mm produciéndose una coloración café negruzca, las raíces se quiebran fácilmente; la absorción de agua y su transporte ascendente se reduce originando los síntomas en el follaje, incluso es interesante observar que los arboles con tristeza tienen más agua en su alrededor que árboles sanos, debido a que esa agua ya no puede ser absorbida por las raíces, transportada por el sistema vascular y transpirada por las hojas (Mora *et al.*, 2007). La ausencia de raicillas y pelos absorbentes evita la toma de agua, por lo cual el suelo bajo los árboles enfermos tiende a permanecer húmedo (Tamayo, 2005). La enfermedad se presenta en cualquier etapa del ciclo biológico de la planta, sin embargo, las plantas juveniles son más susceptibles (Zentmyer, 1985).



**Figura 5.** Árbol con sintomatología de la tristeza del aguacatero.  
Fuente: Department of Agriculture and Food Australia.

## **Estrategias de control de *Phytophthora cinnamomi***

### **Control químico**

Whiley y Pegg (1990) mencionaron que a partir de 1980 surgen productos químicos como el metalaxyl (Ridomil<sup>®</sup>), logrando un buen control de la pudrición durante los tres primeros años, después pierde efectividad. Guest *et al.* (1995) reportaron la aparición de Aliette WP<sup>®</sup> en 1977, un funguicida que contiene (aluminium tris-O-ethyl phosphonate), el cual tiene acciones en el tronco, hojas y raíces; como polvo mojable, Aliette WP<sup>®</sup> fue usado en “drench” al suelo y en aplicaciones foliares.

### **Control cultural**

Pegg *et al.* (1990) mencionan que una buena fertilización a base de nitrógeno en forma de amonio disminuye las condiciones que favorecen el desarrollo de *P. cinnamomi*. Tsao y Oster (1981) reportan que el uso de estiércol de animales reduce las poblaciones de *P. cinnamomi*, probablemente debido a que la liberación de amoniaco tiene un efecto inhibitorio de este patógeno. Aplicaciones de carbonato de calcio, nitrato de calcio y sulfato de calcio también se han mostrado en repetidas ocasiones para reducir *P. cinnamomi* (Broadbent y Baker, 1974; Pegg *et al.*, 1990).

### **Control biológico**

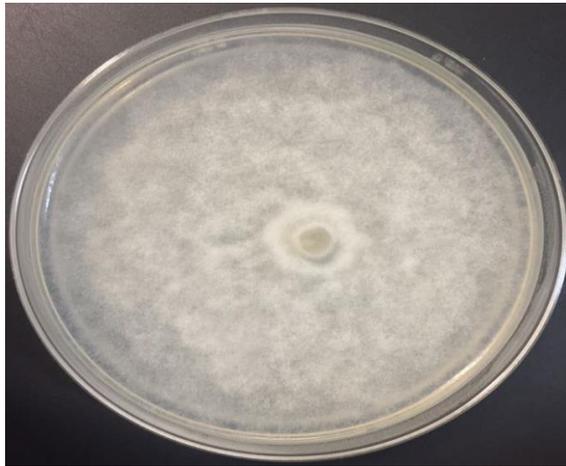
Broadbent y Barker (1974) mencionaron que los altos niveles de microorganismos activos pueden reducir las poblaciones de *P. cinnamomi*. Desde entonces, muchos microorganismos del suelo como; *Myrothecium roridum*, *Trichoderma harzianum*, *Epicoccum purpurascens*, *Catenaria anguillae*, *Humicola fuscoatra*, *Anguillospora pseudolongissima*, *Hypochoytrium catenoides*, *Myrothecium verrucaria*, *Streptomyces griseoalbus*, *Micromonospora carbonacea*, *Streptomyces violascens* y *Ceraceomyces*

*tessulatus* han demostrado tener efectos inhibidores a *P. cinnamomi* a través de la competencia, parasitismo o antibiosis (Davison y Ribeiro, 1996; Downer, 1998).

### ***Phytopythium vexans* Lévesque y Cock**

El género *Phytopythium* fue descrito por Lévesque y Cock (2004), este nuevo género es morfológicamente intermedio entre el género *Phytophthora* y *Pythium*. Cock *et al.* (2015) observaron que las especies de *Pythium* pertenecientes al clade K eran filogenéticamente distintas al resto de los *Pythium* spp. Cooke *et al.* (2000) demostraron que *Pythium vexans* era claramente diferente de otras *Pythium* spp. y *Phytophthora* usando la subunidad grande ribosomal (LSU) y el espaciador interno transcrito (ITS). Villa *et al.* (2006) demostraron que las especies de *Pythium* pertenecientes al clade K estaban estrechamente relacionados con *Phytophthora*. La diferenciación morfológica deriva que es el único que presenta esporangios papilados y anteridios cilíndricos o lobulados.

*P. vexans* (Figura 6) fue aislado junto a otros organismos patógenos considerándose un organismo patógeno secundario (Andrés, 2015). Sin embargo, fue aislado en plantas de *Metrosideros colinna* junto a *P. cinnamomi*, agente patógeno clave en este cultivo, así como en otras especies leñosas de importancia ornamental; las inoculaciones de *P. vexans* sobre plantas sanas de esta especie originó los síntomas de esta enfermedad, tratándose por tanto de un patógeno primario (Kliejunas y Ko, 1975; Van der Plaats-Niterink, 1981; Andrés, 2015). Es importante mencionar que Rodríguez *et al.* (2014) reportan a *P. vexans* aislado de raíces de aguacate en las Islas Canarias, mostrando una patogenicidad incluso más severa que *P. cinnamomi*.



**Figura 6.** Crecimiento del oomiceto *P. vexans* en medio PDA.

*P. vexans* se encuentra como organismo patógeno de un gran número de especies leñosas entre las que se destacan las del género *Metrosideros*, las otras especies sobre las que se ha sido referenciada como agente patógeno son las siguientes: *Annona* spp, *Anthurium* spp., *Camellia sinensis*, *Camellia* spp., *Carya illinoensis*, *Cinchona* spp., *Cocos nucifera*, *Durio* spp., *Elaeis guineensis*, *Eucalyptus* spp., *Eugenia* spp., *Gossypium* spp., *Hevea brasiliensis*, *Ilex aquifolium*, *Juniperus* spp., *Leptospermum flavescens*, *Malus* spp., *Piper* spp., *Prunus persicae*, *Pyrus* spp., *Theobroma cacao* y *Thuja* spp. (Van der Plaats-Niterink, 1981; Farr y Rossmann, 2013).

## **Clasificación taxonómica Lévesque y Cock (2004).**

**Reino:** Chromista

**Filo:** Oomycota

**Clase:** Oomycetes

**Orden:** Peronosporales

**Familia:** Pythiaceae

**Género:** *Phytophthium*

**Especie:** *vexans*

## **Descripción morfológica**

Las características morfológicas de *P. vexans* son hifas que pueden alcanzar un ancho de hasta 5  $\mu\text{m}$ ; sus esporangios pueden ser subglobosos, ovoides o piriformes, ocasionalmente suelen ser proliferantes, intercalares o terminales, con unas dimensiones de 18 a 23  $\mu\text{m}$  de largo y de 15 a 21  $\mu\text{m}$  de ancho. Los oogonios mayoritariamente son terminales en pedicelos ramificados cortos, a veces laterales o intercalares, globosos y con un tamaño medio de 18 a 23  $\mu\text{m}$  de diámetro. Presenta anteridio habitualmente de 1, raramente 2 por oogonio, monoclinos, raramente diclinos, surgiendo a cierta distancia bajo el oogonio o desde la hifa principal, las células anteridiales son grandes, con forma típica de campana; las oosporas son apeleróticas con unas dimensiones de 16 a 19  $\mu\text{m}$  de diámetro y una pared de 1.5  $\mu\text{m}$  de espesor Van der Plaats-Niterink (1981).

## Sintomatología

La sintomatología de pudrición de raíz producida por *P. vexans* es similar a la producida por otras especies de *Pythium*. Sobre plántulas de *Metrosideros collina* de 2.5 cm de altura, provoca necrosis extensas del sistema radicular, la parte aérea de la plántula aparece marchita y termina muriendo (Kliejunas y Ko, 1975). Este fitopatógeno también se ha encontrado afectando al cultivo de duraznero (*Prunus persicae*) una de las especies frutícolas y leñosas más importantes de clima templado, produciendo un retraso en el desarrollo de plántulas, clorosis de las hojas, defoliación prematura y muerte de la planta debido a la podredumbre progresiva del sistema radicular (Andrés, 2015). Hernández (2016) realizó una prueba de patogenicidad de *P. vexans* en plántulas de aguacate de seis hojas verdaderas, después de 15 días de la inoculación el fitopatógeno causó una marchitez total de las plántulas inoculadas (figura 7).



**Figura 7.** Sintomatología causada por *Phytophthium vexans*.  
Fuente: Hernández (2016).

## Control químico

El etridiazol y metalaxil son algunos fungicidas utilizados para el control de la pudrición de raíz causada por *P. vexans*, mientras que en España y México el fungicida fosetil-aluminio es el único registrado para su empleo en cultivos ornamentales leñosos y recomendado por la bibliografía especializada para el control de este patógeno (De Liñán y De Liñán, 2013).

## **Aceites Esenciales**

Las plantas han sido capaces de protegerse del ataque de diversos microorganismos patógenos, produciendo grandes cantidades de metabolitos secundarios, antes que el hombre jugara un papel activo en su protección, mediante sustancias químicas con actividad antimicrobiana (Wilson *et al.*, 1999; Dixon, 2001). Entre los metabolitos secundarios importantes relacionados con los mecanismos de defensa, destacan los flavonoides, fenoles, terpenos, alcaloides, lectinas, polipéptidos y aceites esenciales (Cowan, 1999). Los aceites esenciales son una mezcla de lípidos o grasas de bajo peso molecular muy hidrofóbicos, generalmente menos densos que el agua, aromáticos y volátiles, producto del metabolismo secundario de las plantas (Stashenko, 2000; Batish *et al.*, 2008; Bakkali *et al.*, 2008; Bosquez *et al.*, 2009). De acuerdo a Tajkarimi *et al.* (2010) se han encontrado alrededor de 1340 plantas a las que se les han atribuido propiedades antimicrobianas y en las cuales se han identificado alrededor de 30,000 componentes.

### **Importancia de los aceites esenciales**

En los últimos años la sociedad ha priorizado los aspectos ambientales y ha dirigido un importante número de investigaciones hacia el hallazgo y establecimiento de nuevas alternativas para el manejo integrado de plagas y enfermedades de las plantas con menos efectos negativos al ambiente (Vaillant *et al.*, 2009). La aplicación de aceites esenciales es un método muy atractivo para controlar enfermedades tanto en cosecha como en post-cosecha, estos materiales son una mezcla compleja de compuestos volátiles producidos en diferentes partes de las plantas, y han sido reconocidos por poseer diversas funciones, incluyendo conferir la resistencia a plagas y enfermedades (Oxenham, 2003); algunos aceites esenciales, así como sus constituyentes, han demostrado poseer propiedades antibacterianas y antifúngicas (Ahmet *et al.*, 2005; Karmen *et al.*, 2003). Existen numerosos estudios que revelan la

actividad antimicrobiana, aunque no todos presentan la misma actividad y ésta dependería de sus componentes (Fisher y Phillips, 2006).

Aunque el mecanismo por el cual actúan no está totalmente entendido, puede involucrarse en éste la destrucción de la membrana microbiana por los constituyentes lipofílicos que poseen (Schelz *et al.*, 2006; Keeler y Tu, 1991), en estudios recientes se reportan otros efectos como cambios en la morfología del hongo que incluyen daños sobre estructuras como conidias, macroconidias e hifas, así como la disminución en la producción de micotoxinas (Park *et al.*, 2009).

### **Composición química**

La composición de los aceites esenciales varía en función de la zona de cultivo, condiciones ambientales y de acuerdo a las diferentes partes de la planta de las cuales se extrae (Burt, 2004). Dependiendo de la especie, se calcula que un aceite esencial puede contener entre 50 a 300 compuestos químicos, los cuales pertenecen a los grupos de hidrocarburos terpénicos, alcoholes, aldehídos, cetonas, éteres, ésteres, compuestos fenólicos, fenilpropanoides, entre otros (Stashenko, 2000). Se ha reportado que los componentes mayoritarios pueden alcanzar hasta un 85% de la composición total del aceite esencial, mientras que los demás pueden estar presentes solo como trazas (Kalembe y Kunicka, 2003; Fisher y Phillips, 2008; Tajkarimi *et al.*, 2010).

### **Aceite Esencial de Clavo (*Syzygium aromaticum*)**

#### **Distribución**

El clavo de olor (*Syzygium aromaticum*) es una especie perteneciente a la familia *Myrtaceae*, la cual se caracteriza por habitar en ambientes principalmente tropicales (Singh *et al.*, 2012; Moura *et al.*, 2012). Es originaria de Indonesia y actualmente se

cultiva en Brasil, Haití, India, Kenia, Madagascar, Malasia, Islas Mauricio, Seychelles, Sri Lanka, Tanzania, entre muchos otros países. En México no hay reportes de que esta especia sea cultivada, la forma de obtenerla es importándola de otros países productores (Orwa *et al.*, 2009).

### **Características físicas**

Se obtiene de un árbol perenne que florece dos veces al año, los botones florales tienen inicialmente un color pálido que poco a poco se convierte en verde (figura 8), para después tornar a un color rojo marrón oscuro (Singh *et al.*, 2012). Los clavos, son los capullos sin abrir y se cosechan cuando las hojas verdes externas (cáliz) han cambiado de color verde a un amarillo-rosa (Pandey y Singh, 2011). Los tallos, las hojas y los botones sin abrir son las partes de esta especia que utilizan principalmente para la extracción de aceite esencial (Srivastava *et al.*, 2005).



**Figura 8.** Botón floral del clavo de olor.  
Fuente: ttrade winds fruit (<http://www.tradewindsfruit.com>)

### **Composición química**

El aceite esencial de clavo está formado por una gran variedad de compuestos, su composición varía dependiendo de su procedencia, entre sus componentes destaca eugenol (49-98%) como compuesto mayoritario,  $\beta$ -cariofileno (4-21%) y eugenil

acetato (0,5-21%); además también se pueden encontrar pequeñas cantidades de  $\alpha$ -humuleno y trazas (< 1%) de otros 25 a 35 constituyentes (Chaieb *et al.*, 2007).

### **Estudios de aceite esencial de clavo**

Davidson (1997) menciona que el aceite esencial de clavo presenta una elevada actividad microbiana contra mohos, levaduras y bacterias patógenas como *Bacillus anthracis*. Otras especies de bacterias inhibidas son: *Escherichia coli*, *Enterobacter faecalis*, *Bacillus subtilis*, *Klebsiella pneumoniae*, entre otras (Hernández, 2011). En hongos se ha reportado eficaz sobre algunas especies como *Alternaria*, *Fusarium*, *Botrytis*, *Septoria*, *Penicillium digitatum* y *Aspergillus sp.* (Llewellyn *et al.*, 1981; Kim *et al.*, 1995). Además, inhibe el desarrollo de *Aspergillus niger* y se considera compatible con las frutas y sus derivados (Kim *et al.*, 1995; Hernández, 2011).

Hassani *et al.* (2011) realizaron pruebas con aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), canela (*Cinnamomum zeylanicum*) y clavo (*S. aromaticum*) aplicados por atomización para controlar el crecimiento de mohos en chabacano (*Prunus armeniaca*) inoculado con *Monilinia fruticola* y *Botrytis cinerea*, durante el almacenamiento postcosecha, logrando reducir tanto la incidencia como la severidad de la infección de las frutas tratadas al adicionar los aceites esenciales en comparación con los testigos, además la máxima actividad antifúngica se obtuvo a concentraciones de 600  $\mu$ L en todos los aceites; sin embargo, la eficacia del aceite esencial de clavo en la reducción de la incidencia en los chabacanos inoculados con *B. cinerea*, fue mayor que la de los aceites de tomillo y canela. En bioensayos en la inhibición del crecimiento micelial de *Fusarium sp.*, se observó un efecto antifúngico del aceite esencial de *S. aromaticum*, mostrando una inhibición del crecimiento micelial con dosis de 100 a 300  $\mu$ g/mL (Necha y Barrera, 2009).

Bowers y Locke (2004) reportaron que las poblaciones de *Phytophthora nicotianae* en el suelo se reducen empleando formulaciones de aceite esencial de clavo y neem en concentraciones de 49.7 y 55.6% respectivamente.

## Aceite Esencial de Pimenta Negra (*Piper nigrum*)

### Distribución

Es originaria de la India del sur, actualmente Vietnam es el mayor productor y exportador de pimienta del mundo, produciendo el 34% de la cosecha de *Piper nigrum* del mundo a partir de 2008 (Sotelo, 2016).

### Características físicas

Es una especie perenne que puede llegar a medir más de 4 m soportándose en árboles, enrejados o cualquier otro soporte (figura 9), se propaga fácilmente ya que emite raíces en cuanto los tallos tocan el suelo, presenta hojas alternas, enteras, de unos 5 a 10 cm de largo por 3 a 6 del ancho, las flores surgen en racimos pendulares en las axilas de las hojas, tienen de 4 a 8 cm de largo y a medida que los frutos maduran se van alargando hasta medir unos 7 a 15 cm, el fruto es una drupa que se convierte en el grano de pimienta al madurar (Forzza, 2010).



**Figura 9.** Cultivo de pimienta negra.

Fuente: Nguyen Luan – VNP (<https://vietnam.vnanet.vn/>)

## **Composición química**

Una cualidad de las plantas de este género es la presencia de aceites esenciales, que podrían ser característicos de cada especie, se han efectuado estudios acerca de la composición de varios aceites esenciales del género *Piper*, encontrándose como constituyentes principales fenilpropanoides, monoterpenoides y sesquiterpenoides (Nigam y Purohit, 1962; Gupta *et al.*, 1985; Ramos *et al.*, 1986). Mann (2011) menciona que el aceite de la pimienta negra contiene  $\beta$ - y  $\alpha$ -pinenos,  $\delta$ -limoneno y  $\beta$ -cariofileno como componentes principales.

## **Estudios de aceite esencial de pimienta**

Los metabolitos secundarios encontrados en extractos obtenidos de diferentes partes de estas plantas, han mostrado tener actividad repelente contra el gorgojo del maíz *Sitophilus zeamais* (Leão, 2007; Almeida *et al.*, 2005). León (2017) reporta que el aceite esencial de pimienta tiene acción fungistática sobre los hongos *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp, mientras que Kunasakdakul y Suwitchayanon (2012) reportan que el extracto de pimienta negra tiene un efecto bactericida contra *Xanthomonas campestris*.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Ubicación del Experimento**

La presente investigación se realizó en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en el Departamento de Parasitología, en el Laboratorio de Toxicología Saltillo, Coahuila, México.

### **Aislamiento del patógeno**

*P. vexans* y *P. cinnamomi* fueron aislados de muestras de raíces de árboles de aguacate que presentaban sintomatología característica de la enfermedad conocida como tristeza del aguacatero provenientes del municipio de Tancítaro, perteneciente a la franja aguacatera del estado de Michoacán. Las raíces se lavaron en agua corriente, se realizaron pequeños cortes no mayores a 0.5 cm; con apoyo de un bisturí estéril se realizó un corte longitudinal seleccionando los límites de tejido sano y enfermo. En la cámara de flujo laminar los cortes de raíz se lavaron en solución de hipoclorito de sodio al 3 % por un minuto, seguido de tres lavados de agua destilada estéril y se colocaron en papel absorbente previamente esterilizado. Una vez secas, se prosiguió a realizar la siembra colocando 4 trozos de raíces en placa Petri en medio selectivo PARPH (pimaricina, ampicilina, rifampicina, pcnb e himexazol) y finalmente los aislados se incubaron a 28°C por tres días (Davison y Ribeiro, 1996; Fierro, 2011).

### **Microorganismos evaluados**

Las cepas evaluadas en la presente investigación fueron identificadas con claves taxonómicas, coincidiendo con lo reportado por Davison y Ribeiro (1996) para la identificación de *P. cinnamomi* y con lo reportado por Lévesque y Cock (2004) para la identificación de *P. vexans*. Las cepas fueron reactivadas y se incrementaron en cajas Petri de 8.5 cm de diámetro con medio de cultivo PDA BD-Bioxon® (Papa-Dextrosa-

Agar), colocando con el apoyo de un sacabocados y aguja de disección estériles un explante de 5 mm de diámetro en el centro de la caja. Las cajas se incubaron en oscuridad a una temperatura de  $28\text{ }^{\circ}\text{C} \pm 2$ .

### **Aceites esenciales evaluados**

Los dos aceites evaluados clavo (*Syzygium aromaticum*) y pimienta (*Piper nigrum*) fueron proporcionados por el M.C. Anselmo Hernández Pérez; sin embargo, es importante señalar que estos aceites se obtuvieron mediante la técnica de arrastre de vapor. El aceite esencial de clavo se obtiene de los botones florales y presenta un 7.9% de rendimiento (Pinto, 2015). Esta técnica consiste en generar vapor normalmente en un hervidor y luego se inyecta al destilador por donde pasa a través del material botánico. El vapor ejerce la doble función de calentar la mezcla hasta su punto de ebullición, rompiendo los glóbulos de aceite en la muestra vegetal y adicionar tensión de vapor a la de los componentes volátiles del aceite esencial; los vapores que salen de la cámara extractora se enfrían en un tubo condensador donde regresan a la fase líquida, los dos productos inmiscibles, agua y aceite finalmente se separan en un dispositivo decantador o embudo florentino. Este método es el más utilizado a nivel industrial debido a su alto rendimiento, por la pureza del aceite obtenido y la facilidad de la extracción (Bandoni, 2000; Ortuño, 2006).

### **Bioensayo. Concentraciones empleadas de los diferentes tratamientos sobre los fitopatógenos *P. cinnamomi* y *P. vexans***

Para obtener las concentraciones adecuadas de los aceites esenciales que se emplearon en la evaluación, previamente se hizo una revisión de literatura; sin embargo, para el caso del fitopatógeno *P. vexans* no hay reportes que mencionen el uso de extractos vegetales o aceites esenciales para el control de este oomiceto, por ello fue necesario desarrollar una ventana bilógica en donde se trabajó con concentraciones de hasta 800 ppm; en donde todas las concentraciones inhibieron un

100% el crecimiento del fitopatógeno, por lo que fue necesario bajar las concentraciones hasta llegar a las concentraciones adecuadas. Posterior a esto, se trabajó con tres tratamientos, aceite esencial de clavo contra *P. vexans* (T1) y pimienta contra *P. vexans* (T2) y aceite esencial de clavo contra *P. cinnamomi* (T3). Para ello, se utilizó la metodología del medio de cultivo envenenado. Las dosis utilizadas fueron: 0.025, 0.05, 0.1, 0.2 y 0.3 ppm para el tratamiento 1 y 2 sobre *P. vexans*. El T3 contra *P. cinnamomi* las dosis que se emplearon fueron: 5, 45, 80, 200, 400 ppm.

En matraces Erlenmeyer se elaboró medio de cultivo PDA, para la elaboración del medio se utilizaron 39 g del medio BD-Bioxon® por 1000 mL de agua destilada, se agitó suavemente para disolver, una vez disuelto, se tapó con papel aluminio y se esterilizó en una olla de presión a 15 libras de presión durante 15 minutos, se dejó enfriar a una temperatura aproximada de 45 °C. En la campana de flujo laminar se ajustaron las diferentes concentraciones en ppm de cada aceite, para esto, se realizó una premezcla de cada aceite para obtener la concentración requerida, con la finalidad de lograr su homogenización al verter en el medio de cultivo (PDA). Lo anterior se efectuó en tubos de vidrio de 10 mL previamente esterilizados, se agregaron 5 mL de alcohol, 0.1 g de goma xantana, con el apoyo de una micropipeta se agregaron 500 µl de Tween 80, se adicionaron las diferentes concentraciones de cada aceite esencial (T1, T2 y T3) y se finalizó haciendo una agitación con ayuda de una varilla de vidrio previamente esterilizada para homogenizar y se vació en el matraz con medio de cultivo. Cada matraz se mantuvo en agitación constante durante 5 minutos y se realizó el vaciado en cajas Petri de 8.5 cm de diámetro y se dejaron solidificar por un lapso de 24 h. Para cada concentración se establecieron 4 repeticiones y un testigo absoluto (PDA con las mismas concentraciones de Alcohol, Tween 80 y goma xantana).

Transcurridas las 24 h se realizó la siembra del explante de los fitopatógenos *P. cinnamomi* y *P. vexans*. Con ayuda de un sacabocados y aguja de disección estériles se colocaron explantes de 5 mm de diámetro de los fitopatógenos evaluados con 8 días de crecimiento y los diferentes tratamientos se incubaron en oscuridad total a 28 °C  $\pm$  2. Con el apoyo de un Vernier digital se realizaron mediciones del crecimiento

micelial cada 24 h en los 4 puntos cardinales de las cajas, finalizando la toma de datos cuando los testigos (Test) de cada fitopatógeno llenaron la caja Petri. Con los datos obtenidos se calculó el porcentaje de inhibición en *P. cinnamomi* y *P. vexans*, empleando la fórmula utilizada por Ochoa *et al.* (2012).

$$\% \text{ de inhibición} = \frac{\text{Crecimiento micelial del testigo} - \text{Crecimiento micelial del tratamiento}}{\text{Crecimiento micelial del testigo}} \times 10$$

### **Variables evaluadas**

La variable a evaluar fue el crecimiento micelial de *P. cinnamomi* y *P. vexans*. transformándose este a porcentaje de inhibición, considerando el crecimiento del testigo como el 100% de desarrollo.

### **Diseño experimental**

Se realizó un diseño experimental completamente al azar, con cuatro repeticiones por tratamiento y un testigo absoluto (PDA sin ningún control). Se evaluó el efecto inhibitorio de los aceites esenciales de clavo y pimienta sobre el crecimiento micelial de *P. cinnamomi* y *P. vexans*. Los datos se analizaron con el programa estadístico R 3.2, se sometió a un análisis de varianza y se compararon las medias mediante la prueba de Scheffe ( $\alpha=0.05$ ). Se determinaron las concentraciones medias inhibitorias y sus límites fiduciales al 95% mediante una regresión Probit por el método de máximas verosimilitud.

## RESULTADOS Y DISCUSIONES

En el (cuadro 3) se muestran los porcentajes de inhibición de los tratamientos evaluados de cada aceite esencial, en donde se observa que el porcentaje de inhibición varía dependiendo de la concentración y el extracto empleado. Estas diferencias de inhibición se pueden observar claramente en las (figuras 12, 13 y 14) del anexo.

**Cuadro 3.** Porcentajes de inhibición de los tratamientos evaluados.

<i>P. vexans</i> *		<i>P. vexans</i> **		<i>P. cinnamomi</i> ***	
Dosis (ppm)	% de inhibición	Dosis (ppm)	% de inhibición	Dosis (ppm)	% de inhibición
0.025	0	0.025	0	5	0
0.05	18.2	0.05	7	45	15.9
0.1	53.5	0.1	58.6	80	21.5
0.2	93	0.2	92.3	200	81.4
0.3	100	0.3	100	400	100

\*T1 Clavo, \*\* T2 pimienta y \*\*\* T3 clavo

En estudios anteriores del aceite esencial de pimienta, León (2017) reporta que tiene acción fungistática sobre los hongos *Fusarium solani*, *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. en donde a concentraciones de 0,3%, 0,5%, 0,7% y 1% logra inhibir hasta un 30% el crecimiento micelial, por lo que los resultados de esta investigación difieren, ya que el aceite esencial de pimienta logra inhibir hasta un 100% al oomiceto *P. vexans*, teniendo por lo tanto acción fungicida. Por otro lado, los resultados de esta investigación, las concentraciones utilizadas están por abajo a lo reportado por Kunasakdakul y Suwitchayanon (2012), donde reportan que el extracto de pimienta a concentraciones de 0.75%, 1.5% y 3% logra inhibir el 100% el crecimiento micelial del fitopatógeno *Alternaria brassicicola*.

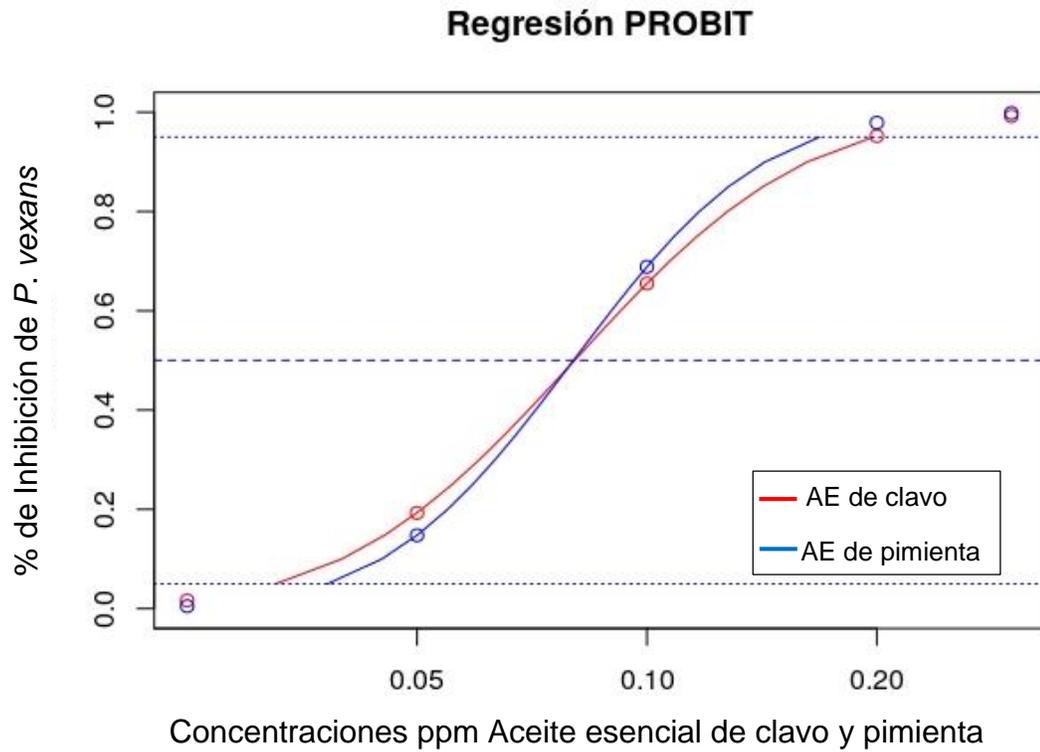
Con respecto al aceite esencial de clavo, Martínez (2015) reporta que a concentraciones de 250 y 300 ppm inhibe un 17.72% y 26.07 el crecimiento micelial del fitopatógeno *Sclerotinia cepivorum*; sin embargo, en la presente investigación a

concentraciones similares para el control de *P. cinnamomi* se obtuvo una inhibición del 100% y para el caso de *P. vexans* se obtuvo una inhibición del 100% en concentraciones más bajas.

Por otro lado, para el control de *P. cinnamomi*, en donde se obtuvo una inhibición del 100%, las concentraciones evaluadas en esta investigación están por debajo a lo reportado por Ramírez *et al.* (2007) en donde trabajó a una concentración del 50% de extracto de semilla de clavo para inhibir el crecimiento micelial del fitopatógeno *Phytophthora palmivora*. Y para el control de *P. vexans*, se logró una inhibición del 100% a concentraciones aún más bajas.

Ruíz *et al.* (2015) reportan al producto ARAW un fungicida para el control de *Botrytis* sp. a dosis de 1.6 a 4 litros por hectárea, el cual está compuesto a base de terpenos entre ellos el eugenol, compuesto principal del aceite esencial de clavo (Ribes *et al.*, 2016). El mecanismo de acción del eugenol se basa en la desnaturalización de las proteínas de la membrana del microorganismo reaccionando con los fosfolípidos y así cambia la permeabilidad de la pared celular produciendo su muerte. Por lo anterior, esta puede ser la principal razón del efecto inhibitorio que tuvo el aceite esencial contra los fitopatógenos evaluados en esta investigación.

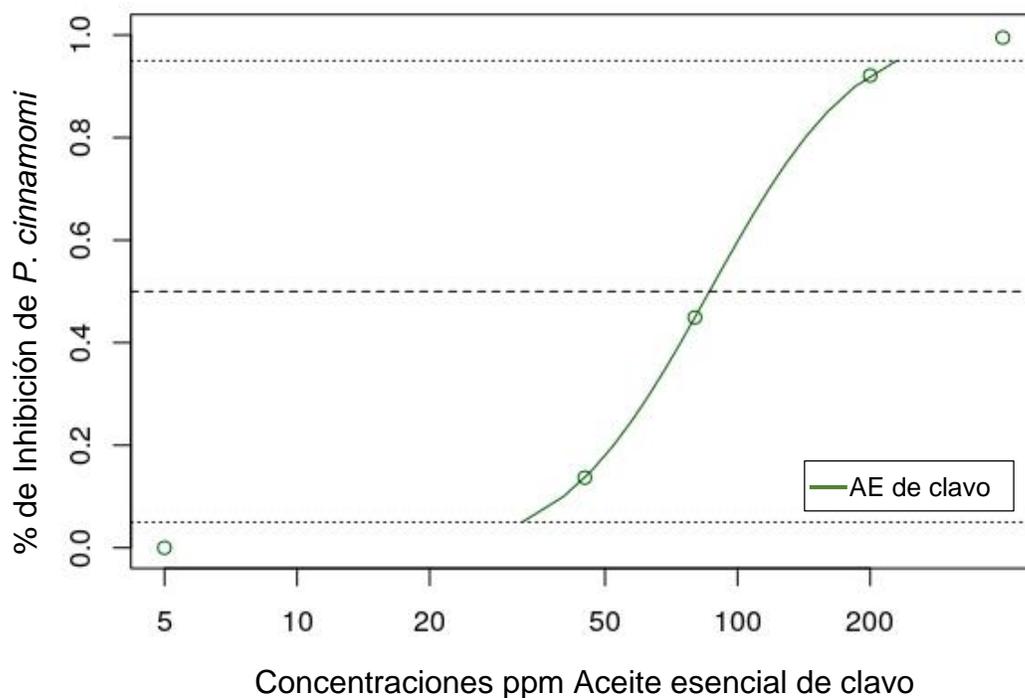
En la gráfica (figura 10) se observa que los tratamientos 1 y 2 muestran un porcentaje de inhibición similar para el control de *P. vexans*.



**Figura 10.** Porcentaje de inhibición de *P. vexans* con aceite esencial de clavo y pimienta a diferentes concentraciones.

En la gráfica (figura 11) se observa el porcentaje de inhibición del tratamiento 3 para el control de *P. cinnamomi*.

### Regresión PROBIT



**Figura 11.** Porcentaje de inhibición de *P. cinnamomi* con aceite esencial de clavo a diferentes concentraciones.

A continuación, se presentan los resultados obtenidos de los aceites esenciales evaluados, clavo (*Syzygium aromaticum*) y pimienta negra (*Piper nigrum*) para el control de *P. vexans* y *P. cinnamomi*, en donde se puede observar que los tratamientos 1 y 2 presentan una  $CL_{50}$  de 0.08 ppm, siendo los tratamientos con la concentración requerida más baja respecto al tratamiento 3, el cual presenta una  $CL_{50}$  86.29 ppm (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Concentración efectiva media de aceites esenciales para patógenos de raíz del cultivo del aguacate.

Trat*	N	GL	CL <sub>50</sub> (ppm)	LFI-LFS 95%	CL <sub>05</sub> (ppm)	CL <sub>95</sub> (ppm)	Ec. Predicción	Pvalor
1	100	4	0.08	0.06-0.09	0.033	0.19	y=4.60+4.20	7.54e <sup>-12</sup>
2	100	4	0.08	0.07-0.09	0.038	0.16	y=5.60+5.11	5.62e <sup>-15</sup>
3	100	4	86.29	69.72-106.78	32.43	229.58	y=-7.49+3.87	6.87e <sup>-09</sup>

\*Tratamiento, <sup>1</sup>*Phytophthium vexans* Clavo, <sup>2</sup> *Phytophthium vexans* pimienta y <sup>3</sup>*Phytophthora cinnamomi* clavo.

El análisis de varianza para el aceite esencial de clavo contra *P. vexans*, muestra un coeficiente de variación de 7.61%, lo cual indica que hubo homogeneidad entre las concentraciones (Cuadro 5).

**Cuadro 5.** Análisis de varianza para el aceite esencial de clavo contra *P. vexans*.

	GL	SC	CM	Pvalor	Pr(>F)
<b>Concentración</b>	4	37.58	9.39	5244	2.0e <sup>-16***</sup>
<b>Error</b>	235	0.42	0.002		
<b>Total</b>	239	38	9.392		
<b>CV</b>	7.61				

Significancia: 0 '\*\*\*\*' 0.001 '\*\*\*' 0.01 '\*\*' 0.05 '.' 0.1 ' ' 1

La comparación de medias mediante la prueba de Scheffe (Cuadro 6), se puede observar que hay diferencia significativa entre las concentraciones evaluadas, la concentración de 0.3 ppm fue la que expresó el valor medio de inhibición más alto con 1.0; sin embargo, a partir de concentraciones de 0.2 ppm se puede tener casi una completa inhibición, mientras que a 0.025 ppm produce un menor porcentaje de inhibición, teniendo una media de 0.38.

**Cuadro 6.** Comparación de medias mediante Scheffe ( $\alpha=0.05$ ) del porcentaje de inhibición del aceite esencial de clavo contra *P. vexans*.

Concentración (ppm)	N	Medias $\pm$ SD	Grupo*
0.3	8	1.00 $\pm$ 0.00	a
0.2	8	0.988 $\pm$ 0.026	a
0.1	8	0.557 $\pm$ 0.039	b
0.05	8	0.193 $\pm$ 0.070	c
0.025	8	0.38 $\pm$ 0.041	d

\*Concentraciones con diferente letra son estadísticamente significativas.

El análisis de varianza para el aceite esencial de pimienta contra *P. vexans*, muestra un coeficiente de variación de 11.97%, lo cual indica que hubo homogeneidad entre las concentraciones (Cuadro 7).

**Cuadro 7.** Análisis de varianza para el aceite esencial de pimienta contra *P. vexans*.

	GL	SC	CM	Pvalor	Pr(>F)
<b>Concentración</b>	4	43.31	10.82	238	2.00e <sup>-16***</sup>
<b>Error</b>	235	1.07	0.005		
<b>Total</b>	239	44.38	10.825		
<b>CV</b>	11.97				

Significancia: 0 \*\*\*\* 0.001 \*\*\* 0.01 \*\* 0.05 ! 0.1 ' ' 1

La comparación de medias mediante Scheffe (Cuadro 8), se puede observar que hay diferencia significativa entre las concentraciones evaluadas, la concentración de 0.3 ppm fue la que expresó el valor medio de inhibición más alto con 1.0; sin embargo, a partir de concentraciones de 0.2 ppm se puede tener casi una completa inhibición, mientras que a 0.025 ppm produce un menor porcentaje de inhibición, teniendo una media de 0.022.

**Cuadro 8.** Comparación de medias mediante Scheffe ( $\alpha=0.05$ ) del porcentaje de inhibición del aceite esencial de pimienta contra *P. vexans*.

Concentración (ppm)	N	Medias $\pm$ SD	Grupo*
0.3	8	1.00 $\pm$ 0.00	a
0.2	8	0.974 $\pm$ 0.036	a
0.1	8	0.723 $\pm$ 0.133	b
0.05	8	0.089 $\pm$ 0.049	c
0.025	8	0.022 $\pm$ 0.030	d

\*Concentraciones con diferente letra son estadísticamente significativas.

El análisis de varianza para el aceite esencial de clavo contra *P. cinnamomi*, muestra un coeficiente de variación de 19.06%, lo cual indica que hubo homogeneidad entre las concentraciones (Cuadro 9).

**Cuadro 9.** Análisis de varianza para el aceite esencial de clavo contra *P. cinnamomi*.

	GL	SC	CM	Pvalor	Pr(>F)
<b>Concentración</b>	5	157.94	31.58	2587	2.00e <sup>-16***</sup>
<b>Error</b>	906	11.06	0.012		
<b>Total</b>	911	169	31.592		
<b>CV</b>	19.06				

Significancia: 0 \*\*\*\* 0.001 \*\*\* 0.01 \*\* 0.05 \* 0.1 ' ' 1

La comparación de medias mediante Scheffe (cuadro 10) se puede observar que hay diferencia significativa entre las concentraciones evaluadas, la concentración de 400 ppm fue la que expresó un valor medio de inhibición más alto con 1.0, mientras que a 5 ppm produce un menor porcentaje de inhibición, teniendo una media de 0.002.

**Cuadro 10.** Comparación de medias mediante Scheffe ( $\alpha=0.05$ ) del porcentaje de inhibición del aceite esencial de clavo contra *P. cinnamomi*.

<b>Concentración (ppm)</b>	<b>N</b>	<b>Medias <math>\pm</math> SD</b>	<b>Grupo*</b>
<b>400</b>	12	1.00 $\pm$ 0.00	a
<b>200</b>	12	0.951 $\pm$ 0.082	b
<b>80</b>	12	0.338 $\pm$ 0.195	c
<b>45</b>	12	0.185 $\pm$ 0.167	d
<b>5</b>	12	0.002 $\pm$ 0.012	e

\*Concentraciones con diferente letra son estadísticamente significativas.

## CONCLUSIONES

Los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y pimienta negra (*Piper nigrum*) son una alternativa botánica para el control de los oomicetos *P. cinnamomi* y *P. vexans*, comprobando en esta investigación su actividad fungicida. Es relevante mencionar que *P. cinnamomi* es un fitopatógeno que presenta mayor tolerancia, ya que *P. vexans* se logra inhibir a concentraciones inferiores.

Es necesario generar más investigación sobre esta alternativa de control para oomicetos, ya que estos aceites esenciales a base de clavo y pimienta se podrían incluir en formulaciones de fungicidas botánicos, lo anterior, por las bajas concentraciones que se requieren para el control de los fitopatógenos en mención.

Es importante mencionar que el aceite esencial de clavo podría ser una alternativa novedosa para la purificación de *P. cinnamomi*, ya que algunos medios selectivos existentes permiten el crecimiento de otros oomicetos. No obstante, se necesita continuar con esta línea de investigación.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdel-Monahim, M. F., Abo-Elyousr, K. A. M., and Morsy, K. M. (2011). Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). *Crop Prot.*, 30: 185-191.
- Agrios, G.N. (2005). *Plant pathology*. 5 ed. San Diego, Estados Unidos. Academic Press. 905 p.
- Ahmet C, Saban K, Hamdullah K, Ercan K. (2005). Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochem Syst Ecol*. 33(3): 245-256.
- Alexopoulos, J. (1996). *Introducción a la Micología*. Editorial Universitaria de Buenos Aires. Buenos Aires, Argentina. 31 p.
- Álvarez de la Peña, F. J. (1979). *El aguacate*. Ministerio de agricultura. Madrid, España. 225 p.
- Andrade, HP; De León, C; Espíndola, BMC; Alvarado, RD; López, JA; García, ER. (2012). Selección de porta-injertos de aguacate para tolerancia-resistencia a *Phytophthora cinnamomi* Rands. Usando temperaturas controladas. *Spanish Journal of Rural Development*. 4:1-8.
- Andrés, A. J. L. (2015). *Plantas Leñosas Ornamentales: Control de enfermedades producidas por hongos y cromistas*. Mundi-Prensa. Madrid. España. 405 p.
- APROAM. (2005). *Características de la región Aguacatera de Michoacán*. Disponible en: <http://www.aproam.com>. Fecha de consulta: 15 de Agosto de 2016.
- Avilán, L., Rodríguez, L. y Ruiz, J. (1996). Comportamiento floral de variedades de aguacate en Venezuela. *Agronomía Tropical* 46(3): 275-287.
- Bajpai, V. K. y Kang, S. C. (2010). Antifungal Activity of Leaf Essential Oil and Extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. *Journal of the American Oil Chemists' Society*. 87: 327-336.

- Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. (2008). Review. Biological effects of essential oils. *Food and Chemical Toxicology*. 46: 446–75.
- Bandoni, A. (2000). Los recursos vegetales aromáticos en Latinoamérica. Argentina. Ed. Universidad Nacional de la Plata. 78 p.
- Barrientos, PAF; López, LL. (2000). Historia y genética del aguacate. El aguacate y su manejo integrado. Mundi-Prensa, México. Pp. 19-31.
- Batish, D., Singh, H., Kohli, R., Kaur, S. (2008). *Eucalyptus* essential oil as a natural pesticide. *Forest Ecology and Management*. 256 (12): 2166-2174.
- Benacchio, S.S. (1982). Algunas exigencias agroecológicas en 58 especies de cultivo con potencial de producción en el Trópico Americano. FONAIAP-Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias. Ministerio de Agricultura y Cría. Maracay, Venezuela. 202 p.
- Chuvieco, E. 1990. Fundamentos de teledetección espacial. Ed. Rialp, S.A. Madrid, España. 419 p.
- Benites, N. P., Meléndez, E. y Stashenco, E. E. (2009). Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada tradicionalmente en Colombia, *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromática*. 8(4):301-304.
- Bergh, BO; Ellstrand, N. (1986). Taxonomy of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearbook* 70:135-146.
- Bergh B. O. (1992). The origin, nature and genetic improvement of avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearb.* 76: 61-75.
- Bosquez M, Bautista E, Morales J. (2009). Essential oils: biopreservatives of High potential in the food industry. Universidad Autónoma Metropolitana.; Mexico.
- Bowers JH, Locke JC. (2004). Effect of formulated plant extracts and oils on population density of *Phytophthora nicotianae* in soil and control of *Phytophthora* blight in the greenhouse. *Plant Disease*. 88:11-16.

- Broadbent, P. y Baker. K.F. (1974). Comportamiento de *Phytophthora cinnamomi* en el suelo propicio para la supresión y la pudrición de raíz. Aust. J. Agric. Res. 35:121-137.
- Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods a review. International Journal of Food Microbiology. 94(3): 223-253.
- Chaieb, K., Hajlaoui, H., Zmantar, T., Kahla-Nakni, A., Kalha-Nackbi, A. B., Rouabhia, M. Bakhrouf. (2007). The chemical composition biological activity of clove essential oil, *Eugenia cayophyllata* (*Syzygium aromaticum* L. *Myrtaceae*: A short review). Phytoter resv. 21, 501-506.
- Chanderbali, A. S., H. van der Werff and S.S. Renner. (2001). Phylogeny and historical biogeography of *Lauraceae*: evidence from chloroplast and nuclear genomes. Annals of the Missouri Botanical Garden 88:104-134.
- Cock, A. D., Lodhi, A., Rintoul, T., Bala, K., Robideau, G., Abad, Z. G., Lévesque, C. (2015). *Phytophythium*: molecular phylogeny and systematics. *Persoonia - Molecular Phylogeny and Evolution of Fungi Pers- Int Mycol J*, 34(1), 25-39. doi: 10.3767/003158515x685382.
- Coffey, M. D.; Oudemans, P. and Ouimette, D. (1988). *Phytophthora citricola*: another cause of avocado decline. California Avocado Society. Yearbook 72: 127-131.
- Coffey, M. D. (1991). Strategies for integrated control of soil borne *Phytophthora* species. Cambridge, 447 p.
- Cooke DEL, Drenth A, Duncan JM, Wagels G, Brasier CM, (2000). A molecular phylogeny of *Phytophthora* and related oomycetes. Fungal Genetics and Biology 30, 17–32.
- Cowan, M. M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. American Society for Microbiology. 12: 564-565.
- Crone, M., McComb, J.A., O'Brien, P.A., Hardy, G.E.St.J., (2012). Annual and herbaceous perennial native Australian plant species are asymptomatic hosts of

- Phytophthora cinnamomi* in the *Eucalyptus marginata* (Jarrah) forest of Western Australia. Plant. Pathol. doi: 10.1111/ppa.12016.
- Dann, E., Forsberg, L., kooke, A., Pegg, K., Shivas, R., Tan, Y. (2011). The “Cylindro” complex of avocado root pathogens. En Memorias del VII Congreso Mundial del Aguacate. Cairns Australia. Pp 1-12.
- Davidson, P.M. (1997). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. En: Doyle, M.P., Beuchat, L.R., Montville, T.J. (Eds.). Food Microbiology - Fundamentals and Frontiers. ASM Press, Whashington D.C., EE.UU., 520-556.
- Davison, E., O. Ribeiro, (1996). *Phytophthora* Diseases Worldwite. American Phytopathological Society Press, Minnesota. Pp. 269-280.
- De Liñán C. & De Liñán V. (2013). Vademecum de Productos Fitosanitarios y Nutricionales. Ediciones Agrotécnicas S.L. 816 p.
- Dixon, N. R. A. (2001). Natural products and plant disease resistance. Journal of Young Investigators. 411: 843–847.
- Downer, A.J. (1998). Control de la pudrición de raíz y aguacate *Phytophthora cinnamomi* Rands en mulched suelos. Tesis de Doctorado. Univ. California Riverside, 210 p.
- FAOSTAT. (2013). Food and Agriculture Organization of the United Nations. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/home/E>. Fecha de consulta: 10 de Septiembre de 2016.
- Farr D.F., Rossmann A.Y. (2013): Fungal Databases. Systematic Mycology and Microbiology Laboratory, ARS, USDA. Available at <http://nt.ars-grin.gov/fungaldatabases/>.
- Fierro, C. D. (2011). Etiología y manejo de *Phytophthora cinnamomi* (Rands) en aguacate en Michoacán. Montecillo. Texcoco, Edo. de México. Colegio de Posgraduados 18 p.

- Fisher, K., & Phillips, C. A. (2006). The effect of lemon, orange and bergamot essential oils and their components on the survival of *Campylobacter jejuni*, *Escherichia coli* O157, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus* and *Staphylococcus aureus* *in vitro* and in food systems. *Journal of Applied Microbiology*, 101(6), 1232-1240.
- Fisher, K. y Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Food Science and Technology*. 19(3): 156-164.
- Forzza, R. C. (2010). Lista de especies Flora do Brasil. Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro. Disponible en: <http://floradobrasil.jbrj.gov.br/2010>.
- Fry, W.E. & Grünwald, N. J. (2010). Introduction to Oomycetes. The Plant Health Instructor. doi:10.1094/PHI-I-2010-1207-01.
- Galán-Sauco, V. (1988). Los Frutales tropicales en los subtrópicos. Ediciones Mundi-Prensa. Madrid.
- Gogoi, R.; P. Baruah and S. C. Nath. (1997). Antifungal activity of the essential oil of *Lisea cubeba* Pers. *J. Essential Oils Res.* 9:213-215.
- Guest, D. I., K. G. Pegg and A. W. Whiley. (1995). Control of *Phytophthora* diseases of tree crops using trunk-injected phosphinates. *Horticultural Reviews* 17:299-330.
- Gupta, M.P., T.D. Arias, N.H. Williams, R. Bos y D.H.E. Tattje. (1985). Safrole, the main component of the essential oil from of Panama. *J. Natural Products* 48, 330–343.
- Hassani, A., Fathi, Z., Ghosta, Y., Abdollahi, A., Meshkatalasadat, M. H. y Marandi, R. J. (2011). Evaluation of plant essential oils for control of postharvest Brown and gray mold rots on apricot. *Journal of Food Safety*, 32:94-101.
- Hernández, M. C. (2011). Evaluación de la esencia de tomillo (*Thymus vulgaris*) y la esencia de enebro (*Juniperus communis*) como alternativa a los fungicidas tradicionales en el control de las podredumbres de naranja (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck). Trabajo fin de carrera, Escuela Técnico Superior de Ingeniería Agronómica, Cartagena.

- Hernández, P. A. (2016). Identificación Morfológica y Molecular de los Fitopatógenos Asociados al Aguacatero en Michoacán, México. Tesis de Maestría. UAAAN. 63 p.
- Jung, T., Colquhoun, I.J., Hardy, G.E.St.J., (2013). New insights into the survival strategy of the invasive soilborne pathogen *Phytophthora cinnamomi* in different natural ecosystems in Western Australia. *Forest Pathol.* 43, 266-288. doi: 10.1111/efp.12025.
- Kalemba, D. y Kunicka, A. (2003). Antibacterial and antifungal properties of essential oils. *Current Medicinal Chemistry.* 10(10): 813-829.
- Karmen V, Bojana B, Margareta V, Pohleven F. (2003). Effect of the antifungal activity of oxygenated aromatic essential oil compounds on the white-rot *Trametes versicolor* and the brown-rot *Coniophora puteana*. *Int Biodeter and Biodegr.* 51(1): 51-59.
- Keeler, R.F. and Tu, A.T. (1991). eds. *Toxicology of Plant and Fungal Compounds.* (Handbook of Natural Toxins Vol. 6) Marcel Dekker, Inc. NY Pp. 665.
- Kim, J., Marshall, M.R., Wei, C. (1995). Antibacterial activity of some essential oil components against five foodborne pathogens. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 43: 2839-2845.
- Kliejunas, J. T. & Ko, W. H. (1975). The occurrence of *Pythium vexans* in Hawaii and its relation of Ohia decline. *Plant Disease Reporter.* 1975, 59: 5, 392-395.
- Kopp L. E. (1966). A taxonomic revision of the genus *Persea* in the western hemisphere (*Persea-Lauraceae*). *Mem. NY. Bot. Gard.* 14: 1-120.
- Kunasakdakul, K. and Suwitchayanon, P. (2012). Antimicrobial activities of chili and black pepper extracts on pathogens of Chinese kale. *Chiang Mai University Journal of Natural Sciences* 11(2): 135-142.
- Lara Ch. B. N., Gutiérrez C. M, Guillen A. H., López M. J., Vidales F. J. A. (2005). Caracterización agroclimática de la franja aguacatera del Estado de Michoacán,

- México. Memorias del II Congreso Mexicano y Latinoamericano del Aguacate, Uruapan Mich. México. Pp 2-11.
- Leão, J. D. J. (2007). Bioatividade de extratos vegetais no controle de *Sitophilus oryzae* (LINNÉ, 1763) em arroz, 91 f. Tesis de Doctorado en Agronomía. Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria, Brasil.
- León, M. C. (2017). Determinación de la acción antifúngica de los aceites esenciales de pimienta negra (*Piper nigrum*), romero (*Rosmarinus officinalis*) y orégano (*Origanum vulgare*) sobre hongos post cosecha en ají paprika (*Capsicum annuum* L.). Tesis de Licenciatura. Universidad Ricardo Palma. Lima, Perú. 72 p.
- Lévesque, C. A., & Cock, A. W. (2004). Molecular phylogeny and taxonomy of the genus *Pythium*. *Mycological Research*, 108(12), 1363-1383. doi: 10.1017/s0953756204001431.
- Llewellyn, G.C., Burkett, M.L., Eadie, T. (1981). Potential mould growth, aflatoxin production, and antimycotic activity of selected natural spices and herbs. *J. Assoc. Off Anal Chem.*, 64(4): 955-960.
- López H. (2004). Hongos del Suelo en el Cultivo de Aguacate. En: Curso de Palta Hass. Pro Hass, Lima.
- Machado, M. C.; Collazo, M.; Renaud, M. A; López, M. O.; Coto, O.; Zamora, V. Cabrera, R. I. and Boland. G. J. (2012). First report of *Phytophthora palmivora* Butler causing root rot on avocado (*Persea americana* Mill.) in Cuba. *Canadian Journal of Plant Pathology*, vol. 34, no. 2, Pp. 323-348. ISSN: 1918-1833.
- Mann, A. (2011). Biopotency role of culinary spices and herbs and their chemical constituents in health and commonly used spices in Nigerian dishes and snacks. *Afr. J. Food Sci.* 5 (3): 111-124.

- Martínez, M. J. L. (2015). Evaluación *in vitro* de Tres Extractos Vegetales para el Control de *Sclerotinia cepivorum* B. y *Sclerotinia sclerotiorum* B. en ajo *Allium sativum* L. Tesis de Licenciatura. UAAAN. 64 p.
- Medina, J., Bleinroth, E., Tango, J. y Leitedo Canto, W. (1978). Abacate. Campinas, Instituto de Tecnologías de Alimentos. Governo de Sao Paulo. 212 p.
- Mora A. A., Téliz O. D., Mora AG., Etchevers B. J. D. (2007). Tristeza de aguacate (*Phytophthora cinnamomi* In: El aguacate y su manejo integrado. Téliz O. D. y Mora A. A. (eds.) 2ª Edición. Ed. Mundi-Prensa. México. Pp.192-196.
- Morales, R. I. (1990). Pruebas de patogenicidad con diferentes tipos de inóculo de *Phytophthora cinnamomi* Rands en plantas de aguacate (*Persea americana* Mill.). Tesis de licenciatura. Universidad Nacional Autónoma de México. D.F., México.72 p.
- Morera, J. (1983). El aguacate. Unidad de Recursos Fitogenéticos. CATIE/GTZ. Turrialba, Costa Rica.
- Moura, J., Sarmiento, F. Q., de Oliveira, F., Pereira, J., Nogueira, V. y de Oliveira E. (2012). Actividad antifúngica del aceite esencial de *Eugenia caryophyllata* sobre cepas de *Candida tropicalis* de aislados clínicos. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Especies Medicinales y Aromáticas. 11(3): 208-217.
- Naeini, A.; Ziglari, T.; Shokri, H., y Khosravi, A. R. (2010). Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. Journal de Mycologie Médicale/Journal of Medical Mycology, 20(3), 174-178.
- Necha, L. L. B.; Barrera, L. J. G. (2009). Actividad antifúngica de aceites esenciales y sus compuestos sobre el crecimiento de *Fusarium* sp. aislado de papaya (*Carica papaya*). Revista UDO Agrícola. 9(1): 175-181.
- Nigam, S.S. y R.M. Purohit. (1962). Chemical examination of the essential oil of the leaves of *Piper betle*. Riechstoffe Aromen 12, 185-190.

- Ochoa F. Y. M. (2006). Variabilidad Genética y Patogénica de (*Phytophthora cinnamomi* rands) en Michoacán, México. Tesis doctoral. UAAAN. 104 p.
- Ochoa-Fuentes YM, Cerna-Chávez E, Landeros-Flores J, Hernández-Camacho S, Delgado-Ortiz J.C. (2012). Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. *Phyton*, 81: 69-73.
- Ortuño, M. (2006). Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ed. Aiyana, 1º edición. 121 p.
- Orwa C, A Mutua, Kindt R, Jamnadass R, S Anthony. (2009). Agroforestry Database: a tree reference and selection guide version 4.0 Disponible en: <http://www.worldagroforestry.org/sites/treedbs/treedatabases.asp>.
- Oxenham SK. (2003). Classification of an *Ocimum basilicum* germplasm collection and examination of the antifungal effects of the essential oil of basil [Tesis doctoral]. Glasgow: University of Glasgow.
- Pandey, A., y Singh, P. (2011). Antibacterial activity of *Syzygium aromaticum* (clove) with metal ion effect against food borne pathogens. *Asian Journal of Plant Science and Research*, 1(2), 69-80.
- Park, M.J.; Gwaka, K.S.; Yang, K.W.; Kim, E.B.; Jeung, J.W.; Chang, I.G.; Choi, A. (2009). Effect of citral, eugenol, nerolidol and  $\alpha$ -terpineol on the ultrastructural changes of Trichophyton mentagrophytes. *Fitoterapia*. 80: 290–296.
- Pegg, K. G. A. W. Whiley, y P. A. Hargreaves. (1990). Phosphonic acid (phosphorous) acid treatments control *Phytophthora* diseases in avocado and pineapple. *Plant Pathol*. 19:122-124.
- Pegg, K; Smith, L; Dann, L; Coates, L; Whiley, T. (2008). *Phytophthora* resistance in avocado rootstocks. p. 23-25 In: The Hon. Tony Burke MP Minister for Agriculture, Fisheries and Forestry presenting the RIRDC Australia Rural Woman of the Year Award 2008 to Mrs Ros Smerdon. Canberra. Vol. 19, num. 252 p.

- Pinto, B. A. (2015). Biodeterioro de bienes culturales y su control usando un biocida, a partir del *Syzygium aromaticum*. Instituto Nacional de Patrimonio Cultural doi: 10.13140/RG.2.1.4615.0641.
- Ponce, A. G, Del Valle, C. and Roura, S. I. (2004). Evaluation of plant essential oil as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). International Society for Horticultural Science. 628: 737-745.
- Ramírez-González, S.I., O. López-Báez, V. Lee-Rodríguez y M.G. Velez. (2007). Extractos vegetales para el manejo orgánico de la mancha negra *Phytophthora palmivora* del cacao. In: Agricultura sostenible. Volumen 1; Alternativas contra plagas. Rodríguez Hernández, C., M.L.I. de Bauer, C.G.S. Valdés-Lozano, y S. Sánchez-Preciado (Eds). Sociedad Mexicana de Agricultura Sostenible, CP e ITA Tlaxcala. Montecillo, Texcoco, México. Pp. 55-67.
- Ramos, L.S., M.L. Da Silva, A.I.R. Luz, M.G.B. Zoghbi y J.G.S. Maia. (1986). Essential oil of *Piper marginatum*. J. Natural Products 49, 712-713.
- Renner, S. (2004). Variation in diversity among Laurales, Early Cretaceous to present. Biologiske Skrifter Kongelige Danske 55:441-458.
- Ribes, S., Fuentes, A. Talens, P & Barat, J.M. (2016). Use of oil-in-water emulsions to control fungal deterioration of strawberry jams. Food Chemistry, 211: 92-99.
- Robin, C., Desprez-Loustau, M., Capron, G., Delatour, C. (1998). First record of *Phytophthora cinnamomi* on cork and holm oaks in France and evidence of pathogenicity. Ann. For. Sci. 50, 869-883.
- Rodríguez, C; Rodríguez, A. y De la Rosa F.S. (2014). Patogenicidad en aguacate de aislados locales de especies de *Phytophthora* y *Phytophthium*. Primera descripción de *Phytophthora niederhauserii* como Patógeno del Aguacate. XVII Congreso de la Sociedad Española de Fitopatología.
- Romero, C. S. (1993). Hongos fitopatógenos. Universidad Autónoma Chapingo. Dirección General del Patronato Universitario. 347 p.

- Ruíz-Corral J.A., Medina-García G., González-Acuña I.J., Ortiz-Trejo C., Flores-López H.E., Martínez-Parra R.A., y Byerly-Murphy K.F. (1999). Requerimientos agroecológicos de cultivos. SAGAR. INIFAP. CIRPAC. Libro Técnico No. 3. Guadalajara, Jalisco, México. 324 p.
- Ruíz, G. M.; Mulas, G. D.; Prades, L. J. and Ochoa de E. J. (2015). ARAW: Uva sin botritis y sin residuos. PHYTOMA. España. N° 274.
- SAGARPA. (2015). Secretaria de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Social, Pesca y Alimentación. Sistema de Información agroalimentaria y pesquera. Boletín Informativo. <http://www.sagarpa.gob.mx>. Fecha de consulta: 20 de Agosto de 2016.
- Saldarriaga, Y. (2001). Manual de micología aplicada. Primera edición. Universidad de Antioquia.
- Sánchez, M.E., Caetano, P., Ferraz, J., Trapero, A., (2002). *Phytophthora* disease of *Quercus ilex* in southwestern Spain. Forest Pathol. 32, 5-18.
- Schelz, Z., Molnar, J., Hohmann, J. (2006). Antimicrobial and antiplasmid activities of essential oils. Fitoterapia. 77: 279-285.
- SIAP. (2014). Sistema de Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx>. Fecha de consulta: 20 de Agosto de 2016.
- SIAP. (2016). Sistema de Agroalimentaria y Pesquera. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Disponible en: <http://infosiap.siap.gob.mx>. Fecha de consulta: 16 de Abril de 2018.
- Singh, J., Baghotia, A. y Goel, S. P. (2012). *Eugenia caryophyllata* Thunberg (Family *Myrtaceae*): A Review. International Journal of Research in Pharmaceutical and Biomedical Sciences, 3(4), 1469-1475.
- Smith C.E. Jr. (1966). Archeological evidence for selection in avocado. Economic Botany 20: 169-175.

- Sotelo, R. H. (2016). Estado del arte en el uso potencial de extractos vegetales del género *Piper* para el control de plagas agrícolas. Tesis de licenciatura. Escuela de Ciencias Agrícolas, Pecuarias y del Medio Ambiente. Cali, Colombia. 104 p.
- Srivastava, A., Srivastava, S. K. y Syamsundar, K. V. (2005). Bud and leaf essential oil composition of *Syzygium aromaticum* from India and Madagascar. *Flavour and Fragrance Journal*, 20. 51-53.
- Stashenko, E. (2000). Estudio prospectivo de aceites esenciales colombianos de interés industrial. *Universidad Industrial de Santander*. 18(1): 645-673.
- Storey W. B., B. Bergh & G. A. Zentmyer. (1986). The origin, Indigenous range, and dissemination of the avocado. *Calif. Avocado Soc. Yearb.* 70: 127-133.
- Tajkarimi, M., Ibrahim, S. y Cliver, D. (2010). Antimicrobial her and spice compounds in food. *Food Control*. 21 (19): 1199-1218.
- Tamayo, P. J. (2005). Enfermedades del aguacate. Ponencia presentada en el marco del Encuentro Nacional de la Cadena Productiva del Aguacate. 20 p.
- Téliz, D.; García, R. (1982). Manejo integrado de la tristeza del aguacatero X Congreso Nacional de Fitopatología de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Culiacán, Sinaloa. México.
- Téliz, O.D. (2000). El Aguacate y su manejo integrado. Primera edición, Mundi-Prensa, México, D. F. 219 p.
- Téliz OD, Marroquín PF (2007). Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. En Téliz OD, Mora A (Eds.) *El Aguacate y su Manejo Integrado*. 2ª ed. Mundi-Prensa. México. Pp. 3-16.
- Tsao, P.H y Oster J.J. (1981). Relación de amoníaco y ácido nitroso a la supresión de *Phytophthora* modificación en los suelos con sustancias nitrogenadas. *Phytopathology* 71:53-59.
- Vaillant, D., Romeu, C., Ramos, E., González, M., Ramírez, R. y González, J. (2009). Efecto inhibitorio *in vitro* de cinco monoterpenos de aceites esenciales sobre un

- aislado de *Rhizoctonia solani* en papa (*Solanum tuberosum* L.). Fitosanidad. 13 (3): 197-200.
- Van der Plaats-Niterink J. (1981). Monograph of the genus *Pythium*. Studies in Mycology 21, 123 p.
- Vidales F., J.A. (1996). Control de la tristeza *Phytophthora cinnamomi* del aguacatero (*Persea americana*) en la región de Uruapan, Michoacán. IV simposio La Investigación y el Desarrollo Tecnológico en Michoacán. Morelia, Mich. México.
- Villa, N. O., Kageyama, K., Asano, T., & Suga, H. (2006). Phylogenetic relationships of *Pythium* and *Phytophthora* species based on ITS rDNA, cytochrome oxidase II and  $\alpha$ -tubulin gene sequences. *Mycologia*, 98(3), 410-422. doi:10.3852/mycologia.98.3.410.
- Vitale, A., Aiello, D., Guarnaccia, V., Perrone, G., Stea, G., & Polizzi, G. (2011). First report of root rot caused by *Ilyonectria* (= *Neonectria*) *macrodidyma* on avocado (*Persea americana*) in Italy. *Journal of Phytopathology*, 160 (3), 156-159.
- Weste, G. (1994). Impact of *Phytophthora* species on native vegetation of Australia and Papua, New Guinea. *Austr. Plant Pathol.* 23:190-209.
- Whiley, A. and K.G. Pegg (1990). Manejo integrado de la pudrición de raíces causada por *Phytophthora* en paltos. En Curso Internacional de Producción, Post-Cosecha y Comercialización de Paltos. UCV, Viña del Mar-Chile. pp: L1-L5.
- Wilson, C. L.; J. M. Solar, A. El Ghaouth and M. E. Wisniewski. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81:204-210.
- Wilson, C. L., Ghaouth, A., Wisniewski M. E. and Wisniewski, M. E. (1999). Prospectin in mature's storehouse for Biopesticides. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 17: 49- 53.
- World Horticultural Trade & U. S. Export Opportunities. (2006). Avocado situation and outlook for selected countries. Disponible en: [www.fas.usda.gov](http://www.fas.usda.gov).

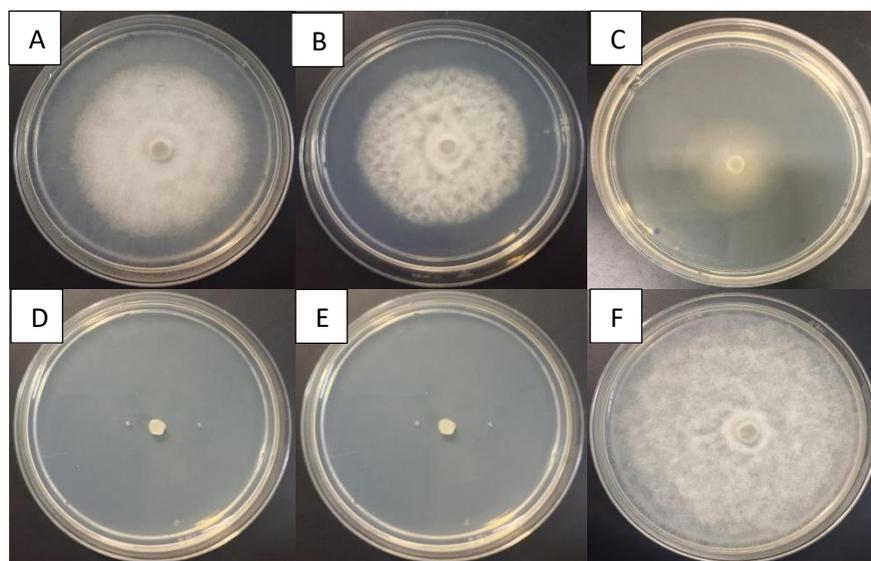
Zentmyer, G.A. (1951). Avocado diseases, Calif. Avocado Soc. Yrbk. 7: 103-106.

Zentmyer, G.A. (1980). *Phytophthora cinnamomi* and diseases it causes  
Phytopathological Monograph. Phytopathol. Soc.ST. Paul M.N., USA. 96 p.

Zentmyer, G.A. (1985). Origin and distribution of *Phytophthora cinnamomi*. California  
Avocado Society Yearbook 69:89-94.

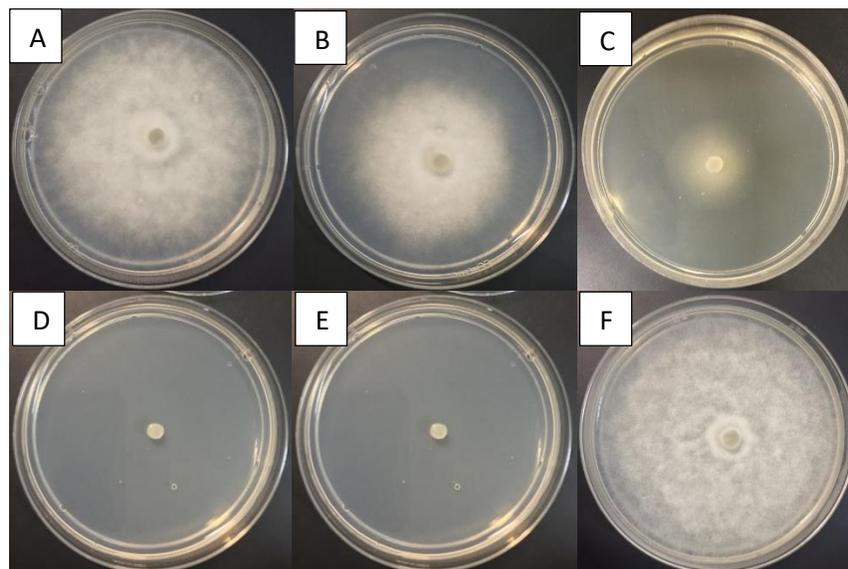
## ANEXOS

**Figura 12.** Efecto inhibitorio del aceite esencial de clavo contra *P. vexans*.



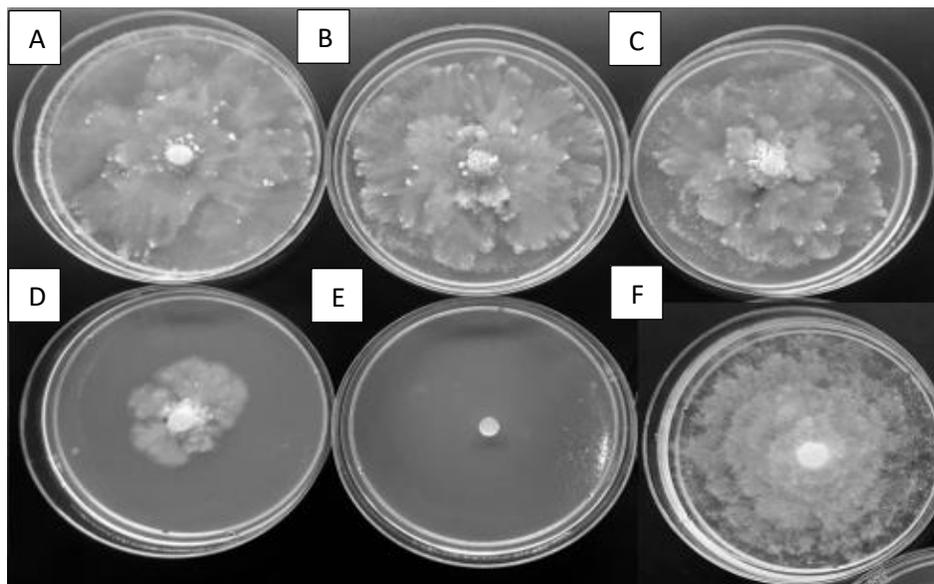
A: 0.025 ppm, B: 0.05 ppm, C: 0.1 ppm, D: 0.2 ppm, E: 0.3 ppm, F: Test.

**Figura 13.** Efecto inhibitorio del aceite esencial de pimienta contra *P. vexans*.



A: 0.025 ppm, B: 0.05 ppm, C: 0.1 ppm, D: 0.2 ppm, E: 0.3 ppm, F: Test.

**Figura 14.** Efecto inhibitorio del aceite esencial de clavo contra *P. cinnamomi*.



A: 5 ppm, B: 45 ppm, C: 80 ppm, D: 200 ppm, E: 400 ppm, F: Test.