

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO

SUBDIRECCION DE POSTGRADO



ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA *Botrytis cinerea* EN FRESA

Tesis

Que presenta ELIZABETH MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

como requisito parcial para obtener el Grado de  
MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRICOLA

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2017

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA *Botrytis*  
*cinerea* EN FRESA

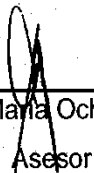
Tesis

Elaborada por ELIZABETH MARTÍNEZ HERNÁNDEZ como requisito parcial  
para obtener el grado de Maestro en Ciencias en Parasitología Agrícola con la  
supervisión y aprobación del Comité de Asesoría



Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo

Asesor principal



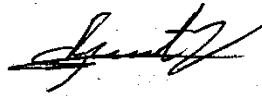
Dra. Yisa María Ochoa Fuentes

Asesor



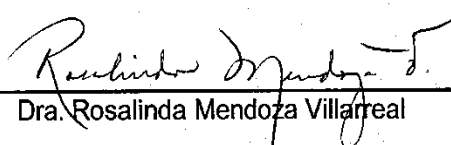
Dr. Francisco Castillo Reyes

Asesor



Dr. Roberto Arredondo Valdés

Asesor



Dra. Rosalinda Mendoza Villarreal

Subdirectora de Postgrado

UAAAN

Saltillo, Coahuila

Diciembre 2017

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro por ser de las últimas instituciones con carácter público y popular que me permitió la posibilidad de realizar un postgrado.

A la Dra. Yisa María Ochoa Fuentes por su apoyo y sus aportaciones en la realización de esta investigación.

Al Dr. Francisco Castillo Reyes por formar parte de mi comité de asesoría, por su apoyo y sobre todo por las aportaciones realizadas en esta investigación.

Al Dr. Roberto Arredondo Valdés por su apoyo, comprensión y paciencia demostrada hacia mí durante la realización de esta investigación.

A mi director de tesis el Dr. Francisco Daniel Hernández Castillo por la paciencia que me tuvo y la entrega que demostró en la realización de esta investigación.

## **DEDICATORIA**

Con mucho amor a Fidel Martí por su paciencia y sobre todo por ser el gran motivo de mi vida.

## ÍNDICE GENERAL

### Tabla de contenido

ÍNDICE DE CUADROS .....	viii
ÍNDICE DE FIGURAS .....	ix
INTRODUCCIÓN .....	3
OBJETIVO GENERAL .....	5
OBJETIVOS ESPECIFICOS.....	5
HIPOTESIS.....	5
REVISION DE LITERATURA.....	6
Generalidades e Importancia de la Fresa.....	6
Principales Enfermedades de la Fresa .....	7
Descripción del Patógeno .....	9
Descripción del género <i>Botrytis</i> .....	9
Importancia de <i>B. cinerea</i> .....	10
Condiciones ambientales .....	10
Morfología y función de las estructuras de <i>B.cinerea</i> .....	11
Ciclo de infección de <i>B. cinerea</i> .....	12
Métodos para el control de <i>B. cinerea</i> .....	14
Control cultural .....	14
Control químico .....	14
Control biológico.....	14
Resistencia de <i>B. cinerea</i> a fungicidas.....	16
Uso de plantas para el control de microorganismos patógenos .....	16
<i>Larrea tridentata</i> (Moc. & Seseé ex DC).....	18
Clasificación taxonómica .....	18
Características botánicas .....	18
Composición fitoquímica .....	19
Actividad antifúngica .....	19
<i>Agave lechuguilla</i> Torr. ....	20
Clasificación taxonómica .....	20

Características botánicas .....	20
Composición fitoquímica .....	20
Actividad antifúngica .....	20
<i>Jatropha dioica</i> Sessé ex Cerv. ....	21
Clasificación taxonómica .....	21
Características botánicas .....	21
Composición fitoquímica .....	21
Actividad antifúngica .....	22
<i>Lippia graveolens</i> Kunth .....	22
Clasificación taxonómica .....	22
Características botánicas .....	22
Composición fitoquímica .....	23
Actividad antifúngica .....	23
<i>Carya illinoensis</i> (Wangenh.) K. Koch.....	23
Clasificación taxonómica .....	23
Características botánicas .....	23
Composición fitoquímica .....	24
Actividad antifúngica .....	24
Agentes Antimicrobianos en Frutas .....	24
MATERIALES Y METODOS.....	27
Ubicación del Experimento .....	27
Colecta de Plantas.....	27
Extracción de Fitoquímicos.....	28
Análisis de Compuestos Fitoquímicos .....	28
Aislamiento del Hongo.....	29
Actividad Antifúngica de los Extractos de Plantas sobre <i>B. cinerea</i> Bajo Condiciones <i>in vitro</i> .....	29
Ensayo de microdilución.....	29
Determinación de la concentración inhibitoria al 50% (CI <sub>50</sub> ) .....	32
Actividad Antifúngica de los Extractos de Plantas sobre <i>B. cinerea</i> en Postcosecha .....	32

Material vegetal .....	32
Diseño experimental.....	32
Aplicación de tratamientos e inoculación de <i>B. cinerea</i> a frutos de fresa...	33
Variables evaluadas .....	34
<b>RESULTADOS Y DISCUSIÓN .....</b>	<b>35</b>
Fitoquímicos Presentes en los Extractos Acuosos y Etanólicos de Plantas ..	35
Identificación Morfológica de <i>B. cinerea</i> .....	38
Actividad Antifúngica de los Extractos de Plantas sobre <i>B. cinerea</i> Bajo Condiciones <i>in vitro</i> .....	40
Actividad antifúngica de los extractos acuosos resuspendidos .....	40
Actividad antifúngica de los extractos etanólicos resuspendidos .....	41
Concentraciones inhibitorias al 50% (CI <sub>50</sub> ).....	48
Actividad Antifúngica de los Extractos de Plantas sobre <i>B. cinerea</i> en Postcosecha .....	49
Incidencia de la enfermedad causada por <i>B. cinerea</i> .....	49
Severidad de la enfermedad causada por <i>B. cinerea</i> .....	51
<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>54</b>
<b>REFERENCIAS .....</b>	<b>55</b>

## ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Descripción de los tratamientos que se emplearon para evaluar su actividad antifúngica contra <i>Botrytis cinerea</i> mediante la microdilución en placa. ....	30
Cuadro 2. Tratamientos para determinar la actividad antifúngica de los extractos de plantas contra <i>Botrytis cinerea</i> en frutos de fresa. ....	33
Cuadro 3. Componentes fitoquímicos identificados en los extractos acuosos resuspendidos.....	36
Cuadro 4. Componentes fitoquímicos identificados en los extractos etanólicos resuspendidos.....	37
Cuadro 5. Dimensión de conidios y esclerocios de tres cepas de <i>Botrytis cinerea</i> aisladas de frutos de fresa.....	38
Cuadro 6. Porcentajes de inhibición de los extractos acuosos resuspendidos a 1000 ppm usados en el ensayo de microdilución contra cepas de <i>Botrytis cinerea</i> . ....	40
Cuadro 7. Porcentajes de inhibición de los extractos etanólicos resuspendidos a 1000 ppm usados en el ensayo de microdilución contra cepas de <i>B. cinerea</i> ..	42
Cuadro 8. Valores $CI_{50}$ de los extractos etanólicos resuspendidos sobre cepas de <i>Botrytis cinerea</i> . ....	48
Cuadro 9. Valores de incidencia a las 48 horas de la enfermedad causada por <i>Botrytis cinerea</i> (cepa M1) en frutos de fresa tratados con extractos etanólicos. ....	50
Cuadro 10. Valores de incidencia promedio de la enfermedad moho gris causada por <i>Botrytis cinerea</i> (cepa M1) en frutos de fresa tratados con extractos etanólicos.....	51
Cuadro 11. Valores de severidad a las 48 horas de la enfermedad causada por <i>Botrytis cinerea</i> (cepa M1) en frutos de fresa tratados con extractos etanólicos. ....	52
Cuadro 12. Índices de severidad promedio de la enfermedad moho gris causada por <i>Botrytis cinerea</i> en frutos de fresa tratados con extractos etanólicos. ....	52



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Representación de la distribución de los tratamientos y controles en una microplaca de 96 pozos. ....	31
Figura 2. Micelio, conidióforo y conidios de <i>B. cinerea</i> visto bajo el microscopio compuesto (10x) .....	39
Figura 3. Conidios observados bajo el microscopio compuesto (40x) .....	39
Figura 4. Esclerocios vistos al estereoscopio. ....	39
Figura 5. Microplaca del ensayo de microdilución con extractos acuosos resuspendidos coloreados de color violeta por el crecimiento de <i>B. cinerea</i> ....	41
Figura 6. Porcentaje de inhibición de extractos etanólicos resuspendidos de plantas sobre la cepa H1 de <i>Botrytis cinerea</i> .....	43
Figura 7. Porcentaje de inhibición de extractos etanólicos resuspendidos de plantas sobre la cepa M1 <i>Botrytis cinerea</i> . ....	44
Figura 8. Porcentaje de inhibición de extractos etanólicos resuspendidos de plantas sobre la cepa M3 <i>B. cinerea</i> .....	45

## RESUMEN

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE EXTRACTOS VEGETALES CONTRA *Botrytis cinerea* EN FRESA

Por

ELIZABETH MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

MAESTRO EN CIENCIAS EN PARASITOLOGÍA AGRÍCOLA

CALZADA ANTONIO NARRO No. 1923, BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA  
DICIEMBRE 2017

DR. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO –ASESOR-

**Palabras clave:** *Botrytis cinerea*, dilución seriada, microplaca, actividad antifúngica, inhibición.

*Botrytis cinerea* agente causal de la podredumbre gris causa daños en frutos postcosecha que se reflejan en serias pérdidas económicas. El empleo de extractos vegetales representa una alternativa frente al uso de fungicidas sintéticos para el control de este patógeno. En esta investigación se evaluó la actividad antifúngica de los extractos vegetales de *Larrea tridentata*, *Agave lechuguilla*, *Jatropha dioica*, *Carya illinoensis* y *Lippia graveolens* sobre cepas de *B. cinerea* en condiciones *in vitro* mediante el método de dilución seriada en microplaca y en postcosecha considerando la incidencia y severidad de la enfermedad en frutos de fresa. Los extractos vegetales se obtuvieron por destilación y se evaluaron nueve concentraciones. Como resultado se encontró que los extractos acuosos presentaron menos del 50 % de inhibición. Sin

embargo, el extracto etanólico de raíz de *A. lechuguilla* obtuvo una inhibición del 83%, 95% y 100% en la cepa M3, M1 y HB respectivamente. Además, el segundo extracto que demostró efectividad sobre las tres cepas ensayadas fue raíz de *J. dioica*. Por lo tanto, la composición fitoquímica de los extractos posee alta variabilidad en la actividad inhibitoria de la enfermedad. Los valores  $CI_{50}$  ( $p < 0.001$ ) más bajos fueron: hoja de *A. lechuguilla* con 209 ppm, tallo de *L. graveolens* con 89 ppm y raíz de *A. lechuguilla* con 172 ppm. En postcosecha, se observó que fresas tratadas con raíz de *A. lechuguilla* controlaron la incidencia y severidad de la enfermedad.

## ABSTRACT

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF VEGETABLES EXTRACTS AGAINST *Botrytis cinerea* IN STRAWBERRY

By

ELIZABETH MARTÍNEZ HERNÁNDEZ

MASTER IN SCIENCES IN AGRICULTURAL PARASITOLOGY

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA AGRARIA ANTONIO NARRO  
CALZADA ANTONIO NARRO No. 1923, BUENAVISTA, SALTILLO, COAHUILA  
DECEMBER 2017

DR. FRANCISCO DANIEL HERNÁNDEZ CASTILLO –ADVISOR–

**Key words:** *Botrytis cinerea*, serial dilution, microplate, antifungal activity, inhibition.

*Botrytis cinerea* causal agent of gray rot causes damage to post-harvest fruits that are reflected in serious economic losses. The use of plant extracts represents an alternative to the use of synthetic fungicides for the control of this pathogen. In this investigation the antifungal activity of the plant extracts of *Larrea tridentata*, *Agave lechuguilla*, *Jatropha dioica*, *Carya illinoensis* and *Lippia graveolens* on *B. cinerea* strains *in vitro* conditions was evaluated by means of the microplate serial dilution method and in postharvest considering the incidence and severity of the disease in strawberry fruits. The plant extracts were obtained by distillation and nine concentrations were evaluated. As a result it was found that the aqueous extracts had less than 50% inhibition. However, the root ethanolic extract of *A. lechuguilla* obtained an inhibition of 83%, 95% and 100% in the strain M3, M1 and HB respectively. In addition, the second extract that demonstrated effectiveness on the three strains tested was root of *J. dioica*. Therefore, the phytochemical composition of the extracts has high variability in the inhibitory activity of the disease. The lowest IC<sub>50</sub> values (p

<0.001) were: leaf of *A. lechuguilla* with 209 ppm, stem of *L. graveolens* with 89 ppm and root of *A. lechuguilla* with 172 ppm. In postharvest, it was observed that strawberries treated with *A. lechuguilla* root controlled the incidence and severity of the disease.

## INTRODUCCIÓN

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) es un cultivo de gran valor económico, sus frutos son apreciados por sus cualidades organolépticas, ya sea para consumo en fresco o procesado (Chaves y Wang, 2004). México es el tercer productor de fresa a nivel mundial con una producción anual de 398, 287 ton (SIAP, 2016). Sin embargo, las frutas son altamente susceptibles al ataque de hongos, principalmente por *Botrytis cinerea* agente causal de la podredumbre gris que puede atacar el cultivo en cualquier estado de desarrollo y puede infectar cualquier parte de la planta. (Plascencia *et al.*, 2012). Después de la cosecha, los frutos suelen presentar daños más severos debido a que *B. cinerea* es más destructiva en esta etapa, por lo que frutos aparentemente sanos presentan síntomas de pudrición en las cadenas de distribución y comercialización (Dean *et al.*, 2012). La aplicación de agroquímicos suele ser el método más empleado para el control de esta enfermedad, sin embargo, su uso ha generado efectos nocivos al medio ambiente y han afectado la salud de las personas por los compuestos tóxicos residuales presentes en los alimentos para el consumo humano (De Rodríguez *et al.*, 2011). Por otra parte, los fungicidas han generado la aparición de cepas resistentes a los ingredientes activos de varios fungicidas sintéticos (Leroch *et al.*, 2011).

Las plantas además de que producen metabolitos primarios que intervienen en forma directa en su crecimiento, reproducción y supervivencia también sintetizan una amplia gama de moléculas orgánicas que funcionan como atrayentes, repelentes o de protección e intervienen en sus mecanismos de defensa a plagas y enfermedades (Ávalos y Pérez *et al.*, 2012). En el norte de México crecen de manera silvestre y abundante plantas como *Larrea tridentata*, *Agave lechuguilla*, *Jatropha dioica* y *Lippia graveolens*; plantas que presentan un alto potencial en la actividad antimicrobiana (Muñoz *et al.*, 2007; Granados *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2015; Trejo *et al.*, 2015). Las primeras tres plantas citadas se caracterizan por presentar principalmente compuestos polifenólicos, mientras *A. lechuguilla* se caracteriza por su contenido de saponinas (de

Rodríguez *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2015; Trejo *et al.*, 2015). Por otro parte en la cascara de *Carya illinoensis* se presentan fenoles y taninos condensados los que le confiere acción antimicrobiana (Pinheiro *et al.*, 2009; Pinheiro *et al.*, 2014).

Por lo tanto, la elaboración de extractos vegetales representa una alternativa para el control de patógenos, además de que no provocan daños a la salud ni al medio ambiente (Pedroso *et al.*, 2012). El presente trabajo tiene como objetivos determinar bajo condiciones *in vitro* y postcosecha la actividad antifúngica de los extractos de *L. tridentata*, *A. lechuguilla*, *J. dioica*, *C. illinoensis* y *L. graveolens* frente a cepas de *B. cinerea*.

## OBJETIVO GENERAL

Determinar la actividad inhibitoria de los extractos de *Larrea tridentata*, *Agave lechuguilla*, *Jatropha dioica*, *Carya illinoensis* y *Lippia graveolens* contra *Botrytis cinerea* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch).

## OBJETIVOS ESPECIFICOS

- Determinar la actividad antifúngica de los extractos vegetales bajo condiciones *in vitro* contra cepas de *Botrytis cinerea*.
- Evaluar la efectividad biológica de los extractos en frutos de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) considerando la incidencia y severidad de la enfermedad del moho gris, *Botrytis cinerea*.

## HIPOTESIS

Existen componentes fitoquímicos de *Larrea tridentata*, *Agave lechuguilla*, *Jatropha dioica*, *Carya illinoensis* y *Lippia graveolens* con actividad antifúngica y capacidad para ser utilizadas en el control de *Botrytis cinerea* en el cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch).



## REVISION DE LITERATURA

### Generalidades e Importancia de la Fresa

La fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) es una planta herbácea perenne perteneciente a la familia Rosácea, procedente del cruzamiento de las especies americanas de *Fragaria chiloensis* y *Fragaria virginiana* que se caracteriza por producir frutos de gran tamaño (Estrada, 2011). La fresa como fruta es apreciada a nivel mundial por sus cualidades de aroma, color rojo brillante y sabor dulce que se consume en fresco o procesado (Khoshnevisan, 2013). Su uso se encuentra ampliamente dirigido a la industria, al ámbito culinario y medicinal. La fresa es considerada importante en la dieta alimenticia por su alto valor nutrimental debido a la presencia de carbohidratos, lípidos, minerales, grasas y proteínas (USDA, 2017). Además aporta cantidades importantes de flavonoides como son los flavonoles, flavanones, flavones, isoflavones y proantocianidinas que provocan inhibición de enzimas, proporcionan efectos antiinflamatorios, presentan acción antibacteriana y antiviral, actividad antioxidante, actividad vascular, secuestro de metales, etc. (Harborne y Williams, 1992; Rivas y García, 2002; USDA, 2017). Por lo tanto, la ingesta de frutas ricas en fitoquímicos previene enfermedades cardiovasculares, cerebrovasculares, cáncer y las relacionadas con la edad como son alzhéimer, cataratas entre otras (Martínez *et al.*, 2008).

De acuerdo con estadísticas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP, 2016), México es el tercer productor de fresa a nivel mundial con una producción anual de 398, 287 ton. Las exportaciones de esta frutilla represento ingresos de 650.8 millones de dólares, los cinco principales países compradores de fresa mexicana son Estados Unidos, Canadá, Brasil, Arabia Saudita y Reino Unido. A nivel nacional los cinco principales estados productores de fresa son Michoacán, Baja California, Guanajuato, Baja California Sur y Estado de México que aportan, en su conjunto, el 99 por ciento de la producción total. El estado de Michoacán contribuye con el 68.7 por ciento del volumen total; Baja California, 17.9 por ciento; Guanajuato, 9.4 por ciento;

Baja California Sur, 1.9 por ciento y el Estado de México, 1.2 por ciento. El valor estimado de la producción nacional de fresa es de cinco mil 779 millones de pesos, con un consumo per cápita anual de 1.4 kilogramos y una mayor producción en los meses de mayo, junio y julio (SAGARPA, 2016). Razón por la cual es una fuente importante de empleo en los estados productores durante épocas de cosecha y en las empresas empacadoras (Ávila y González, 2012).

### **Principales Enfermedades de la Fresa**

La fresa es un fruto no climatérico (no continua con el proceso de maduración después de cosechado) que tiene una vida de anaquel muy corta. Debido a que tiene una epidermis turgente y una tasa de respiración elevada es altamente susceptible a pérdidas de agua, daños mecánicos, deterioro por plagas y enfermedades (Fraire *et al.*, 2003; Cruz *et al.*, 2008). El daño causado por hongos fitopatógenos es de suma importancia debido a que genera pérdidas económicas considerables.

Los hongos de importancia en la fresa en postcosecha son (Guédez *et al.*, 2009; Cano, 2014):

*Mucor* spp.: es un hongo cenocítico carente de rizoides, algunas especies consideradas como contaminantes en frutas y verduras. Mientras otras especies, en el ambiente lechero desempeñan un papel importante al proporcionar cualidades organolépticas a algunos quesos, como por ejemplo, Tommes o Saint-Nectaire (Morin *et al.*, 2016; Morin *et al.*, 2017).

*Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill.: es el agente causal de la enfermedad conocida comúnmente como pudrición blanda, una de las principales enfermedades de postcosecha. Es un hongo de crecimiento rápido que puede crecer y desarrollarse en humedades relativas variables y temperaturas de 10-35°C (Plascencia *et al.*, 2012). Presenta micelio aéreo carente de septos y esporangióforos que presentan en su punta esporangios, de donde se liberan las esporangiosporas de forma elipsoidales, angulares y globosas con superficie lisa o con estrías. Los estolones y rizoides son estructuras

particulares de este hongo (Hernández *et al.*, 2006). Los frutos maduros son los más susceptibles a la infección de este patógeno, principalmente cuando presentan heridas causadas generalmente por el transporte y almacenamiento después de la cosecha. En tan solo cuatro días puede llegar a podrir totalmente los frutos causando de esta manera pérdidas económicas considerables (Velázquez *et al.*, 2008).

*Alternaria* spp.: tiene un comportamiento tanto como saprofito deteriorando alimentos y follajes, como patógeno reduciendo el rendimiento de cosechas o dañando a los vegetales almacenados (Flores *et al.*, 2015). Además, produce micotoxinas, sustancias biológicamente activas y dañinas para el ser humano. Presenta conidióforos oscuros comúnmente simples cortos a elongados y en ocasiones indistinguibles de las hifas somáticas. Las conidias son oscuras, aisladas o en cadenas acropetalas, con septos longitudinales y transversales, de forma elíptica a ovoide, elípticos o clavados y en ocasiones con un apéndice filiforme simple o ramificado (Pavón *et al.*, 2012).

*Aspergillus niger* Tiegh.: hongo encontrado en baja proporción en fresas en postcosecha (Fraire *et al.*, 2003; Guédez *et al.*, 2009). Produce micotoxinas que al ser inhalados, consumidos o absorbidos de forma cutánea provocan alteraciones dañinas a la salud de animales y personas (Pavón *et al.*, 2012). Los conidióforos de este género nacen directamente de una hifa somática con una célula basal, terminando en una vesícula sobre la que se desarrolla una gran cantidad de esterigmas primarios y secundarios o puede presentar solo una serie de esterigmas. Al madurar los esterigmas forman los conidios en cadena, los que son globosos, ovoides y unicelulares (Barnett y Hunter, 1998).

*Penicillium digitatum* (Pers.) Sacc: conocido comúnmente como moho verde, se presenta en bajos porcentajes en fresas postcosecha y también produce micotoxinas (Fraire *et al.*, 2003, Guédez *et al.*, 2009; Pavón *et al.*, 2012). El micelio de este género produce conidióforos simples, largos, erguidos que se ramifican simétrica o asimétricamente en escobilla; técnicamente se conoce como en forma penicilada. Las ramificaciones del conidióforo terminan en un

grupo de fialidas de las que se originan las cadenas conidiales. Las conidias son unicelulares, globosas a ovoides, hialinas individualmente, pero en masa dan coloración verde (Barnett y Hunter, 1998).

*Botrytis cinerea* Pers.:Fr., es uno de los hongos más importantes en fresas en postcosecha, tiende a ser altamente agresivo en tejidos maduros o senescentes (Fraire *et al.*, 2003; Dean *et al.*, 2012). A continuación, se desarrollará ampliamente.

## Descripción del Patógeno

### Descripción del género *Botrytis*

El género *Botrytis* fue constituido por Micheli en el año de 1729 (Elad *et al.*, 2007). Comprende alrededor de 22 especies y un híbrido que se caracterizan por ser necrotrófico debido a que tienen la habilidad de necrosar y provocar la muerte celular del tejido para empezar la infección (Williamson *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2011). En dicho género se encuentran especies que tienen un rango de hospederos restringidos y generalmente afectan a un único o a un número limitado de hospederos como son *B. aclada*, *B. byssoidea*, *B. squamosa*, *B. gladiolorum*, *B. tulipae*, *B. elliptica*, *B. fabae* (Elad *et al.*, 2007; Holz *et al.*, 2007). Mientras *B. cinerea* afecta a más de 200 especies de plantas (Dean *et al.*, 2012). La forma teleomorfa de *B. cinerea* Persoon: Fries es *Botryotinia fuckeliana* (de Bary Whetzel) con la siguiente clasificación (Ulloa y Hanlin, 2000):

Reino: Fungi

Phylum: Ascomycota

Clase: Discomycetes

Orden: Helotiales

Familia: Sclerotiniaceae

Género: *Botryotinia*

Especie: *B. fuckeliana*

### **Importancia de *B. cinerea***

*B. cinerea* es un patógeno de amplio espectro que infecta a numerosas plantas hospederas (Elad *et al.*, 2007). También es conocida como moho gris, se considera una importante enfermedad en el cultivo de la fresa (*Fragaria x ananassa* Duch) que puede presentarse durante el manejo del cultivo pero principalmente en periodos de postcosecha (Elad *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2007). La infección puede ocurrir desde la etapa de plántula hasta la de maduración del fruto, pero es altamente agresiva en tejidos maduros o senescentes. Después de la cosecha, los frutos aparentemente sanos suelen dañarse durante el transporte, el almacenado e incluso en la exhibición del producto en las cadenas comerciales (Dean *et al.*, 2012).

La infección de *B. cinerea* se manifiesta inicialmente con pequeñas lesiones de colores marrón claro o amarillentos que rápidamente se agrandan y a los pocos días se cubren de un micelio gris, de apariencia polvosa, llegando a cubrir toda la superficie de la fruta (Agrios, 2005). El rápido desarrollo de las pudriciones del fruto en postcosecha acorta la vida del fruto y por lo tanto provoca importantes pérdidas económicas.

### **Condiciones ambientales**

El género *Botrytis* prospera desde zonas tropicales, subtropicales, hasta áreas frías (Holz *et al.*, 2007). El crecimiento micelial ocurre desde 0°C hasta 35 °C. Sin embargo, la tasa de crecimiento es óptima a 20-22°C y tiende a disminuir por encima de los 25°C (Jarvis, 1977). Por otro parte, los conidios tienen el mismo potencial de infección sobre tejido seco, como en tejido húmedo siempre y cuando prevalezca una humedad relativa constante del 93% (Holz *et al.*, 2007). Además, para mejorar la esporulación de este patógeno es necesario 12 horas de luz (Jarvis, 1977).

### **Morfología y función de las estructuras de *B.cinerea***

De acuerdo con Beever y Weeds (2007) las estructuras de este patógeno son: micelio, conidióforos, conidios, microconidias, clamidosporas y esclerocios.

El micelio está formado por un conjunto de hifas o filamentos tabicados, cilíndricos, los cuales se multiplican de forma vegetativa mediante división citoplasmática. Se observa de color cenizo. La coloración y el tamaño de las hifas son variables debido a las condiciones de desarrollo del hongo. A partir del micelio, se forman estructuras conocidas como conidióforos, microconidios y esclerocios (Jarvis, 1977; Beever y Weeds, 2007). Las hifas que crecen de forma aérea llamadas conidióforos se encargan de formar conidios multinucleadas (Beever y Weeds, 2007). Se caracterizan por ser largos, delgados, hialinos o ligeramente pigmentados, ramificados en forma irregular y presenta células apicales redondeadas de las que nacen masas de conidios sobre pequeños esterigmas.

Los conidios son ovoides, hialinos o de color cenizo, pero se observan de color gris cuando se encuentran en masas (Barnett y Hunter, 1998). Los microconidios son uninucleados y se forman a partir de fiálides, también llamadas esterigmas, generalmente en los cultivos envejecidos del hongo que funcionan principalmente como espermacias (Jarvis, 1977; Holz *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2007). Por otra parte, las clamidosporas se forman como células terminales o intercalares a partir de micelio vegetativo. Presentan forma y tamaño variable, de color hialino y se liberan por desintegración hifal (Holz *et al.*, 2007). Los esclerocios son considerados importantes estructuras de sobrevivencia frente a condiciones ambientales adversas, y difieren en forma y en tamaño. A su vez, sirven como una fuente de inóculo primario dentro de un cultivo ya que sobreviven en los residuos de cosecha durante largos periodos. Además, tienen la capacidad de producir una cantidad considerable de conidios y pueden formar apotecios después de un proceso sexual (Holz *et al.*, 2007; Williamson *et al.*, 2007). La corteza interna de los esclerocios se constituye de melanina, proteínas y E-glucanos que los protegen del ataque microbiano, de la

deseccación, de los rayos UV y de la acción de los fungicidas (Backhouse y Willets, 1984).

Cada parte del hongo puede servir como unidad de dispersión para desarrollar de nuevo la enfermedad, sin embargo, los conidios son considerados los propágulos más importantes de dispersión del género *Botrytis*. La dispersión de estos se lleva a cabo por el viento, lluvia e insectos (Holz *et al.*, 2007).

### **Ciclo de infección de *B. cinerea***

La infección se puede dar a través de heridas, tejido muerto y/o a través de la penetración directa por aperturas naturales. El ciclo de infección completo puede durar de 3 a 4 días cuando existen las condiciones ambientales óptimas dependiendo del tipo de huésped atacado. De manera general se divide en las siguientes etapas (Holz *et al.*, 2007; Doss *et al.*, 1993; Doss *et al.*, 1995):

1. Adhesión de los conidios a la superficie del huésped: se lleva a cabo en dos etapas (Doss *et al.*, 1993; Doss *et al.*, 1995). La primera comienza después de la hidratación del conidio que se caracteriza por fuerzas adhesivas. La segunda etapa ocurre después de que el conidio ha sido incubado por varias horas bajo condiciones favorables que permiten la germinación. Por lo tanto, los tubos germinados se adhieren fuertemente al sustrato a través de la secreción de una matriz extracelular. Durante la entrada del patógeno al huésped la hifa de penetración acumula componentes del citoesqueleto en la punta de la misma, además secreta enzimas degradadoras para penetrar la pared celular de la planta.
2. Penetración del tejido vegetal. Una vez que la espora ha germinado, el tubo germinal se extiende por la superficie de la hoja buscando un sitio favorable para penetrar. Una vez que se encuentra el sitio apropiado, la elongación del tubo germinativo se detiene y la punta de la hifa se detiene y empieza a hincharse para formar el apresorio, estructura

especializada de infección. Para que este se desarrolle es indispensable la presencia de agua y de nutrientes. Además durante la formación del apresorio, la pared celular de la región inflamada contiene quitina y la capa externa se encuentra melanizada, lo que facilita la conexión entre el apresorio y la superficie del tejido vegetal (Doss *et al.*, 2003). *B. cinerea* es capaz de producir sustancias que tienen la capacidad de degradar el material vegetal y facilitar la penetración. Se refiere a la cutinasa que destruye la cutina conocida como la primera barrera de la planta, la pectinasa degrada la pectina de la pared celular y las lipasas hidrolizan esteroides de ácidos insaturados que forman parte de la cutícula y la cera de este tejido.

3. Formación de una lesión primaria. Una vez atravesado la cutícula, *B. cinerea* mata las células adyacentes al punto de penetración dando lugar a una lesión primaria que le facilita la posterior invasión de todo el tejido por la difusión de compuestos con actividad fitotóxica como toxinas, metabolitos secundarios, por ejemplo; botridial, dihidrobotridial y bocinolina.
4. Una fase de latencia en algunos casos. Es un periodo corto donde los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno. Durante esta fase las condiciones son desfavorables para el hongo, pero no muere, sino que permanece latente esperando una señal para empezar la expansión.
5. Expansión de lesiones. Una vez que el patógeno ha invadido los tejidos, la infección se establece. El hongo degrada las paredes celulares facilitándose la entrada y obteniendo nutrientes para su crecimiento. Para este fin, el hongo segrega una serie de enzimas degradativas de la pared celular entre las que se han estudiado las pectin metilesterasa, pectin liasas, endopolygalacturonasas, ciclofilinas, celulasas, etc (Prins *et al.*, 2000).



## **Métodos para el control de *B. cinerea***

### **Control cultural**

Los métodos preventivos y culturales son uno de los aspectos más importantes para el control de *B. cinerea*, siendo difícil cuando los campos de producción son extensos (Álvarez, 2012). Estas prácticas van encaminadas a reducir el inoculo y crear condiciones menos favorables para el desarrollo de la infección (Carbú, 2006). Dentro de estas prácticas se encuentran la de evitar las siembras demasiado densas en condiciones de baja luminosidad, desinfección de semillas, realización de podas y deshojados a ras del tallo, eliminación de restos de cultivo y plantas afectadas por la enfermedad tanto del interior de la parcela como los alrededores.

### **Control químico**

El uso de fungicidas ha sido durante varios años la principal vía para el control de *B. cinerea* (Taborda *et al.*, 2014). Desde el inicio de su empleo mostraron acción protectora contra plagas y enfermedades, su uso se intensificó y por la falta de información, en algunos casos, causaron la disminución de microorganismos en los suelos (Ghorbani *et al.*, 2008). Entre los fungicidas más empleados comúnmente destacan el benomilo, carbendazim, iprodione y captan, entre otros (Taborda *et al.*, 2014). Sin embargo es cada vez menos recomendable su utilización debido a los problemas de contaminación que desencadena y por otro lado, a la adaptabilidad de las cepas del hongo a los botricidas usados que ha llevado a la aparición de cepas de *B. cinerea* resistentes lo que ha hecho necesario el constante cambio de fungicidas y un incremento en las dosis empleadas (Carbú, 2006).

### **Control biológico**

Este método consiste en la utilización de microorganismos que colonizan las heridas de los tejidos dificultando la germinación de esporas de otros organismos patógenos (Carbu, 2006). Sin embargo, una de las principales

limitaciones del control biológico es el estrecho margen de condiciones ambientales en que pueden sobrevivir y actuar de forma eficaz los microorganismos, por el simple hecho de ser seres vivos. Esta limitación se acentúa en condiciones de campo y durante la formulación y conservación de los productos biológicos. La formulación de los agentes de biocontrol difiere de los productos químicos, en que, en los bioplaguicidas, estamos hablando de microorganismos vivos, y durante el proceso de formulación se han de garantizar las condiciones necesarias para mantener su viabilidad, así como también durante toda la vida útil del producto (Pérez, 2008). Sin embargo, el uso del control biológico tiene un impacto ambiental inferior al que puede producir un fungicida de síntesis químico (Flores *et al.*, 2015).

Para el control de *B. cinerea* se han usado especies del género *Trichoderma*, que desde 1970 han sido ampliamente estudiados por su alta tasa de crecimiento, abundante esporulación, alta competencia con otros microorganismos del suelo, resistencia a productos químicos y por la producción de varios antibióticos (gliotoxina y viridina), además de inducir la estimulación del crecimiento de plantas (Carbu, 2006; Calvo *et al.*, 2012). Entre ellos se encuentra *Trichoderma harzianum* y *T. lignorum* que han controlado y reducido la severidad de la enfermedad del moho gris en frutos de fresa (Merchán *et al.*, 2014). Otro hongo estudiado en el control de éste patógeno han sido *Gliocladium roseum* (Flores *et al.*, 2015; Lacherre y Ruíz, 2014), no obstante, no sólo se han utilizado hongos para el control de *B. cinerea*, sino también bacterias y levaduras. Un ejemplo de ello es la bacteria *Pseudomonas* spp. que tiene la capacidad para producir una gran variedad de metabolitos secundarios tóxicos para hongos y bacterias fitopatógenos como los antibióticos (Plascencia *et al.*, 2012). Otras bacterias estudiadas han sido especies de *Streptomyces* como *S. platensis* (Wan *et al.*, 2008) y *S. hygroscopicus* (Kim *et al.*, 2015). También se ha empleado especies de *Bacillus* como *B. subtilis* (Chen *et al.*, 2008), *B. methylotrophicus* y *B. amyloliquefaciens* (Velasco *et al.*, 2016). En relación a las levaduras existen datos de control por parte de *Saccharomyces cerevisiae* (Silva y Guerrero, 2011).

## **Resistencia de *B. cinerea* a fungicidas**

*B. cinerea* es un patógeno de alto riesgo debido a su capacidad para desarrollar resistencia a fungicidas (Weber y Entrop, 2011; Gepp *et al.*, 2012; Taborda *et al.*, 2014). Desde la década de los 60's la resistencia en este patógeno ha sido un problema importante para la protección de los cultivos debido al uso de fungicidas con un solo sitio de acción para los cuales ha mostrado resistencia (De Miccolis *et al.*, 2014). Los fungicidas que han generado resistencia en cepas de *B. cinerea* son: los benzimidazoles que funcionan como inhibidores de la formación y elongación del tubo germinativo del hongo (Yourman y Jeffers, 1999; Ponce *et al.*, 2002; Weber y Entrop, 2011; Gepp *et al.*, 2012), las dicarboximidas que afectan la osmorregulación y peroxidación lipídica (Yourman y Jeffers, 1999; Lennox y Spotts, 2003), las anilino pirimidinas que inhiben la síntesis de metionina (Latorre *et al.*, 2002; Bardas *et al.*, 2008; De Miccolis *et al.*, 2014), el grupo de QoI (Quinone outside Inhibitors) que inhiben la cadena respiratoria actuando sobre el complejo III, a este grupo pertenece la estrobilurina (Myresiotis *et al.*, 2008; Gepp *et al.*, 2012) y las carboxaminas que intervienen en la mitosis y en la división celular (Leroux *et al.*, 2010), entre otros.

## **Uso de plantas para el control de microorganismos patógenos**

Las plantas producen compuestos de naturaleza química diversa que poseen propiedades antimicrobianas, que pueden ser empleadas en el control de enfermedades que afectan a cultivos de interés económico (Pedroso *et al.*, 2012). Estos se denominan metabolitos secundarios que se sintetizan en pequeñas cantidades y no de forma generalizada, sino que se restringe a un determinado género de plantas, a una familia o incluso a algunas especies (García y Carril, 2011). La extracción, es la separación de proporciones de tejidos activos de la planta de los componentes inactivos/inertes mediante el uso de disolventes selectivos. Los productos así obtenidos son mezclas complejas de metabolitos en estado líquido o semisólido o en forma de polvo seco (Tiwari *et al.*, 2011). Durante la extracción, los solventes entran en contacto con el sólido y solubilizan compuestos con polaridad similar (Ncube *et*

*al.*, 2008). La obtención de los extractos vegetales es variable y el estudio de sus compuestos activos propicia su empleo contra diferentes hongos. Además de ser degradables y manifestar un mínimo impacto negativo sobre la salud humana y el medio ambiente son de bajo costo (Pedroso *et al.*, 2012). Las concentraciones de los compuestos tóxicos en las especies de plantas varían dependiendo de diversos factores muy confusos, incluyendo las tensiones ambientales sobre la planta, la edad, la susceptibilidad individual, las condiciones partes de la planta (raíz, tallo, hojas y semillas), y la temporada del año (Wong *et al.*, 2010). Por lo tanto la efectividad antimicrobial del extracto vegetal también se ve afectada (García y Carril, 2011). Entre las principales clases de compuestos tóxicos y químicos que se producen son polifenoles, alcaloides, terpenos, taninos, glucósidos cianogénicos y saponinas entre muchos otros (Wong *et al.*, 2010).

Los polifenoles o también llamados compuestos fenólicos contienen un grupo fenol. Dentro de estos se encuentran taninos, flavonoides y cumarinas. Los taninos se clasifican en hidrolizantes y condensados, estos se unen a la proteína rica en prolina e interfieren con la síntesis de proteínas y en la inhibición de la actividad enzimática (Yamaguchi y Okuda, 1998; Yadav y Agarwala, 2011). Mientras los flavonoides penetran la membrana celular, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos (Puupponen *et al.*, 2001). Las cumarinas actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de la germinación (García y Carril, 2011). Los alcaloides son compuestos nitrogenados que actúan mediante intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo (Domingo y López, 2003). Los terpenos son uno de los grupos más extensos y diversos de metabolitos secundarios de plantas en el que incluyen esteroides y terpenos los cuales pueden acumularse como conjugados de glucósidos en cantidades sustanciales en las plantas. Estos glucósidos, que incluyen glucoalcaloides esteroideos o bien glicósidos triterpénicos y glicósidos esteroideos que se conocen comúnmente como saponinas (Ncube *et al.*, 2008). Por tanto, pueden ser triterpenoides o

esteroides que contienen uno o más moléculas de azúcar en su estructura. Las saponinas actúan permeabilizando las membranas celulares provocando lesiones que aparecen como agujeros debido a que forman complejos con esteroides, proteínas y fosfolípidos de membranas citoplásmicas (Baumann *et al.*, 2000; Stuardo y San Martín, 2008).

México tiene una extensa variedad de plantas, siendo el cuarto país más rico del mundo en este aspecto (de Rodríguez *et al.*, 2011). De acuerdo con Adame y Adame (2000) se encuentran 25,000 especies registradas, y aproximadamente 30,000 no descritas. Dentro de estas se encuentran más de 3,500 especies de plantas medicinales identificadas y clasificadas (Aguilar *et al.*, 2008). En particular las plantas de las aéreas semidesérticas representan una fuente potencial de antimicrobianos (Castillo *et al.*, 2010). Entre ellas se encuentran las especies de *L. tridentata*, *A. lechuguilla*, *J. dioica* y *L. graveolens*.

### ***Larrea tridentata* (Moc. & Seseé ex DC)**

#### **Clasificación taxonómica**

*L. tridentata* pertenece a la familia Zygophyllaceae, es una especie perenne que se encuentra ampliamente distribuida en las zonas áridas de los desiertos Mojave, Sonorense y Chihuahuense (Barbour, 1969). En México se le conoce comúnmente como gobernadora debido a la dominancia en las grandes extensiones de las zonas áridas del norte de México (Lira, 2003).

#### **Características botánicas**

Es un arbusto perenne xerófilo de olor fuerte, variable en altura de 0.5 a 4 m en función a nivel de diploidia (diploide 86 cm, hexaploide 112 cm y tetraploide 138 cm) con una amplia cobertura. No hay un tallo principal, pero las ramas gruesas crecen vertical u oblicuamente desde la corona radicular y se hace dicotómica lateralmente (Coyle y Roberts, 1975). Las hojas son pequeñas y bifoliadas, de un verde oscuro a verde amarillento con cutículas gruesas y una capa resinosa,

tienen pecíolos cortos y crecen opuestas en las ramas. Las flores son amarillas, usualmente aparecen al final del invierno o a principios de la primavera, pero pueden florecer en cualquier momento después de una lluvia; crecen cerca de las terminaciones de los retoños jóvenes como capullos solitarios con cinco pétalos, y su polen y néctar atraen muchas abejas (unas 30 especies diferentes). Los frutos son pequeños (4 a 7 mm de diámetro), tienen una cubierta vellosa y contienen cinco semillas que se esparcen en primavera y al principio del otoño por el viento y la lluvia (Shreve y Wiggins, 1964; Coyle y Roberts, 1975).

### **Composición fitoquímica**

Los principales compuestos reportados en esta planta son muy numerosos: lignanos fenólicos, flavonoides, saponinas, triterpenos, taninos, carbohidratos, aminoácidos, glucósidos, quercitina, triterenos, triterpenoides y minerales (Brinker, 1993; Martins *et al.*, 2013).

### **Actividad antifúngica**

Extractos realizados con esta planta se han empleado para el control de hongos (Lira, 2003). Por ejemplo, en estudios realizados por Velásquez (1981) en condiciones *in vitro*, los extractos etanólicos de *L. tridentata* a una concentración de 2000 ppm inhibieron el crecimiento de *Cytospora* sp. (anamorfo de *Eutypa armeniaca*) e inhibió la germinación de las ascosporas de *E. armeniaca* a la misma dosis, pero con extractos a base de etanol y cloroformo. Verastegui (1996) reportaron la inhibición de diversos actinomicetos y hongos, entre los que destacan: *Microsporum canis*, *Microsporum gypseum*, *Trichophyton tonsurans*, *Epidermophyton floccosum*, *Sporothrix schenckii*, *Nocardia asteroides* y *Nocardia brasiliensis*. Castillo *et al.*, 2015 encontraron efectos de inhibición del 93.13% de *Rhizoctonia solani* con extractos etanólicos de esta planta a una concentración de 1000 ppm.

## ***Agave lechuguilla* Torr.**

### **Clasificación taxonómica**

La lechuguilla (*A. lechuguilla*) pertenece a la familia Agavaceae, es una planta nativa de las zonas áridas y semiáridas del sur de Estados Unidos de América y del noreste de México hasta los centrales estados de Querétaro, Hidalgo y Guanajuato de México (Castillo et al., 2011).

### **Características botánicas**

Es un arbusto roseto filoso pequeño con 20-50 hojas, se reproduce por estolones. El tallo floral crece desde numerosas hojas centrales y las flores solo aparecen una vez de los 6 a los 15 años. Sus hojas son de 30-60 cm de largo y de 2-3 cm de ancho, lineares, generalmente falcadas, redondas abajo y ancladas arriba, los márgenes con 8-12 dientes dispuestos hacia abajo. Además la planta puede alcanzar de 20 a 70 cm de altura (Hernández et al., 2005).

### **Composición fitoquímica**

Se han identificado la presencia de sapogeninas, terpenos sin azúcar en su estructura, como esmilagenina, gitogenina, esmilagenina (sapogenina esteroidea), yucagenina, gitogenina, hecogenina, tigogenina, diosgenina, gentrogenina, clorogenina y ruizgenina (Blunden et al., 1980). Contiene una alta concentración de saponinas esteroidales (Hernández et al., 2005; Verástegui, 1995), azúcares como la glucosa y sacarosa (De Rodríguez et al., 2011).

### **Actividad antifúngica**

En estudios realizados por Castillo et al., (2015) el uso del extracto etanólico de lechuguilla inhibió 100% el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* a una concentración de 200 ppm de polifenoles totales. Mientras que, a una concentración de 500 µl/ L de extracto presento 100% de inhibición sobre *Colletotricum gloeosporoides* (De Rodríguez et al., 2011). Además tiene efecto

sobre hongos levaduriformes, filamentosos y actinomicetos (Verástegui, 1995; Verástegui *et al.*, 2008).

### ***Jatropha dioica* Sessé ex Cerv.**

#### **Clasificación taxonómica**

*J. dioica* se encuentra clasificada dentro del dominio Eukarya, pertenece a la división Magnoliophyta, clase Magnoliopsida y orden Euphorbiales (Martínez *et al.*, 2014). Esta planta es originaria de México comúnmente conocida como sangre de drago, sangre de grado o sangregado (Wong *et al.*, 2010).

#### **Características botánicas**

*J. dioica* es un subarbusto o arbusto perenne escasamente leñoso que va desde los 30 hasta los 150 centímetros de altura (Wong *et al.*, 2010). Generalmente forman colonias, debido a sus rizomas, de ellos salen raíces y tallos semileñosos que se dirigen al exterior. Los tallos son flexibles y de coloración negro-rojizo. La principal característica de este arbusto es que al ser cortados segrega un látex incoloro que en contacto con el aire se torna rojizo semejante a la sangre, de ahí el nombre común de sangre de drago (BDMTM, 2009; Martínez *et al.*, 2014). Las hojas son deciduas agrupadas en fascículos generalmente más largas que anchas que aparecen únicamente en la época de lluvias. Las flores son pequeñas y agrupadas en cimas o fascículos, su corola es de blanquecina a rosada. Los frutos son asimétricos de aproximadamente 1,5 cm de diámetro y sólo cuentan con una semilla de color café de un cm de diámetro (BDMTM, 2009a; Manzanero *et al.*, 2009; Martínez *et al.*, 2014).

#### **Composición fitoquímica**

En la raíz se han identificado diterpenos, la citlalitrióna, jatrofona, y riolosatriona y un esteral, el R-sitosterol. También se han obtenido aceites esenciales, saponinas, alcaloides y ácido oxálico. Mientras en los tallos emana un latex rico en taninos (BDMTM, 2009a). Martínez *et al.*, (2014) identificó en la raíz de *J. dioica* compuestos como alcaloides, triterpenos, esteroides, saponinas,



cumarinas, aceites esenciales, carbohidratos, azúcares reductores, flavonoides, fenoles y taninos. Trejo *et al.*, 2015 encontraron en extractos etanólicos de Sangre de drago polifenoles como ácidos vanílico, tartárico y cítrico, así como naringinol, resorcinol, y resveratrol.

### **Actividad antifúngica**

*J. dioica* es una especie muy poca estudiada en el control de hongos. En el ensayo realizado por Trejo *et al.*, (2015) con el extracto etanólico de *Jatropha* sp. obtuvieron el 93.2% de inhibición en el crecimiento micelial de *B. cinerea* a una concentración de 2000 ppm. Salas (2013) obtuvo un efecto positivo sobre *F. oxysporum* con extractos del tallo de *J. dioica* al controlar la severidad e incidencia en plantas de tomate.

## ***Lippia graveolens* Kunth**

### **Clasificación taxonómica**

*L. graveolens* pertenece a la familia Verbenaceae. En México es conocido como cacachica, orégano, salvia de castilla o hierba dulce (BDMTM, 2009b). El orégano es una planta de distribución mundial que se adapta a zonas secas y semisecas de regiones áridas y semiáridas, con suelos pedregosos (García *et al.*, 2012).

### **Características botánicas**

Es un arbusto pequeño que puede crecer hasta los 2 m de altura, tiene hojas oblongas con 4 a 6 pedúnculos por nudo, flores en espigas subglobosas, corolas blancas o amarillas, zigomorfas. También presenta inflorescencias indeterminadas de tipo espiga capitadas con un número de flores por inflorescencia muy variable (de 2 a 20). Siempre con flores hermafroditas pequeñas (4mm) (BDMTM, 2009b; García *et al.*, 2012).

### **Composición fitoquímica**

En plantas de orégano se ha encontrado compuestos como: resveratrol, catequina y luteolina (Trejo *et al.*, 2015). Además flavonoides (García *et al.*, 2012), azúcares reductores, taninos, saponinas (Dahiya y Purkayastha, 2012). Por su parte García *et al.*, (2017) encontraron en la raíz y en la parte aérea de *L. graveolens* sustancias como: aceites esenciales, 10 o más iridoides, dos flavonoides, una naftoquinona y 23 flavonoides.

### **Actividad antifúngica**

Extractos etanólicos de *L. graveolens* a 500 µl/ L presentaron un efecto fungicida del 100% contra *R. stolonifer* y una inhibición de 100% en el crecimiento micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* (de Rodríguez *et al.*, 2011). Mientras el aceite esencial *L. origanoides* en las concentraciones más altas (500 mg/ L) presentaron los mayores porcentajes promedio de inhibición (66.2%) sobre *B. cinerea* (Andrade *et al.*, 2014).

## ***Carya illinoensis* (Wangenh.) K. Koch**

### **Clasificación taxonómica**

*C. illinoensis* pertenece a la familia Juglandaceae y es nativa del sur de estados unidos y del norte de México (Hancock, 1997). Es comúnmente conocida como nogal. En México se encuentra distribuido en forma natural en 13 estados, siendo los más importantes Coahuila, Chihuahua y Nuevo León (Brison, 1976).

### **Características botánicas**

El nogal es una planta angiosperma, dicotiledónea, leñosa, de hábito arbóreo de 30 a 45 m de alto y 2 m de diámetro, caducifolio, con hojas compuestas sésiles imparipinnadas, con folíolos opuestos de 5 a 10 cm de largo, donde cada hoja puede tener entre 9 y 17 folíolos de borde aserrado, la distribución de las hojas es alterna, el color es variable entre amarillo-verde en el cultivar

“Desirable” al extremo obscuro de “Pawnee”. El nogal pecanero es una fanerógama diclino-monoica con flores unisexuales, de amentos erectos de estambres, las masculinas y péndulos de estigmas las femeninas, con dicogamia y polinización anemófila. Su fruta es un drupáceo, monospermo dehiscente con endocarpio endurecido (Wagner y Hazel 2005; de la Rosa *et al.*, 2010).

### **Composición fitoquímica**

En la cáscara de *C. illinoensis* se han identificado taninos y fenoles totales (do Prado *et al.*, 2009; Osorio *et al.*, 2010; do Prado *et al.*, 2014) y en las hojas se ha encontrado el ácido gálico (Bottari *et al.*, 2017).

### **Actividad antifúngica**

Osorio *et al.*, (2010) emplearon extractos polifenólicos de cáscara de nuez de nogal pecanero (*C. illinoensis*) para evaluar su actividad sobre ocho especies patogénicas, entre ellas *Pythium* sp., *Colletotrichum truncatun*, *C. coccodes*, *Alternaria alternata*, *Fusarium verticillioides*, *F. solani*, *F. sambucinum* y *R. solani*. Estos extractos tuvieron un efecto fungistático contra *A. alternata*, *F. solani* y *F. verticillioides*, mientras que mostraron un efecto fungicida contra *Pythium* sp., *C. coccodes*, *C. truncatun*, *F. sambucinum* y *R. solani*. Mientras do Prado *et al.*, (2014) con extractos de cascara de nuez de nogal pecanero con altas concentraciones de polifenoles y taninos condensados obtuvieron una actividad antimicrobiana contra *Listeria monocytogenes*, *Staphylococcus aureus*, *Vibrio parahemolyticus* y *Bacillus cereus*.

### **Agentes Antimicrobianos en Frutas**

Para prolongar la vida postcosecha de los productos hortofrutícolas se han empleado diferentes tecnologías, entre ellas atmosferas controladas, almacenamiento a bajas temperaturas, la utilización de empaques plásticos para crear atmosferas modificadas, la aplicación de tratamientos hidrotérmicos entre otros (Quezada *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2010). Además, se ha usado

recubrimientos a base de proteínas, polisacáridos y lípidos así como el envasado activo cuyo término hace referencia a la incorporación de ciertos aditivos al material de envase o en el envase (Alarcón *et al.*, 2015). Los recubrimientos son una cubierta o película que se pre-forma o forma directamente sobre la superficie de los productos vegetales (Ramos *et al.*, 2010). Estos se han empleado para alargar la vida de anaquel de productos frescos y mínimamente procesados además de servir de protección de los efectos dañinos del medio ambiente. Por lo tanto se crea una barrera física para controlar la pérdida de humedad, reducir la respiración, restringir el intercambio de compuestos volátiles entre el producto fresco y el ambiente que lo rodea, y actúan como vehículos de otros ingredientes funcionales tales como agentes antimicrobianos microbianos, antioxidantes, nutraceuticos, entre otros (Ruelas *et al.*, 2013; Alarcón *et al.*, 2015). El uso de antimicrobianos en la industria de alimentos ha sido ampliamente usado. Los antimicrobianos son compuestos químicos añadidos o presentes en los alimentos que retardan el crecimiento microbiano o inactivan a los microorganismos y por lo tanto detienen el deterioro de la calidad y mantienen la seguridad del alimento (Davidson *et al.*, 2013). Sin embargo, la tendencia hoy en día, es el consumo de alimentos frescos y sanos mínimamente procesados, es por ello que se han buscado antimicrobianos naturales (Sauceda, 2011). La FDA (Administración de alimentos y drogas) es la agencia federal en Estados Unidos de América con la autoridad legal que regula los alimentos, sus ingredientes, incluidos los aditivos y también define requisitos de etiquetado. Esta agencia considera a los agentes antimicrobianos de origen natural, como sustancias del tipo GRAS (generalmente reconocidos como seguros) permitidos en la alimentación para el consumo humano, en el que productos vegetales de los que se obtienen aceites esenciales, oleorresinas, y extractos naturales incluyendo a sus destilados para su uso como agentes antimicrobianos (FDA, 2017). Estos se incluyen en una base de datos llamada EAFUS, debe su nombre a las iniciales de "Everything Added to Food in the United States" (Todo lo que se agrega a la comida en los Estados Unidos) desarrollado por la FDA, que muestra un listado de sustancias

que pueden adicionarse a un alimento. La base de datos EAFUS incluye sustancias añadidas directamente a los alimentos que han sido aprobadas como aditivos por la FDA (a partir de la citada enmienda de 1958) o que bien tengan la consideración de sustancias GRAS. Proporciona el código numérico utilizado internacionalmente para identificar las sustancias químicas llamado CAS RN (Número de registro CAS) para ser localizado en la base de datos y además muestra las referencias legislativas referentes a los límites y usos admitidos de la sustancia química que deben ser consultados en el Código Electrónico de Regulaciones Federales (e-CFR). Dentro del subcapítulo B- alimentación para el consumo humano se desprende el apartado de sustancias GRAS dentro de la cual se encuentran las especias y otros condimentos y saborizantes naturales reconocidos como inocuos. Entre ellos se encuentran: anís, albahaca, alcaparras, pimienta, manzanilla, canela, cilantro, comino, mejorana, nuez moscada, orégano (oreganum, orégano mexicano), salvia mexicana, pimienta, tomillo entre otros. Mientras en el apartado de aceites esenciales, oleoresinas (sin solventes) y extractos naturales (incluyendo destilados) reconocidos como inocuos se encuentran: anís, hojas de laurel, albahaca, cacao, flores de manzanilla, corteza de canela, flor de canela, corteza de nogal (*Carya* spp.), entre otros (EAFUS, 2013). Las plantas de *A. lechuguilla*, *J. dioica* y *L. tridentata* aún no se encuentran dentro de la lista de sustancias GRAS, no obstante se puede solicitar la adición como un nuevo aditivo o uso del mismo mediante el procedimiento que se conoce como “Petition” (petición), durante el cual las empresas interesadas deberán aportar información y estudios que permitan a la FDA valorar la conveniencia o no de su autorización (FDA, 2017)

## MATERIALES Y METODOS

### Ubicación del Experimento

El presente trabajo se llevó a cabo en el laboratorio de Fitopatología de Postgrado en el departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN), en Saltillo, Coahuila México.

### Colecta de Plantas

La recolección de las plantas se efectuó en el municipio de General Cepeda, Coahuila, México, cerca de la carretera estatal 105 localizada a una latitud de 25°21'40.55" N y longitud de 101°28'08.68" W a una altitud de 1,507 msnm, durante el mes de enero del 2016, excepto *L. graveolens* que se realizó en el mes de octubre del mismo año. Las plantas se trasladaron en bolsas plásticas debidamente etiquetadas al laboratorio de la universidad. La identificación taxonómica de género y especie de las plantas fue llevada a cabo por especialistas del departamento de taxonomía de la UAAAN.

Las muestras se lavaron suavemente con agua corriente para la eliminación de residuos contaminantes (polvo, excremento de animales, residuos de plásticos, etc.), procurando no dañarlas y se dejaron secar sobre papel estraza bajo condiciones de laboratorio (Reyes *et al.*, 2015). Se realizó la separación de hojas, tallo y raíz, de acuerdo a la especie; para *L. tridentata* solamente se utilizaron las hojas, para *L. graveolens* se separaron hojas y tallo, para *A. lechuguilla* se separaron hojas y raíces, mientras que para *J. dioica* solamente se usó el tallo y para *C. illinoensis* sólo el ruzno. El tejido vegetal se deshidrato a temperatura ambiente durante un mes hasta presentar un peso constante en tres días. Las plantas ya secas, se trituraron en un molino manual para granos (Surtek) y se molieron en una licuadora (Oster) para después pasarlas por un tamiz de 1 mm de abertura (No.18) hasta obtener un polvo fino el cual fue almacenado y protegido de la luz en recipientes oscuros a temperatura ambiente hasta su uso.

## Extracción de Fitoquímicos

Para obtener el extracto de cada planta se siguió el método descrito por Shami *et al.*, (2013) con algunas modificaciones en el que se usó etanol (96%) y agua como solventes para la preparación de extractos resuspendidos. En un matraz Erlenmeyer de 1 L cubierto con papel de estraza, se agregaron 42 g de polvo fino de muestra vegetal y 750 mL de solvente y se agitó en una parrilla agitadora (Thermo Scientific Cimarec) durante 72 h a 50°C de temperatura. Posteriormente el extracto se filtró con ayuda de una bomba de vacío utilizando papel Wattman de No.1 colocado sobre el embudo Büchner, recolectando el filtrado en un matraz Kitasato de un litro de capacidad (Castillo *et al.*, 2015). El solvente del extracto filtrado, excepto el de hoja de *A. lechuguilla* acuoso, que se calentó a parilla a 50°C de temperatura hasta obtener una consistencia viscosa, fue eliminado bajo vacío usando un rota evaporador (IKA Rotary Evaporator HB10 y RV10 digital) a una temperatura de 60-70°C para los acuosos, y de 90°C para los etanólicos a 200 rpm, el solvente restante fue eliminado colocando el vaso de precipitado en una estufa de secado (Arsa) a una temperatura de 37°C durante 15 días. El extracto completamente seco fue raspado y almacenado en tubos Eppendorf en un congelador a una temperatura de -10°C.

## Análisis de Compuestos Fitoquímicos

La identificación de compuestos fitoquímicos de los extractos acuosos y etanólicos se llevaron a cabo cualitativamente mediante las pruebas colorimétricas reportadas por Sahgal *et al.*, (2009) y Usman *et al.*, (2009). Para estas pruebas los extractos se prepararon a razón de 1000 mg/L y se realizó la detección de: alcaloides (Prueba de Dragendorf y Sonneschain); azúcares reductores (Prueba de Feling y Benedict); carbohidratos (Prueba de Molisch's); carotenoides ( $H_2SO_4$  y  $FeCl_3$ ); cumarinas (Prueba de Erlich); esteroides y terpenos (Prueba de Liberman-Burchard y Rhosenthalert); flavonoides (Prueba de Shinoda y de NaOH); glicósidos cianogénicos (Prueba de Grignard); purinas (Prueba de HCL); quinonas (Prueba de Hidróxido de amonio,  $H_2SO_4$  y

Borntraguer); saponinas (Prueba de Espuma) y taninos (Prueba de Gelatina y  $\text{FeCl}_3$ ,  $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ ).

### **Aislamiento del Hongo**

*B. cinerea* se obtuvo de frutos de fresa de diferentes sitios comerciales infectados naturalmente, que presentaban lesiones de color marrón claro o amarillento y en ocasiones con presencia de micelio gris de apariencia polvosa. Para su aislamiento se realizaron bajo condiciones de asepsia pequeños cortes en el área de avance de la enfermedad, los cuales se desinfectaron en una solución de cloro al 3% durante 3 min y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, luego se dejaron secar sobre papel estéril. Una vez secos se colocaron sobre placas Petri que contenían medio Papa-Dextrosa-Agar (PDA) adicionado con fungicida Benomil a una concentración de 1500 ppm y se incubaron durante 10 días a 22°C. Los cultivos monospóricos se obtuvieron al aislar esporas individuales y se transfirieron en medio PDA.

Se realizaron preparaciones microscópicas del crecimiento micelial del hongo con azul de lactofenol. Se midió el largo y ancho de hifas y de 20 conidios mediante la cámara Dino-Eye (Dino-Eye Eyepiece Camera), previamente calibrada, adaptada a un microscopio compuesto (Olympus). Para la medición de 10 esclerocios la cámara se adaptó a un microscopio estereoscopio (Carl Zeiss). Para la identificación del hongo se consideraron las características morfológicas descritas por Jarvis (1977), Beever y Weeds, (2007) y Mirzaei *et al.*, 2008.

### **Actividad Antifúngica de los Extractos de Plantas sobre *B. cinerea* Bajo Condiciones *in vitro***

#### **Ensayo de microdilución**

La técnica de microdilución seriada en placa descrita por Eloff (1998) para bacterias patogénicas de humanos y modificada por Motsei *et al.*, (2003) y Masoko *et al.*, (2005) para hongos patógenos de humanos y animales fue



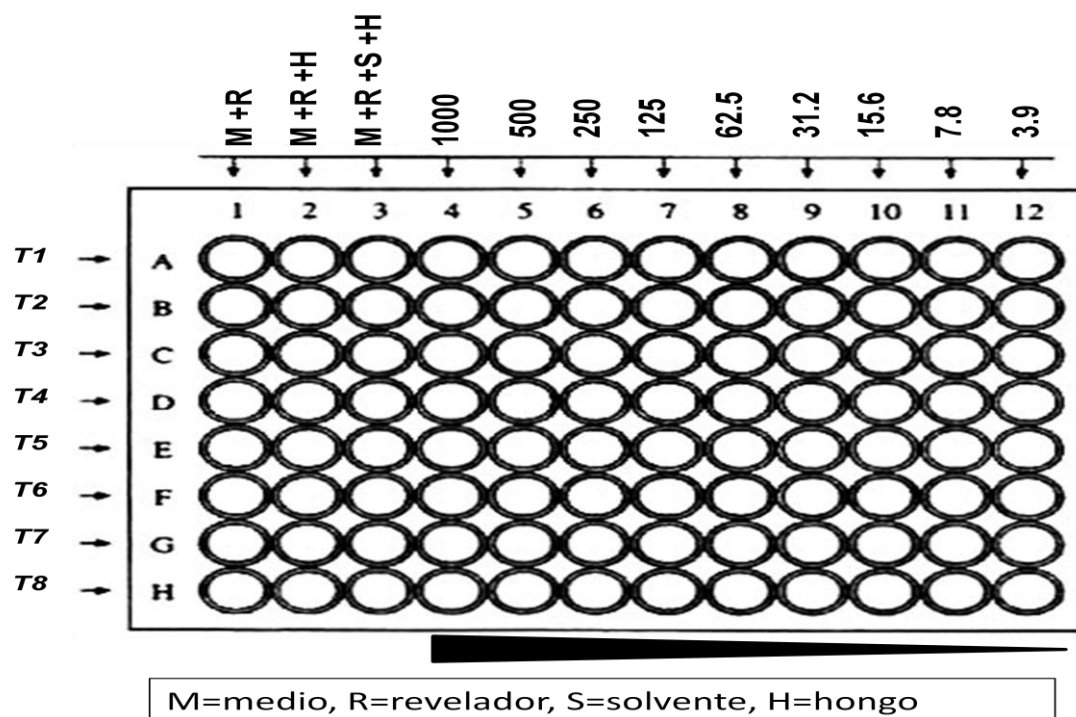
adaptada para hongos fitopatógenos para evaluar la actividad antifúngica de los extractos vegetales resuspendidos contra *B. cinerea*. El ensayo tanto para extractos acuosos como para extractos etanólicos se realizó por triplicado usando microplacas tipo ELISA de 96 pozos en la que cada microplaca represento una repetición. En el Cuadro 1 se describen los ocho tratamientos y tres controles empleados. El arreglo de los tratamientos y concentraciones (1000, 500, 250, 125, 62.5, 31.2, 15.62, 7.81, 3.9 ppm) en la placa se muestra en la Figura 1.

**Cuadro 1. Descripción de los tratamientos que se emplearon para evaluar su actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* mediante la microdilución en placa.**

Tratamiento	Descripción
<b>Control Absoluto</b>	Medio + revelador
<b>Control + Hongo</b>	Medio + hongo + revelador
<b>Control + Solvente</b>	Medio + hongo + solvente + revelador
<b>T1</b>	<i>Larrea tridentata</i> hoja
<b>T2</b>	<i>Agave lechuguilla</i> hoja
<b>T3</b>	<i>Agave lechuguilla</i> raíz
<b>T4</b>	<i>Jatropha dioica</i> raíz
<b>T5</b>	<i>Jatropha dioica</i> tallo
<b>T6</b>	<i>Carya illinoensis</i> ruezno
<b>T7</b>	<i>Lippia graveolens</i> hoja
<b>T8</b>	<i>Lippia graveolens</i> tallo

A cada pozo se le agregó 100 µL de caldo sabouraud y como indicador de crecimiento, 40 µL de 2, 3, 5-trifeniltetrazolio (TTC rojo tetrazolium, Sigma) al 0,01% (p / v) disuelto en agua destilada estéril para determinar por turbidez o cambio de color el crecimiento o no del microorganismo (Masoko *et al.*, 2005). Se añadió 100 µL de solvente extractante; etanol o agua dependiendo del extracto a analizar, sólo en la columna tres donde se mezclaron y se desecharon 100 µL. Del extracto de plantas preparado a una concentración inicial de 2000 ppm se tomaron 100 µL y se diluyeron en serie al 50% de su concentración a partir de la columna cuatro y se desecharon 100 µL en el último

pozo. Al final, se agregó 10  $\mu\text{L}$  de inóculo de *B. cinerea* a una concentración de  $1 \times 10^8$  en los pozos que comprenden desde la columna dos hasta la 12. Las microplacas se cubrieron con plástico kleen pack para ser incubadas a  $22^\circ\text{C}$  durante 48 h. Por último, las microplacas fueron leídas a una absorbancia de 490 nm en un espectrofotómetro (Thermo Scientific Multiskan Go) controlado con el software Thermo Scientific Skanlt.



**Figura 1. Representación de la distribución de los tratamientos y controles en una microplaca de 96 pozos.**

Se consideró crecimiento positivo del hongo, si pozos de los tratamientos con extracto presentan un color rojo a violeta, y negativo los que no fueron coloreados (Tengerdy *et al.*, 1967). Además se determinó el porcentaje de inhibición tomando el promedio de las absorbancias de las tres repeticiones, considerando que la inhibición es lo inverso del crecimiento, mediante las siguientes fórmulas (Moreno – Limón *et al.*, 2011):

$$\% \text{ de crecimiento} = (A-B/C) (100)$$

% de Inhibición= 100- % de crecimiento

A=Absorbancia tratamiento

B=Absorbancia testigo negativo

C=Absorbancia testigo Positivo

### **Determinación de la concentración inhibitoria al 50% (CI<sub>50</sub>)**

Se determinó la CI<sub>50</sub>, que es la concentración de los extractos que se requiere para inhibir el 50% del crecimiento del hongo para cada tratamiento (concentración ensayada) mediante un análisis Probit usando software SAS Versión 9.0. Las CI<sub>50</sub> resultantes se analizaron mediante un análisis de varianza y la comparación de medias se realizó con la prueba de Tukey ( $p < 0.05$ ) con tres repeticiones por muestra.

## **Actividad Antifúngica de los Extractos de Plantas sobre *B. cinerea* en Postcosecha**

### **Material vegetal**

Para cada tratamiento se emplearon seis frutos de fresa californiana (*Fragaria x ananassa*) en estado rojo maduro según la norma oficial mexicana NMX-FF-062-SCFI-2002 obtenidos en la central de abastos de Saltillo, Coahuila México.

### **Diseño experimental**

El experimento se estableció en un diseño completamente al azar con ocho tratamientos, cuatro repeticiones y seis unidades experimentales por cada tratamiento. Para este ensayo se eligieron los extractos vegetales etanólicos resuspendidos que tuvieron porcentajes de inhibición superiores al 80% en el experimento *in vitro* que se muestran en el Cuadro 2. Las concentraciones de los extractos corresponden a las CI<sub>50</sub> obtenidos en la cepa M1 de *B. cinerea*, identificada como cepa medianamente resistente (Cuadro 2). Los datos de las

variables de incidencia y severidad se sometieron a un análisis de varianza y la comparación de medias se realizó con la prueba Tukey ( $p < 0.05$ ) usando el software SAS Versión 9.0.

**Cuadro 2. Tratamientos para determinar la actividad antifúngica de los extractos de plantas contra *Botrytis cinerea* en frutos de fresa.**

Tratamientos	Descripción	Concentración (ppm)
T1	Control negativo	
T2	Control inoculado con <i>B. cinerea</i>	$1 \times 10^8$
T3	<i>Larrea tridentata</i> hoja + <i>B. cinerea</i>	544
T4	<i>Agave lechuguilla</i> raíz + <i>B. cinerea</i>	211
T5	<i>Jatropha dioica</i> raíz + <i>B. cinerea</i>	325
T6	<i>Carya illinoensis</i> ruezno + <i>B. cinerea</i>	694
T7	<i>Lippia graveolens</i> hoja+ <i>B. cinerea</i>	348
T8	Mezcla de extractos+ <i>B. cinerea</i>	544+211+325+694+348

**Aplicación de tratamientos e inoculación de *B. cinerea* a frutos de fresa**

La inoculación se realizó mediante el método por herida propuesto por Hernández *et al.*, (2011) y modificado para frutos de fresa por Andrade *et al.*, (2014). Los frutos se desinfectaron en una solución de cloro al 3% durante tres minutos y se enjuagaron tres veces con agua destilada estéril, procurando no dañar el fruto, luego se dejaron secar a temperatura ambiente ( $23 \pm 2^\circ\text{C}$ ) sobre papel de estraza dentro de la campana de flujo laminar. Bajo condiciones de esterilidad se tomaron seis frutos para cada tratamiento y se perforaron con un bisturí logrando heridas de 2 mm de profundidad por 2 mm de ancho. Posteriormente se sumergieron durante 10 s en cada tratamiento y se dejaron secar durante 30 min sobre papel de estraza, excepto los frutos seleccionados para los controles. Una vez secos se asperjaron dos veces con una suspensión de esporas de  $1 \times 10^8$  de *B. cinerea*, excepto el testigo negativo. Al final los frutos se colocaron dentro de cajas plásticas (domos) distribuidos horizontalmente para que los tratamientos tuvieran las mismas condiciones de temperatura y luz durante cinco días a temperatura ambiente ( $24\text{-}25^\circ\text{C}$ ). La toma de datos se realizó cada 24 h hasta que el testigo presento daños en todos los frutos.

### **Variables evaluadas**

Se determinó la incidencia y severidad de la enfermedad en los frutos de fresa cuando estos presentaron los primeros síntomas. La incidencia se expresó como porcentaje de frutos con síntomas, dividiendo el No. de frutos afectados/ No. de frutos analizados\*100. Mientras que para la severidad se utilizó la escala propuesta por Hernández *et al.*, (2011) donde: 0= 0; 1= 1-5%; 2= 6-15%; 3= 16-45%; 4= 46-75% y 5= 76-100% de daño visual por fruto. Se calculó el índice de severidad mediante la ecuación descrita por Pérez *et al.*, (1995): Índice de severidad=  $X_i(0) + X_i(1) + X_i(2) + X_i(3) + X_i(4) + X_i(5) / N$ , donde:  $X_i$ = número de frutos enfermos por cada grado de daño; 0, 1, 2, 3, 4, 5= grado de daño en la escala utilizada y N= número total de frutos por unidad experimental.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Fitoquímicos Presentes en los Extractos Acuosa y Etanólicos de Plantas

Los resultados obtenidos de los análisis de compuestos fitoquímicos de los extractos se muestran en los cuadros 3 y 4. Los fitoquímicos obtenidos de los extractos de hojas de *L. tridentata* fueron flavonoides, glicósidos cianogénicos, azúcares reductores, saponinas triterpenoides, taninos, quinonas, cumarinas y carotenoides. Los extractos de hoja y raíz de *A. lechuguilla* indican presencia de azúcares reductores, saponinas triterpenoides y taninos. Por otra parte en los extractos de tallo y raíz de *J. dioica* se identificaron carbohidratos, azúcares reductores, saponinas triterpenoides, taninos, quinonas, purinas, y sólo presentó cumarinas en extractos acuosa. Los extractos de ruzno de *C. illinoensis* presentaron chalconas, glicósidos cianogénicos, azúcares reductores, saponinas triterpenoides, taninos, ácido gálico, quinonas, cumarinas, purinas y carotenoides. Mientras que en los extractos de hoja y tallo de *L. graveolens* se identificaron flavonoides, azúcares reductores, saponinas esteroidales, taninos y quinonas. Los resultados de esta investigación coinciden con los reportados por Castillo *et al.*, (2010), Castillo *et al.*, (2015) y Martins *et al.* (2012; 2013) quienes señalan la presencia de polifenoles totales, flavonoides y taninos en extractos de gobernadora (*L. tridentata*) pero aún no se ha reportado el contenido de saponinas triterpenoides, quinonas, cumarinas y carotenoides. En *A. lechuguilla* se han reportado polifenoles (Castillo *et al.*, 2015), taninos condensados e hidrolizantes (Castillo *et al.*, 2010) y saponinas triterpénicas como principal componente antimicrobial en la lechuguilla (Hernández *et al.*, 2005; Alcázar *et al.*, 2014). Para *J. dioica* se han identificado saponinas, cumarinas, carbohidratos, azúcares reductores y taninos como en este estudio, pero aún no para quinonas y purinas (Aguilera *et al.*, 2008; Martínez *et al.*, 2014). En cascara de *C. illinoensis* se han identificado taninos, fenoles totales (do Prado *et al.*, 2009; Osorio *et al.*, 2010; do Prado *et al.*, 2014) y en hojas se ha encontrado ácido gálico (Bottari *et al.*, 2017).

**Cuadro 3. Componentes fitoquímicos identificados en los extractos acuosos resuspendidos**

Extractos	A	C	F				GC	AR		S	ET		T				Q			C	P	C	
			F1	F2	F3	F4		P	P	P	TT	E	T1	T2	T3	T4	Q	Q	Q	u		a	
								F	B	E							1	2	3				
<i>L. tridentata</i> hoja	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>A. lechuguilla</i> hoja	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	-	-
<i>A. lechuguilla</i> raíz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	-
<i>J. dioica</i> raíz	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+	-	-
<i>J. dioica</i> tallo	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-	+	-	+	-	+	+	-	-	-
<i>C. illionensis</i> ruezno	-	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. graveolens</i> hoja	-	+	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-
<i>L. graveolens</i> tallo	-	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	+	-	+	-	+	-	-	+	-	-

(+) indica presencia, (-) indica ausencia; A=alcaloides; C=carbohidratos; F=flavonoides, F1=flavonones, F2=flavonas, F3=flavononas, F4=chalconas; GC= glucósidos cianogénicos; AR=azúcares reductores, PF=prueba de Feling, PB=prueba de Benedict; S=saponinas, PE=prueba de espuma; ET=esteroles y terpenos, TT=triterpenoides, E=esteroles; T=taninos, T1=prueba de gelatina, T2=ácido gálico, T3=catecol; T4=fenoles; Q=quinonas, Q1=antraquinonas, Q2=benzoquinonas, Q3=antronas; Cu=cumarinas; P=purinas; Ca=carotenoides

**Cuadro 4. Componentes fitoquímicos identificados en los extractos etanólicos resuspendidos**

Extractos	A	C	F				GC	AR		S	ET	T				Q			Cu	P	Ca	
			F1	F2	F3	F4		PF	PB	PE	TT	E	T1	T2	T3	T4	Q1	Q2	Q3			
<i>L. tridentata</i> hoja	+	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	-	+
<i>A. lechuguilla</i> hoja	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>A. lechuguilla</i> raíz	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-
<i>J. dioica</i> raíz	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	+	+	+	-	-	-	+	-
<i>J. dioica</i> tallo	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+
<i>C. illionensis</i> ruezno	+	-	-	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+
<i>L. graveolens</i> hoja	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-	-
<i>L. graveolens</i> tallo	-	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	+	-	+	-	+	-	+	-	+

(+) indica presencia, (-) indica ausencia; A=alcaloides; C=carbohidratos; F=flavonoides, F1=flavonones, F2=flavonas, F3=flavononas, F4=chalconas; GC= glucósidos cianogénicos; AR=azucars reductores, PF=prueba de Feling, PB=prueba de Benedict; S=saponinas, PE=prueba de espuma; ET=esteroles y terpenos, TT=triterpenoides, E=esteroles; T=taninos, T1=prueba de gelatina, T2=ácido gálico, T3=catecol; T4=fenoles; Q=quinonas, Q1=antraquinonas, Q2=benzoquinonas, Q3=antronas; Cu=cumarinas; P=purinas; Ca=carotenoides



En esta investigación además de los compuestos anteriormente señalado, se encontró la presencia de glucósidos cianogénicos, azúcares reductores, saponinas terpenoides, quinonas, cumarinas, purinas y carotenoides. En plantas de *L. graveolens* ya se han identificado flavonoides (García *et al.*, 2012; Trejo *et al.*, 2015), azúcares reductores, taninos, saponinas (Dahiya y Purkayastha, 2012); en este estudio, además se identificó la presencia de quinonas.

### Identificación Morfológica de *B. cinerea*

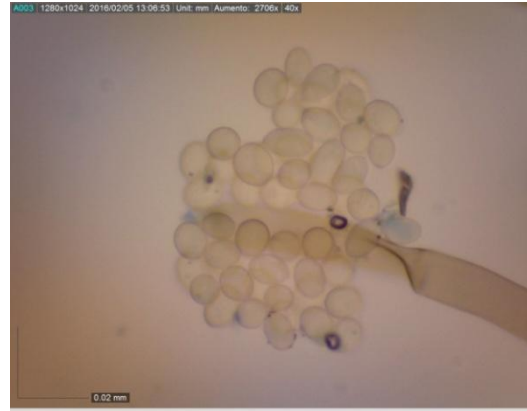
De los aislamientos fúngicos realizados de frutos de fresa se obtuvieron tres cepas que se identificaron como *B. cinerea*, estas mostraron diferencias en color y en crecimiento durante el aislamiento y se designaron como H1, M1 y M3. El diámetro de las hifas tienen en promedio 15.73  $\mu\text{m}$ ; los conidios presentaron una longitud de 10-11.1  $\mu\text{m}$  y un diámetro de 7.1-8.7  $\mu\text{m}$ ; los esclerocios tienen una longitud de 8.5-10.5 mm y un área total de 4.8-7.7 mm (Cuadro 5). Estas características morfológicas coinciden con la descripción realizada para *B. cinerea* (Jarvis 1977; Beever y Weeds, 2007; Mirzaei *et al.*, 2008). Las estructuras características del hongo como son micelio, conidióforos, conidios y esclerocios se observan en las Figuras 2,3 y 4.

**Cuadro 5. Dimensión de conidios y esclerocios de tres cepas de *Botrytis cinerea* aisladas de frutos de fresa.**

Cepa	Conidios		Esclerocios	
	Longitud ( $\mu\text{m}$ )	Ancho ( $\mu\text{m}$ )	Longitud (mm)	Área (mm)
H1	11.1	7.2	10.5	7.7
M1	10.0	8.7	8.5	4.8
M3	10.8	7.1	9.4	5.8

Las cepas de *B. cinerea* aisladas de fresa para los bioensayos, se consideran altamente resistentes al benomil debido a que se encuentran dentro del rango de 831.68-18 279 ppm del fungicida para inhibir el 50% ( $\text{CE}_{50}$ ) y el 95% del

crecimiento micelial del hongo (CE<sub>95</sub>) respectivamente, en general los aislamientos de *B. cinerea* con crecimiento a partir de 0.055 ppm de benomil son considerados resistentes (Ponce *et al.*, 2002).



**Figura 2. Micelio, conidióforo y conidios de *B. cinerea* visto bajo el microscopio compuesto (10x)**

**Figura 3. Conidios observados y conidios de *B. cinerea* visto bajo el microscopio compuesto (40x)**



**Figura 4. Esclerocios vistos al estereoscopio.**

**Actividad Antifúngica de los Extractos de Plantas sobre *B. cinerea* Bajo  
Condiciones *in vitro***

**Actividad antifúngica de los extractos acuosos resuspendidos**

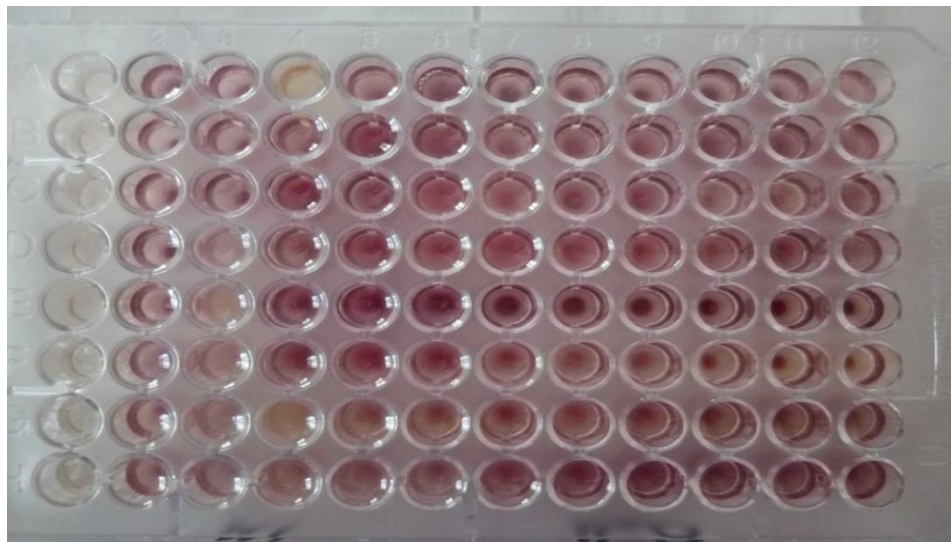
Los resultados obtenidos de la efectividad biológica de los extractos sobre *B. cinerea*, muestran que está es variable entre los extractos así como en la respuesta de las cepas del hongo a un mismo extracto (Cuadro 6).

**Cuadro 6. Porcentajes de inhibición de los extractos acuosos resuspendidos a 1000 ppm usados en el ensayo de microdilución contra cepas de *Botrytis cinerea*.**

Extracto	% Inhibición Cepa H1	% Inhibición Cepa M1	% Inhibición Cepa M3
<i>Larrea tridentata</i> hoja	33	40	6
<i>Agave lechuguilla</i> hoja	2	32	2
<i>Agave lechuguilla</i> raíz	17	15	38
<i>Jatropha dioica</i> raíz	10	10	41
<i>Jatropha dioica</i> tallo	11	20	4
<i>Carya illinoensis</i> ruezno	13	32	38
<i>Lippia graveolens</i> hoja	30	26	24
<i>Lippia graveolens</i> tallo	15	13	0

De manera general podemos inferir que los extractos acuosos presentan bajos porcentajes de inhibición del crecimiento de *B. cinerea* aun a la concentración más alta estudiada en esta investigación que fue de 1000 ppm (Figura 5). El porcentaje de inhibición más alto obtenido a 1000 ppm fue con el extracto de raíz de *J. dioica* con 41% en la cepa M3 (Cuadro 6). En los demás extractos vegetales la actividad inhibitoria fue variable para cada cepa fluctuando desde 0 hasta el 40%. Así mismo, fue posible observar que a medida que aumenta la concentración de los extractos (excepto tallo de *L. graveolens*) aumentaba el efecto inhibitorio del desarrollo del hongo. Esto puede indicar que al aumentar las concentraciones de los extractos por encima de los 1000 ppm es posible que se incremente los porcentajes de inhibición del hongo. La disminución de la

actividad del extracto acuoso se puede atribuir a la enzima polifenol oxidasa, que degrada los polifenoles en los extractos de agua, señalados con actividad antifúngica (Tiwari *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, (2015).



**Figura 5. Microplaca del ensayo de microdilución con extractos acuosos resuspendidos coloreados de color violeta por el crecimiento de *B. cinerea*.**

En esta investigación no se observó que los extractos acuosos promovieran el crecimiento del hongo como si sucede con extractos acuosos de llantén (*Plantago major* L), ruda (*Ruta graveolens* L), pronto alivio (*Lippia alba* Mill) y helecho marranero [*Pteridium aquilinum* (Kaulf) Maxon]; extractos que no sólo promovieron el crecimiento sino también la esporulación de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum musae* (López *et al.*, 2006).

#### **Actividad antifúngica de los extractos etanólicos resuspendidos**

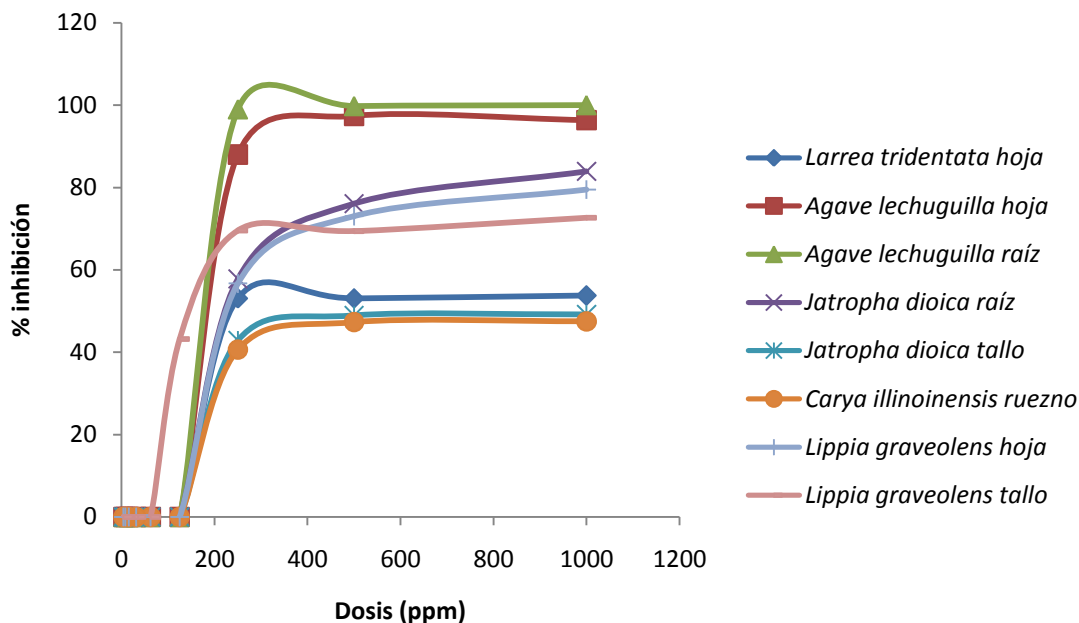
Los resultados obtenidos indican que todos los extractos etanólicos presentaron actividad antifúngica contra *B. cinerea* (Cuadro 7); la respuesta fue variable dependiendo del extracto, concentración y cepa del hongo. El extracto de raíz de *A. lechuguilla* presentó inhibición en la cepa H1, M1, M3 con 100%, 95% y 83% respectivamente a 1000 ppm. El extracto que presentó inhibición superior

al 70% en las tres cepas fue el de raíz de *J. dioica* que inhibió el 84%, 88% y 70% en la cepa H1, M1 y M3 respectivamente a 1000 ppm (Cuadro 7).

**Cuadro 7. Porcentajes de inhibición de los extractos etanólicos resuspendidos a 1000 ppm usados en el ensayo de microdilución contra cepas de *B. cinerea***

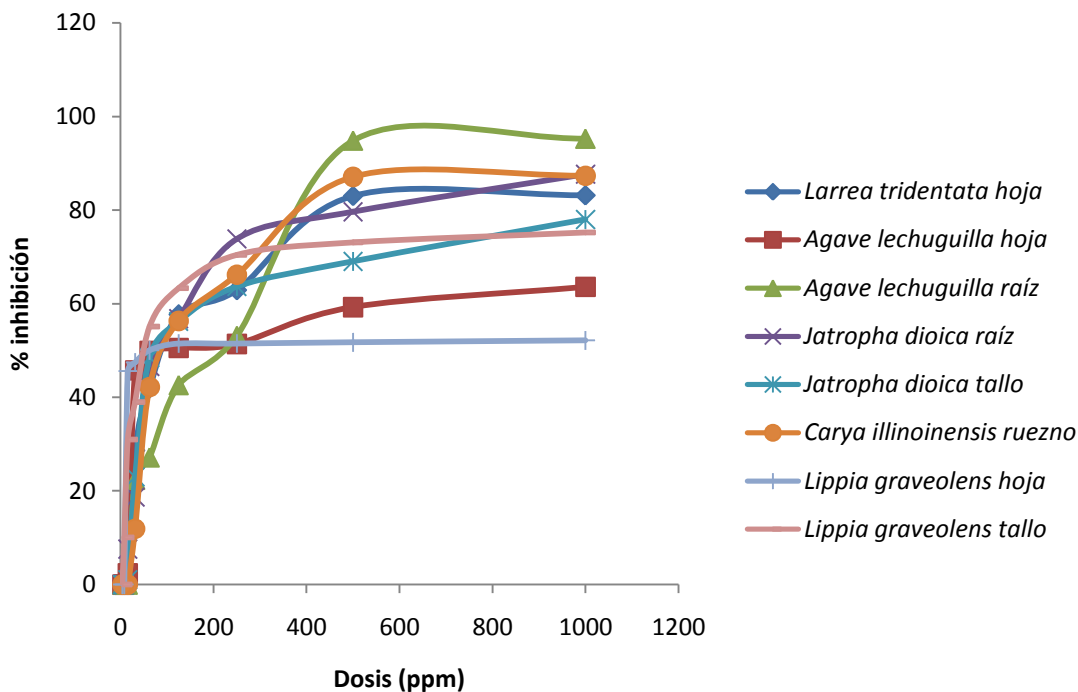
<b>Extractos</b>	<b>Cepa H1</b>	<b>Cepa M1</b>	<b>Cepa M3</b>
<i>Larrea tridentata</i> hoja	54	83	61
<i>Agave lechuguilla</i> hoja	96	64	29
<i>Agave lechuguilla</i> raíz	100	95	83
<i>Jatropha dioica</i> raíz	84	88	70
<i>Jatropha dioica</i> tallo	49	78	68
<i>Carya illinoensis</i> ruezno	47	87	84
<i>Lippia graveolens</i> hoja	79	52	87
<i>Lippia graveolens</i> tallo	73	75	47

Con los extractos de tallo de *L. graveolens* la cepa H1 de *B. cinerea* fue inhibida un 43% a partir de 125 ppm, aumentando a 73% a 1000 ppm (Figura 7). Los demás extractos mostraron actividad antifúngica a partir de 250 ppm, los extractos de hoja de *L. tridentata*, tallo de *J. dioica* y ruezno de *C. illinoensis* presentaron una inhibición del 41-53%. En cambio, el extracto de hoja de *L. graveolens* mostró un aumento de inhibición de 57% a 79% en la dosis más alta. A 500 ppm los extractos de raíz de *J. dioica*, hoja de *A. lechuguilla* y raíz de *A. lechuguilla* presentaron inhibición del 76%, 96% y 100% respectivamente. Además a dosis de 1000 ppm los extractos de hoja de *A. lechuguilla* y raíz de *A. lechuguilla* se mantuvieron con una inhibición de 96% y 100% respectivamente mostrando ser los mejores en la inhibición de la cepa H1.



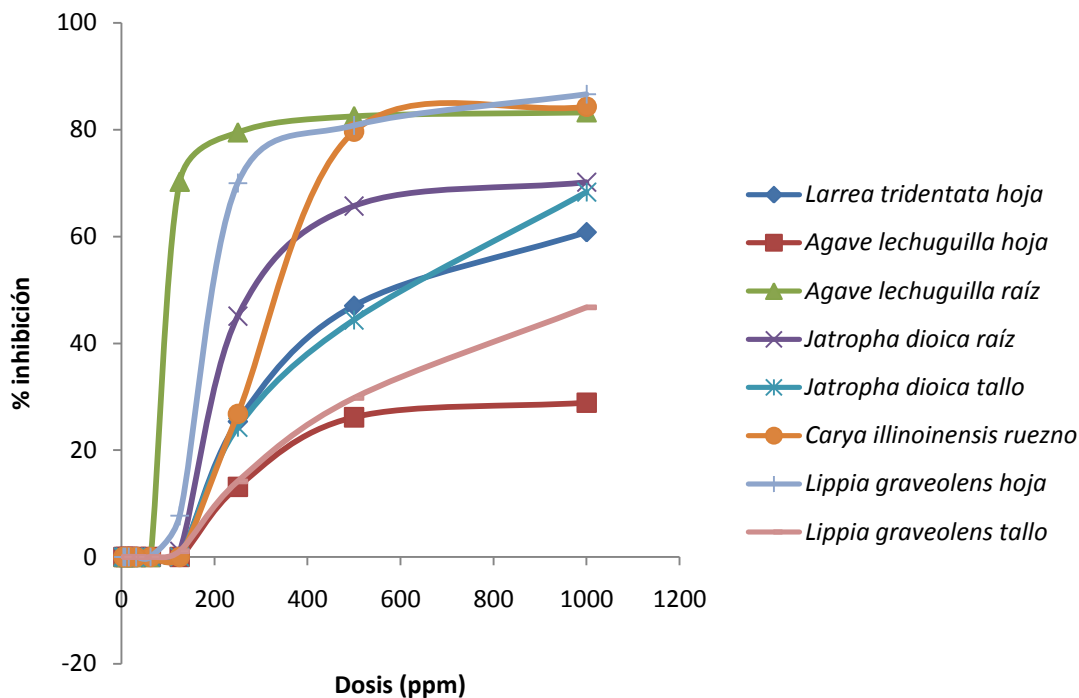
**Figura 6. Porcentaje de inhibición de extractos etanólicos resuspendidos de plantas sobre la cepa H1 de *Botrytis cinerea*.**

El efecto de la actividad antifúngica de los extractos en la cepa M1 se presentó de manera creciente desde la concentración más baja de 3.9 ppm (Figura 8). El extracto de raíz de *A. lechuguilla* tuvo una inhibición del 95% a 500 y 1000 ppm. Mientras los extractos de hoja de *L. tridentata*, raíz de *J. dioica* y ruezno de *C. illinoensis* presentaron inhibición del 83%, 88% y 87% respectivamente a la concentración más alta. Los extractos de tallo de *J. dioica* y de *L. graveolens* presentaron el 78% y 75% de inhibición a 1000 ppm. Los extractos de hoja de *A. lechuguilla* y *L. graveolens* mostraron una inhibición por debajo del 64%.



**Figura 7. Porcentaje de inhibición de extractos etanólicos resuspendidos de plantas sobre la cepa M1 *Botrytis cinerea*.**

En la cepa M3 el efecto de la actividad antifúngica de los extractos de hoja de *A. lechuguilla* y tallo de *L. graveolens* se presentó menor al 50% a la concentración más alta (Figura 9). Los extractos de hoja de *L. tridentata*, tallo de *J. dioica* y raíz de *J. dioica* obtuvieron una inhibición sobre *B. cinerea* del 61%, 68% y 70% respectivamente. Sin embargo, los extractos de raíz de *A. lechuguilla*, ruezno de *C. illinoensis* y hoja de *L. graveolens* presentaron porcentajes de inhibición del 83%, 84% y 87% respectivamente. A diferencia de las cepas H1 y M1 en esta cepa el extracto de hoja *L. graveolens* obtuvo el mejor resultado.



**Figura 8. Porcentaje de inhibición de extractos etanólicos resuspendidos de plantas sobre la cepa M3 *B. cinerea*.**

Todos los extractos acuosos presentaron una actividad antifúngica menor en comparación con los extractos etanólicos. Los resultados obtenidos en la actividad antifúngica de los extractos etanólicos de raíz de *A. lechuguilla* y de raíz de *J. dioica* sobre cepas de *B. cinerea* pueden atribuirse a la composición fitoquímica de ambos extractos debido a que el etanol (disolvente polar) lleva a cabo una extracción más alta de compuestos fitoquímicos que en general, presentan un alto porcentaje de inhibición sobre el crecimiento de hongos patógenos de plantas (De Rodríguez *et al.*, 2011). El mejor efecto inhibitorio sobre *B. cinerea* se obtuvo con el extracto de raíz de *A. lechuguilla* el que se caracteriza por presentar saponinas triterpenoides y taninos derivados del catecol. Las saponinas son glucósidos naturales que debido a la naturaleza de la aglicona pueden ser terpénicas o esteroidales, actúan permeabilizando las membranas celulares de los hongos, provocando lesiones que aparecen como agujeros debido a que forman complejos con esteroides, proteínas y fosfolípidos de las membranas citoplásmicas (Baumann *et al.*, 2000; Stuardo y San Martín,



2008). Las saponinas triterpénicas han sido señaladas como el principal componente antimicrobial en lechuguilla (Hernández *et al.*, 2005; Alcázar *et al.*, 2014). Resultados obtenidos por Stuardo y San Martín, (2008) comprueban que las saponinas triterpenoides en extractos acuosos de Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) tratadas con álcali, inhiben el crecimiento micelial y germinación conidial de *B. cinerea*. En cambio, los taninos se unen a la proteína rica en prolina e interfieren con la síntesis de proteínas y en la inhibición de la actividad enzimática celular; por ejemplo se señala que son los taninos presentes en la corteza de la madera de *Acacia mearnsii* lo que le confiere la resistencia contra los hongos que la afectan (Yamaguchi y Okuda, 1998; Yadav y Agarwala, 2011). Resultados similares obtuvieron González *et al.*, (2015) con extractos etanólicos de *Agave* (*A. scabra*, Salm Dyck) al señalar que este extracto inhibe el 90% del aislamiento de *B. cinerea*. No se tienen referencias del uso de extractos de *A. lechuguilla* para el control de *B. cinerea* pero si para el control de otros hongos. Referencias sobre otros estudios con extractos de *A. lechuguilla* indican que los extractos etanólicos inhibieron hasta un 100% el crecimiento micelial de *Rhizoctonia solani* y de *Colletotricum gloesporoides* a una concentración de 200 y 500 ppm respectivamente (De Rodríguez *et al.*, 2011; Castillo *et al.*, 2015). También se ha demostrado que los extractos etanólicos obtenidos de la raíz de lechuguilla presentan mayor actividad antifúngica que los extractos obtenidos de las hojas, sobre algunos hongos levaduriformes, filamentosos y actinomicetos (Verástegui, 1995; Verástegui *et al.*, 2008), como ha sido en el caso de esta investigación contra *B. cinerea*.

Los compuestos fitoquímicos del extracto de raíz de *J. dioica* coinciden con los de raíz de lechuguilla en la presencia de saponinas triterpenoides y taninos derivados del catecol además de antraquinonas y purinas. Las antraquinonas pertenecen al grupo de las quinonas que se encuentran ampliamente distribuidas en la naturaleza principalmente en vegetales, sus coloraciones varían del amarillo al rojo (Reyes *et al.*, 2015). Las quinonas forman complejos con los aminoácidos hidrofílicos de las proteínas, la mayoría de las veces inactivando la proteína y anulando su función (Domingo y López, 2003). Los

estudios realizados por Kim *et al.*, (2004) indican que las antraquinonas obtenidas de extractos de semillas de *Cassia tora* mostraron acción fungicida contra *B. cinerea*, *Erysiphe graminis*, *Phytophthora infestans*, *Puccinia recondita*, *Pyricularia grisea* y *Rhizoctonia solani*. Por otra parte, las purinas pertenecen al grupo de los alcaloides, los que a dosis altas son muy tóxicas para el ser humano (García y Carril *et al.*, 2011). El mecanismo de acción de los alcaloides parece ser mediante la intercalación entre la pared celular y el DNA del microorganismo (Domingo y López, 2003).

Los resultados obtenidos con el extracto de *J. dioica* en esta investigación difieren a los reportados por Trejo *et al.*, (2015) que obtuvieron el 93.2% de inhibición en el crecimiento micelial de *B. cinerea* con una concentración de 2000 ppm del extracto etanólico *Jatropha sp.*, mientras que en esta investigación se alcanzó una inhibición del 70-88% en las tres cepas ensayadas, a 1000 ppm.

Finalmente el extracto de hoja de *L. graveolens* presentó compuestos polifenólicos como flavonoides, taninos, quinonas, cumarinas, saponinas esteroidales y azúcares reductores. Los flavonoides son compuestos fenólicos que por la presencia en su estructura de hidroxilos fenólicos penetran la membrana celular, se combinan y precipitan las proteínas protoplasmáticas desnaturalizándolas y actuando como venenos protoplasmáticos (Puupponen *et al.*, 2001). Las cumarinas actúan como agentes antimicrobianos y como inhibidores de germinación. En el caso de psoraleno, éste muestra toxicidad frente a insectos tras activarse por luz UV provocando la muerte celular por bloqueo de la transcripción y de la reparación de DNA (García y Carril *et al.*, 2011). Sin embargo este extracto sólo mostró actividad antifúngica frente a la cepa M3, resultado que no coincide con los obtenidos por Trejo *et al.*, (2015) en donde extractos etanólicos de *L. graveolens* inhibieron el 50% del crecimiento de *B. cinerea* a una concentración de 2000 ppm; inhibición muy por debajo de los extractos de Hoja Sen (*Florenzia cernuda* DC) y Sangre de Drago (*Jathropa sp.*) que ellos estudiaron. En cambio, los extractos etanólicos de *L.*

*graveolens* a 500 ppm presentaron un efecto inhibitorio del crecimiento micelial del 100% contra *Rhizopus stolonifer* y *C. gloeosporioides* (De Rodríguez *et al.*, 2011). El aceite esencial *L. origanoides* en las concentraciones más altas (500 ppm) presentaron los mayores porcentajes promedio de inhibición (66.2%) sobre *B. cinerea* (Andrade *et al.*, 2014).

La diferente actividad antifúngica de los extractos sobre las tres cepas de *B. cinerea* se puede atribuir a los distintos niveles de resistencia a múltiples drogas (MDR) como mecanismo de resistencia de *B. cinerea* inducidos por fungicidas y toxinas naturales (Kretschmer *et al.* (2009) y Leroch *et al.*, (2011). Por lo tanto, las cepas resistentes han adquirido propiedades que le permiten aumentar su capacidad de crecimiento en entornos naturales con presencia y en ausencia de fungicidas (Kretschmer *et al.*, 2009).

### Concentraciones inhibitorias al 50% (CI<sub>50</sub>)

Las CI<sub>50</sub> de las cepas de *B. cinerea* para cada extracto fueron variables entre extractos y entre las cepas (Cuadro 8).

**Cuadro 8. Valores CI<sub>50</sub> de los extractos etanólicos resuspendidos sobre cepas de *Botrytis cinerea*.**

Extractos	Cepa H1	Cepa M1	Cepa M3
	CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>	CI <sub>50</sub>
<i>Larrea tridentata</i> hoja	544 c	126 f	627 c
<i>Agave lechuguilla</i> hoja	209 h	198 b	1578 a
<i>Agave lechuguilla</i> raíz	211 d	139 d	172 h
<i>Jatropha dioica</i> raíz	325 e	119 g	427 e
<i>Jatropha dioica</i> tallo	650 b	151 c	594 d
<i>Carya illinoensis</i> ruezno	694 a	131 e	388 f
<i>Lippia graveolens</i> hoja	348 d	216 a	268 e
<i>Lippia graveolens</i> tallo	260 f	86 h	968 b

Valores CI<sub>50</sub> representan la media de tres replicas. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey, P<0.05).

En la cepa H1 el análisis de varianza detecto diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre las  $CI_{50}$  de los extractos etanólicos resuspendidos. La  $CI_{50}$  más baja corresponde al extracto de hoja de *A. lechuguilla* con 209 ppm y la más alta con ruezno de *C. illinoensis* a 694 ppm. En la cepa M3 la  $CI_{50}$  más baja también se presentó con *A. lechuguilla* pero de raíz a 172 ppm, mientras la más alta fue con hoja de *Agave lechuguilla* a 1578 ppm. De igual manera las medias presentaron diferencias altamente significativas ( $p < 0.001$ ) entre tratamientos. En la cepa M1 también existen diferencias altamente significativas entre las  $CI_{50}$  ( $p < 0.001$ ), la  $CI_{50}$  más baja se obtuvo con tallo de *L. graveolens* a 86 ppm y la más alta con hoja de *L. graveolens* a 216 ppm como se muestra en el Cuadro 8.

Debido a que no se tiene referencias del uso de extractos de *A. lechuguilla* sobre *B. cinerea* se hará referencia de resultados con otros hongos. La  $CI_{50}$  encontrada por Castillo *et al.*, (2015) para la inhibición del crecimiento micelial en *R. solani* con extractos de *A. lechuguilla* fue de 32.5 ppm. Concentración muy baja en comparación con la encontrada para *B. cinerea*.

### **Actividad Antifúngica de los Extractos de Plantas sobre *B. cinerea* en Postcosecha**

#### **Incidencia de la enfermedad causada por *B. cinerea***

Los síntomas y signos de *B. cinerea* sobre los frutos de fresa aparecieron después de las 24 h de la inoculación; los datos sobre la incidencia se tomaron a las 48 h, no detectando diferencia significativa entre tratamientos ( $p > 0.05$ ) (Cuadro 9). Los frutos tratados con el extracto de raíz de *A. lechuguilla* a una concentración de 211 ppm fueron los que presentaron menor incidencia con 64.71% seguido del control negativo que mostro el 69.93%. Mientras el extracto de hoja de *L. graveolens*, la mezcla de extractos y el control inoculado con *B. cinerea* mostraron el 90% de incidencia. Por lo anterior no se observó que los

extractos bajo estudio mostraran efecto en disminuir la incidencia de la enfermedad en los frutos de fresa en postcosecha.

**Cuadro 9. Valores de incidencia a las 48 horas de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* (cepa M1) en frutos de fresa tratados con extractos etanólicos.**

Tratamiento	Descripción	Media	Grupo
T7	<i>Lippia graveolens</i> hoja + <i>B. cinerea</i>	90	A
T2	Control inoculado con <i>B. cinerea</i>	90	A
T8	Mezcla de extractos + <i>B. cinerea</i>	90	A
T3	<i>Larrea tridentata</i> hoja + <i>B. cinerea</i>	83.98	A
T6	<i>Carya illinoensis</i> ruezno + <i>B. cinerea</i>	83.98	A
T5	<i>Jatropha dioica</i> raíz + <i>B. cinerea</i>	77.95	A
T1	Control negativo	69.93	A
T4	<i>Agave lechuguilla</i> raíz + <i>B. cinerea</i>	64.71	A

Valores representan la media de cuatro replicas. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P < 0.05$ )

Tampoco se observaron diferencias significativas entre tratamientos cuando se consideró la incidencia promedio de las cepas ( $p > 0.05$ ) (Cuadro 10). Los frutos tratados con raíz de *A. lechuguilla* presentaron la menor incidencia de la enfermedad (59.88%) seguido del tratamiento de mezcla de extractos en comparación con el testigo negativo (sin inoculación) en el que la enfermedad se incrementó después de las 48 h a un 70.06%.

Los resultados de Andrade *et al.*, (2014) muestran que los extractos etanólicos y aceites esenciales de *L. organoides* a 500 ppm mostraron un porcentaje de control de la incidencia del 88% y 94.3% respectivamente por lo tanto presentaron una menor incidencia de la enfermedad en los frutos de fresa. Estos resultados pueden ser debido a que los metabolitos secundarios

(complementarios) volátiles con actividad promisorio biocontroladora se encuentran de forma concentrada en los aceites esenciales y se obtienen por el mecanismo de volatilización-condensación, mientras que la extracción con etanol significa necesariamente el arrastre de otros compuestos de la planta en elevadas concentraciones lo que puede afectar el potencial biocontrolador (Hammami *et al.*, 2011).

**Cuadro 10. Valores de incidencia promedio de la enfermedad moho gris causada por *Botrytis cinerea* (cepa M1) en frutos de fresa tratados con extractos etanólicos.**

Tratamiento	Descripción	Media	Grupo
T1	Control negativo	70.06	A
T2	Control inoculado con <i>B. cinerea</i>	69.49	A
T7	<i>Lippia graveolens</i> hoja + <i>B. cinerea</i>	63.79	A
T3	<i>Larrea tridentata</i> hoja + <i>B. cinerea</i>	63.56	A
T6	<i>Carya illinoensis</i> ruezno + <i>B. cinerea</i>	63.47	A
T5	<i>Jatropha dioica</i> raíz + <i>B. cinerea</i>	62.42	A
T8	Mix+ <i>B. cinerea</i>	61.42	A
T4	<i>Agave lechuguilla</i> raíz + <i>B. cinerea</i>	59.88	A

Valores representan la media de cuatro replicas. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P < 0.05$ )

**Severidad de la enfermedad causada por *B. cinerea***

En el Cuadro 11 se muestran los resultados del análisis de varianza para la severidad de la enfermedad a las 48 h; se observa que la severidad es menor ( $p < 0.05$ ) en los tratamientos con raíz de *A. lechuguilla* (T4) y con la mezcla de extractos (T8), con los menores índices de severidad (0.71-1.13).

**Cuadro 11. Valores de severidad a las 48 horas de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* (cepa M1) en frutos de fresa tratados con extractos etanólicos.**

Tratamiento	Descripción	Media	Grupo
T2	Control inoculado con <i>B. cinerea</i>	1.96	A
T7	<i>Lippia graveolens</i> hoja+ <i>B. cinerea</i>	1.33	AB
T5	<i>Jatropha dioica</i> raíz + <i>B. cinerea</i>	1.29	AB
T3	<i>Larrea tridentata</i> hoja + <i>B. cinerea</i>	1.25	AB
T6	<i>Carya illinoensis</i> ruezno + <i>B. cinerea</i>	1.17	AB
T8	Mezcla de extractos + <i>B. cinerea</i>	1.13	B
T1	Control negativo	0.96	B
T4	<i>Agave lechuguilla</i> raíz + <i>B. cinerea</i>	0.71	B

Valores representan la media de cuatro replicas. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P < 0.05$ )

Los resultados del análisis estadístico para la severidad promedio de la enfermedad en la cepa M1 indican nuevamente diferencia significativa entre tratamientos ( $p < 0.05$ ) (Cuadro 12). Los extractos que redujeron el nivel de daño de la enfermedad en el fruto fueron raíz de *A. lechuguilla* (T4) con 1.46 y ruezno de *C. illinoensis* (T6) con un 1.68 comparado con el control inoculado con *B. cinerea* que alcanzó un índice de severidad de 2.89.

**Cuadro 12. Índices de severidad promedio de la enfermedad moho gris causada por *Botrytis cinerea* en frutos de fresa tratados con extractos etanólicos.**

Tratamiento	Descripción	Media	Grupo
T2	Control inoculado con <i>B. cinerea</i>	2.89	A
T1	Control negativo	2.06	AB
T7	<i>Lippia graveolens</i> hoja+ <i>B. cinerea</i>	1.91	AB
T3	<i>Larrea tridentata</i> hoja + <i>B. cinerea</i>	1.91	AB

	<i>cinerea</i>		
<b>T5</b>	<i>Jatropha dioica</i> raíz + <i>B. cinerea</i>	1.87	AB
<b>T8</b>	Mezcla de extractos+ <i>B. cinerea</i>	1.83	AB
<b>T6</b>	<i>Carya illinoensis</i> ruezno + <i>B. cinerea</i>	1.68	B
<b>T4</b>	<i>Agave lechuguilla</i> raíz + <i>B. cinerea</i>	1.46	B

Valores representan la media de cuatro replicas. Medias con la misma letra no son significativamente diferentes (Tukey,  $P < 0.05$ )

Los tratamientos Mezcla de extractos (T8), raíz de *J. dioica* (T5), hoja de *L. tridentata* (T3), hoja de *L. graveolens* (T7) y control negativo (T1) obtuvieron índices de severidad que oscilan de 1.83 a 2.06.

No existen reportes del uso de extractos a base de *A. lechuguilla* en la enfermedad causada por *B. cinerea* para reducir la severidad en frutos de fresa; sólo se señala el uso del extracto etanólico de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) como una alternativa al especificar una severidad del 11.8%, en frutos a una dosis de 15 000 ppm con una frecuencia de aplicación de 6 días (Pazmiño *et al.*, 2017).

El extracto de raíz de *A. lechuguilla* se propone como posible aditivo alternativo para ser usado en recubrimientos comestibles para proteger los frutos de fresa del daño del moho gris. Rodríguez *et al.*, 2005 señalan que los aditivos en las formulaciones de los recubrimientos comestibles en frutos postcosecha pueden proporcionar al producto vegetal funciones más específicas como una actividad antimicrobiana, para evitar o reducir el crecimiento de microorganismos en su superficie. Para ello se quiere de aplicaciones pequeñas en los recubrimientos para que la calidad no se vea afectada como sucedió en esta investigación (Ramos *et al.*, 2010).



## CONCLUSIONES

- Los extractos acuosos evaluados mostraron una baja inhibición sobre cepas de *B. cinerea* a la concentración más alta empleada de 1000 ppm.
- Los extractos etanólicos de hoja de *Agave lechuguilla*, raíz de *A. lechuguilla* y hoja de *Lippia graveolens* inhiben el crecimiento micelial hasta del 100% en las cepas de *B. cinerea*.
- Los  $CI_{50}$  más bajas corresponden a los extractos etanólicos de tallo de *Lippia graveolens* (86 ppm), raíz de *Jatropha dioica* (119 ppm) y hoja de *Larrea tridentata* (126 ppm).
- Ninguno de los extractos etanólicos estudiados en condiciones de postcosecha disminuyó la incidencia de la enfermedad en frutos de fresa.
- Los extractos de raíz de *Agave lechuguilla*, mezcla de extractos y ruezno de *Carya illinoensis* disminuyeron la severidad de la enfermedad a diferencia del control inoculado con *B. cinerea*.

## REFERENCIAS

- Adame, J., Adame, H., 2000. Plantas curativas del Noreste Mexicano. Monterrey, México, Ediciones Castillo, 11–15.
- Agrios GN. 2005. Plant Pathology. Fifth Edition. Academic Press. New York, USA. 922p.
- Aguilar, C. N., Rodríguez, H. R., Saucedo, P. S., & Jasso, C. D. (2008). Fitoquímicos Sobresalientes del Semidesierto Mexicano: de la planta a los químicos naturales ya la biotecnología. Ed. Path Design Saltillo, Coahuila, México, 12-25.
- Aguilera-Carbo, A., Augur, C., Prado-Barragan, L., Aguilar, C. y Favela-Torres, E. (2008). Extraction and analysis of ellagic acid from novel complex sources. Chemical Papers, 62(4), 440-444.
- Alcázar-Medina, F., Proal-Nájera, J., Gallardo-Velázquez, T., Cháirez-Hernández, I., Antileo-Hernández, C., & Alvarado-de la Peña, A. (2014). Aplicación de extractos de lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) en la remoción de cobre (II) en modelos de agua por aglomeración esférica. Revista mexicana de ingeniería química, 13(2), 605-617.
- Álvarez-Gómez, T. B. 2012. Biocontrol de *Botrytis cinerea* a partir de extractos fenólicos de fresa. Tesis de Maestría. Instituto Politécnico Nacional. Jilipan Michoacán México.
- Andrade, L. A. T., Correa, C. R. B., & Davey, C. H. (2014). Efecto fungistático de extractos y aceites esenciales de *Lippia origanoides* HBK y *Thymus vulgaris* L. como alternativas de manejo de *Botrytis cinerea* en fresa. Acta Agronómica, 64(1), 93. DOI: <http://dx.doi.org/10.15446/acag.v64n1.35773>
- Ávalos-García, A. y Pérez-Urria E. 2012. Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 3 (2), 339-353.
- Ávila-Arce, A. y González-Milán D. D. J. 2012. La competitividad de las fresas (*fragaria spp.*) mexicanas en el mercado nacional, regional y de Estados Unidos. Agricultura, sociedad y desarrollo, 9(1), 17-27.
- Backhouse, D. and Willets H.J. 1984. A histochemical study of sclerotia of *Botrytis cinerea* and *Botrytis fabae*. Can. J. Microbiol, 30,171–178.
- Barbour, M. G. (1969). Age and space distribution of the desert shrub *Larrea Div Aricata*. Ecology, 50(4), 679-685.
- Bardas G.A, Myresiotis C.K, Karaoglanidis G.S. 2008. Stability and fitness of anilinopyrimidine-resistant strains of *Botrytis cinerea*. Phytopathology, 98: 443 - 450.

- Barnett, H.L. y Hunter B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. No. Edición 4. USA: American Phytopathological Society (APS Press), 234.
- Baumann, E., Stoya, G., Volkner, A., Richter, W., Lemke, C. and Linss, W. (2000). Hemolysis of human erythrocytes with saponin affects the membrane structure. *Acta Histochemica*, 102(1), 21-35
- BDMTM, Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009a. Atlas de las plantas de la medicina tradicional mexicana. Consulta: 30 de Octubre. Disponible en: <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/monografia.php?l=3&t=&id=7483>
- BDMTM, Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009b. Atlas de las Plantas de la Medicina Tradicional Mexicana. Consulta: 30 de Octubre del 2017. Disponible en <http://www.medicinatradicionalmexicana.unam.mx/index.php>
- Beever, R. E. and Weeds P. L. 2007. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. *Botrytis: Biology, pathology and control*. The Netherlands: Klumer Academic Publisher, pp:29-52.
- Blunden, G., Cripps, A. L., & Jewers, K. (1980). Ruizgenin, a new steroidal saponin diol from *AgaveLecheguilla*. *Steroids*, 35(5), 503-510.
- Bottari, N. B., Lopes, L. Q. S., Pizzuti, K., dos Santos Alves, C. F., Corrêa, M. S., Bolzan, L. P., & Baldissera, M. D. (2017). Antimicrobial activity and phytochemical characterization of *Carya illinoensis*. *Microbial Pathogenesis*, 104, 190-195.
- Brinker, F. 1993. *Larrea tridentata* (D.C.) Coville (Chaparral or Creosote Bush). *British Journal of Phytotherapy* 3:1030.
- Carbu, M. (2006). Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Tesis doctoral. Universidad de Cádiz.
- Calvo-Araya, J. A., Rivera-Coto, G., Orozco-Cayasso, S., & Orozco-Rodríguez, R. (2012). Aislamiento y evaluación in vitro de la antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*, 23(2), 225-231.
- Cano, M. A. 2014. Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (*Fragaria spp.*). *Revista Colombiana de Ciencias Hortícolas*, 7(2), 263-276.
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Mendez, M., Rodríguez, R., Reyes, A., & Aguilar, C. N. (2010). In vitro antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn, *Industrial Crops and Products*, Vol. 32, No. 3, 324–328.

- Castillo, Q. D., Mares A. O. y Villavicencio G. E. E. 2011. Lechuguilla (*Agave lechuguilla* Torr.) planta suculenta de importancia económica y social de las zonas áridas y semiáridas de México. Boletín de la Sociedad Latinoamericana y del Caribe de Cactáceas y otras Suculentas 8: 6-9.
- Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo F. D., Gallegos-Morales G., Flores-Olivas A., Rodríguez-Herrera R. y Aguilar C. N. 2015. Efectividad in vitro de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia-Solani*. Revista mexicana de ciencias agrícolas, 6(3), 549-562.
- Chaves, N. y Wang A. 2004. Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. Agronomía costarricense, vol. 28(2), 73-85.
- Chen, H., Xiao, X., Wang, J., Wu, L., Zheng, Z., & Yu, Z. (2008). Antagonistic effects of volatiles generated by *Bacillus subtilis* on spore germination and hyphal growth of the plant pathogen, *Botrytis cinerea*. Biotechnology letters, 30(5), 919-923.
- Coyle, J., and Roberts, N.C. 1975. A Field Guide to the Common and Interesting Plants of Baja California. Natural History Publisher Company. La Joya, California, USA. 43 P.
- Cruz, L., L. Jacksens, I. Siro, F. Devlieghere Y J. Debevere. 2008. Envasado de fresas en alta concentración de oxígeno con atmósfera modificada en equilibrio. Ciencia y tecnología de alimentos, 18. (3), pp.: 24-29.
- Davidson, P. M., Taylor, T. M., & Schmidt, S. E. (2013). Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In Food microbiology (pp. 765-801). American Society of Microbiology.
- Dahiya, P., & Purkayastha, S. (2012). Phytochemical screening and antimicrobial activity of some medicinal plants against multi-drug resistant bacteria from clinical isolates. Indian journal of pharmaceutical sciences, 74(5), 443.
- de la Rosa, L. A., Alvarez-Parrilla, E., & Shahidi, F. (2010). Phenolic compounds and antioxidant activity of kernels and shells of Mexican pecan (*Carya illinoensis*). Journal of Agricultural and Food Chemistry, 59(1), 152-162.
- De Miccolis Angelini, R. M., Rotolo, C., Masiello, M., Gerin, D., Pollastro, S., & Faretra, F. (2014). Occurrence of fungicide resistance in populations of *Botryotinia fuckeliana* (*Botrytis cinerea*) on table grape and strawberry in southern Italy. Pest management science, 70(12), 1785-1796.
- de Rodríguez, D. J., García, R. R., Castillo, F. H., González, C. A., Galindo, A. S., Quintanilla, J. V., & Zuccolotto, L. M. (2011). In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. Industrial Crops and Products, 34(1), 960-966.

- Dean, R., J. A. Van-Kan, Z. A. Pretorius, K. E. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P. D. Spanu, J. J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis and G. D. Foster. 2012. The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13 (4), 414-430.
- do Prado, A. C. P, A. M. Aragão, R. Fett and J. M. Block. 2009. Antioxidant properties of Pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh.) C. Koch] shell infusion. *Grasas y aceites*, 60(4), 330-335.
- do Prado, A. C. P., da Silva, H. S., da Silveira, S. M., Barreto, P. L. M., Vieira, C. R. W., Maraschin, M., Ferreira S. R.S. & Block, J. M.. 2014. Effect of the extraction process on the phenolic compounds profile and the antioxidant and antimicrobial activity of extracts of pecan nut [*Carya illinoensis* (Wangenh) C. Koch] shell. *Industrial Crops and Products*, 52, 552-561.
- Domingo, D., & López-Brea, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. *Rev Esp Quimioterap*, 16(4), 385-393.
- Doss, R. P., S. W. Potter, A. G. Chastagner and J. K. Christian. 1993. Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Applied and Environmental Microbiology*, 1993, 59, 1786-1791.
- Doss, R. P., S. W. Potter, A.H. Soeldner, J. K. Christian and L. E. Fukunaga. 1995. Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 260-265.
- Doss, R. P., Deisenhofer, J. & von Nidda, H.-A., K. (2003). Melanin in the extracellular matrix of germlings of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 63, 687-691.
- EAFUS, "Everything Added to Food in the United States" (Todo lo que se agrega a la comida en los Estados Unidos). 2013. Consulta: 11 de Noviembre 2017. Disponible en; <https://www.accessdata.fda.gov/scripts/fcn/fcnNavigation.cfm?rpt=eafusListing>
- Elad, Y., B., Williamson, P., Tudzynski y N. Delen. 2007. "Botrytis spp. and diseases they cause in agricultural systems—an introduction". *Botrytis: Biology, pathology and control*. The Netherlands: Klumer Academic Publisher, pp: 1-8.
- Eloff, J. N. 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta medica*, 64(08), 711-713.
- Estrada-Nolasco, C. 2011. Caracterización fisiológica y productiva de dos variedades mexicanas de fresa (*Fragaria x Ananassa*) para el subtrópico. Edo de México: Colegio de postgraduados.

- FDA, Food and drug administration (Administración de drogas y alimentos). 2017. Lista de GRAS. Consulta: 12 de noviembre 2017, disponible en <https://www.fda.gov/AboutFDA/EnEspañol/>
- Flores, W., Chico, J., & Cerna, L. (2015). Actividad antagónica in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Fusarium oxysporum*, *Alternaria solani* y *Botrytis cinerea*. *Revista Rebiol*, 35(1), 34-42.
- Fraire-Cordero, M. D. L., Yáñez-Morales M. D. J., Nieto-Angel D., Vázquez-Gálvez Y G. 2003. Hongos patógenos en fruto de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3) pp.:285-291.
- García, A. Á., & Carril, E. P. U. (2011). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca (Biología)*, 2(3).
- García-Pérez, E., Castro-Álvarez, F. F., Gutiérrez-Urbe, J. A., & García-Lara, S. (2012). Revisión de la producción, composición fitoquímica y propiedades nutraceuticas del orégano mexicano. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 3(2), 339-353.
- Gepp, V., Vero, S., Cassanello, M. E., Romero, G., Silvera, E., González, P., Rebellato J., Ferrera Y. & Bentancur, O. (2012). Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 16(1), 97-107.
- Ghorbani, R., Wilcockson, S., Koocheki, A., & Leifert, C. (2008). Soil management for sustainable crop disease control: a review. *Environmental Chemistry Letters*, 6(3), 149-162.
- González-Álvarez, M., Moreno-Limón, S., Salcedo-Martínez, S. M., & Pérez-Rodríguez, E. C. (2015). Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de extractos de agave (*Agave scabra*, Salm Dyck) sobre hongos postcosecha. *Phyton (Buenos Aires)*, 84(2), 427-434.
- Granados-Sánchez, D., Sánchez-González A., Granados-Victorino R. L. Y Borja De La Rosa A. 2011. Ecología de la vegetación del Desierto Chihuahuense. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del ambiente*, 17, no SPE, 111-130.
- Guédez, C., Cañizález L., Castillo C. Y Olivar R.. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria spp.*). *Rev. Soc. Ven. Microbiol*, 29(1), pp.:34-38.
- Hammami, I.; Kamoun, N.; y Rebai, A. 2011. Biocontrol of *Botrytis cinerea* with essential oil y methanol extract of *Viola odorata* L. flowers. *Arch. Appl. Sci. Res.* 3:44 - 51.
- Hancock, B.G. 1997. Texas Pecan Handbook. Development of Pecan Industry, Texas Agricultural Extension Service: College Station, TX

- Harborne, J. B. y Williams C.A.. 1992. Advances in flavonoid research since 1992. *Phytochemistry*, 2000, 55(6), 481-504.
- Hernández, A. M. A., Necha, L. L. B., Lauzardo, A. N. H., & del Valle, M. G. V. (2011). Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 127.
- Hernández-Lauzardo, A.N., Bautista-Baños S., Velázquez-Del Valle M.G. And J.L. Trejo-Espino. 2006. Identification of *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.: Fr.) Vuill., Causal Agent of *Rhizopus* Rot Disease of Fruits and Vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 24(1) pp.:65-69.
- Hernández, R., Lugo, E. C., Díaz, L., & Villanueva, S. (2005). Extracción y cuantificación indirecta de las saponinas de *Agave lechuguilla* Torrey. *e-Gnosis*, (3): 1-9.
- Holz, G., S. Coertze And B. Williamson. 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. *Botrytis: Biology, pathology and control*. The Netherlands: Klumer Academic Publisher, pp:9-27.
- Jarvis, W.R. 1977. *Botryotinia* and *Botrytis* Species: taxonomy physiology and pathogenicity. Canada: Monograph No. 15, Research Branch Canada Department of Agriculture, pp:195.
- Kim, Y. M., Lee, C. H., Kim, H. G., & Lee, H. S. (2004). Anthraquinones isolated from *Cassia tora* (Leguminosae) seed show an antifungal property against phytopathogenic fungi. *Journal of agricultural and food chemistry*, 52(20), 6096-6100.
- Kim, Y. S., Lee, I. K., & Yun, B. S. (2015). Antagonistic Effect of *Streptomyces* sp. BS062 against *Botrytis* Diseases. *Mycobiology*, 43(3), 339-342.
- Khoshnevisan, B., S. Rafiee And H. Mousazadeh. 2013. Environmental impact assessment of open field and greenhouse strawberry production. *European journal of Agronomy*, 50, 29-37.
- Kretschmer M, Leroch M, Mosbach A et al. (2009) Fungicide-driven evolution and molecular basis of multidrug resistance in field populations of the grey mould fungus *Botrytis cinerea*. *PLOS Pathog* 5:e1000696.
- Lacherre, M. R. R., & Ruiz, J. R. C. (2014). Efecto antagónico in vitro de *Clonostachys rosea* sobre *Botrytis cinerea* procedente de cultivos de *Vitis vinifera*. *Revista Rebiol*, 33(2), 42-49.
- Latorre B.A, Spadaro I. y Rioja M.E. 2002. Occurrence of resistant strains of *Botrytis cinerea* to anilinopyrimidine fungicides in table grapes in Chile. *Crop Protection*, 21: 957 - 961

- Lennox C.L. y Spotts R.A. 2003. Sensitivity of populations of *Botrytis cinerea* from pear-related sources to benzimidazole and dicarboximide fungicides. *Plant Disease*, 87: 645 - 649.
- Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M. & Walker, A.-S. (2010). Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and Environmental Microbiology* Vol.76, No.19, pp.6615-6630, ISSN 0099-2240.
- Leroch, M., Kretschmer, M., & Hahn, M. (2011). Fungicide resistance phenotypes of *Botrytis cinerea* isolates from commercial vineyards in South West Germany. *Journal of Phytopathology*, 159(1), 63-65.
- Lira-Saldívar, R. H. (2003). Estado actual del conocimiento sobre las propiedades biocidas de la gobernadora [*Larrea tridentata* (DC) Coville]. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2).
- López, A., Vélez, M., Sánchez, M. S., Correa, C. R. B., & Gallo, P. I. 2006. Evaluación de extractos vegetales para manejo de hongos patógenos en banano y fresa almacenados. *Acta Agronómica*, 55(4), 39.
- Manzanero-Medina GI, Flores-Martínez A, SandovalZapotitla E, Bye-Boettler R. 2009. Etnobotánica de siete raíces medicinales en el Mercado de Sonora de la Ciudad de México. *Polibotánica* 27: 191 - 228.
- Martínez-Navarrete, N., Vidal, M. D. M. C., & Lahuerta, J. J. M. (2008). Los compuestos bioactivos de las frutas y sus efectos en la salud. *Actividad dietética*, 12(2), 64-68.
- Martínez, N., Almaguer, G., Vázquez-Alvarado, P., Figueroa, A., Zúñiga, C., & Hernández-Ceruelos, A. (2014). Análisis fitoquímico de *Jatropha dioica* y determinación de su efecto antioxidante y quimioprotector sobre el potencial genotóxico de ciclofosfamida, daunorrubicina y metilmetanosulfonato evaluado mediante el ensayo cometa. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas*, 13(5).
- Martins, S., Aguilar, C. N., Teixeira, J. A., & Mussatto, S. I. (2012). Bioactive compounds (phytoestrogens) recovery from *Larrea tridentata* leaves by solvents extraction. *Separation and Purification Technology*, 88, 163-167.
- Martins, S., Amorim, E. L., Sobrinho, T. J. P., Saraiva, A. M., Pisciotano, M. N., Aguilar, C. N., ... & Mussatto, S. I. (2013). Antibacterial activity of crude methanolic extract and fractions obtained from *Larrea tridentata* leaves. *Industrial Crops and Products*, 41, 306-311
- Masoko, P., J. Picard and J. N. Eloff. 2005. Antifungal activities of six south African *Terminalia* species (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 2005, 99(2), 301-308.



- Masoko, P., Picard, J., & Eloff, J. N. (2005). Antifungal activities of six south African Terminalia species (Combretaceae). *Journal of Ethnopharmacology*, 99(2), 301-308.
- Mirzaei, S., Goltapeh, E. M., Shams-Bakhsh, M., & Safaie, N. (2008). Identification of Botrytis spp. on plants grown in Iran. *Journal of phytopathology*, 156(1), 21-28.
- Moreno-Limón, S., González-Solís, L. N., Salcedo-Martínez, S. M., Cárdenas-Ávila, M. L., & Perales-Ramírez, A. (2011). Efecto antifúngico de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata* L.) sobre la inhibición *in vitro* de *Aspergillus flavus* y *Penicillium* sp. *Polibotánica*, (32), 193-205.
- Morin-Sardin, S., K. Rigalma, L. Coroller, J. L. Jany And E. Coton. 2016. Effect of temperature, pH, and water activity on *Mucor spp.* growth on synthetic medium, cheese analog and cheese. *Food microbiology*, 56, pp.:69-79.
- Morin-Sardin, S., J. L. Jany, S. Artigaud, V. Pichereau, B. Bernay, E. Coton, & S. Madec. 2017. Proteomic analysis of the adaptative response of *Mucor spp.* to cheese environment. *Journal of proteomics*, 154, pp.:30-39.
- Motsei, M. L., K. L. Lindsey, J. Van Staden And A. K. Jäger. 2003. Screening of traditionally used South African plants for antifungal activity against *Candida albicans*. *Journal of ethnopharmacology*, 86(2), 235-241.
- Muñoz-Acevedo, A., M. L. Castañeda, K. M. Blanco, C. Y. Cárdenas, J. A. Reyes, V. Kouznetsov Y E. E. Stashenko. 2007. Composición y capacidad antioxidante de especies aromáticas y medicinales con alto contenido de timol y carvacrol. *Scientia et technica*, 13(33), 125-128.
- Myresiotis C.K, Bardas G.A, Karaoglanidis G.S. 2008. Baseline sensitivity of Botrytis cinerea to Pyraclostrobin and Boscalid and control of anilinopyrimidineand benzimidazole-resistant strains by these fungicides. *Plant Disease*, 92: 1427 - 1431.
- Ncube, N. S., Afolayan, A. J., & Okoh, A. I. (2008). Assessment techniques of antimicrobial properties of natural compounds of plant origin: current methods and future trends. *African journal of biotechnology*, 7(12).
- Osorio, E., M. Flores, D. Hernández, J. Ventura, R. Rodríguez & C. N. Aguilar. 2010. Biological efficiency of polyphenolic extracts from pecan nuts shell (*Carya illinoensis*), pomegranate husk (*Punica granatum*) and creosote bush leaves (*Larrea tridentata* Cov.) against plant pathogenic fungi. *Industrial Crops and Products*, 31(1), 153-157.
- Pavón-Moreno, M. Á., I. González-Alonso, R. Martín-Santos Y T. García-Lacarra. 2012. Importancia del género *Alternaria* como productor de

micotoxinas y agente causal de enfermedades humanas. *Nutrición Hospitalaria*, 27(6), pp.:1772-1781

- Pazmiño-Miranda, P., Velástegui-Espín, G. P., Curay, S., Yáñez-Yáñez, W., & Vásquez, C. (2017). Efecto de los extractos hidro-etanólicos de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y cola de caballo (*Equisetum arvense* L.) sobre la incidencia y severidad de *Botrytis cinerea* en fresa. *Journal of the Selva Andina Biosphere*, 5(1), 29-38.
- Pedroso, A. T. R., Arrebato, M. A. R., Baños, S. B., Triana, A. C., & Rivero, D. (2012). Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento in vitro de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Revista Científica UDO Agrícola*, 12(1), 91-96.
- Pérez, M. D. L. O. L. (2008). Mecanismos de respuesta frente a la infección por *botrytis cinerea* en *solanum lycopersicum*. Estudio de las Beta-1, 4-endoglucanasas y de tratamientos inductores. Tesis de doctorado. Universitat de València
- Pérez, M.N., Pedroza-Flores, J. A., Villarreal-García, L. A., & Valdés-Lozano, C. G. (1995). Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y efecto de las enfermedades en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Marín, Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 13, 1-9.
- Plascencia-Tenorio, R. I., Olalde-Portugal, V., Mena-Violante, H. G., Ceja-Torres, L. F., Venegas-González, J., Oyoque-Salcedo, G., & Angoa-Pérez, M. V. (2012). Antagonismo in vitro de aislados bacterianos de fresa comercial y silvestre vs *Botrytis cinerea* y *Rhizopus stolonifer*. *Ra Ximhai*, 8(3).
- Ponce-González, F., García-Aguirre, M. G., Lozoya-Saldaña, H., & Herrera-Suárez, T. (2002). Resistencia de *botrytis cinerea* (pers.) fr., a dos fungicidas benzimidazoles utilizados en la floricultura. *Revista Chapingo. Serie Horticultura*, 8(1), 95-105.
- Prins, T. W., Tudzynski, P., Von Tiedemann, A., Tudzynski, B., ten Have, A., Hansen, M. E., Tenberge, K. & Van Kan, J. A. L. (2000). Infection strategies of *Botrytis cinerea* and related necrotrophic pathogens. En: J. W. Kronstad, (Ed), *Fungal Pathology*, Kluwer Academic Publishers., 33-64.
- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., & Oksman-Caldentey, K. M. (2001). Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *Journal of applied microbiology*, 90(4), 494-507.
- Ramos-García, M. D. L., Bautista-Baños, S., Barrera-Necha, L. L., Bosquez-Molina, E., Alia-Tejacal, I., & Estrada-Carrillo, M. (2010). Compuestos

antimicrobianos adicionados en recubrimientos comestibles para uso en productos hortofrutícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 28(1), 44-57.

- Reyes, S. R., Casanova, E. V., Gaona, M. C., & Saldarriaga, C. E. (2015). Identificación preliminar de los metabolitos secundarios de los extractos acuosos y etanólicos del fruto y hojas de *Morinda citrifolia* L. "noni" y cuantificación espectrofotométrica de los flavonoides totales. *UCV-SCIENTIA*, 2(2), 11-22.
- Rodríguez, S., Albertengo, L., Debbaudt, A., & Agulló, E. (2005). Uso del quitosano en alimentos. *Nuevas Tecnologías de Conservación de Productos Vegetales Frescos Cortados*. Eds. González-Aguilera, Gardea y Cuamea-Navarro. CIAD, México, 381-397.
- Sahgal, G., Ramanathan, S., Sasidharan, S., Mordi, M. N., Ismail, S., & Mansor, S. M. (2009). Phytochemical and antimicrobial activity of *Swietenia mahagoni* crude methanolic seed extract. *Tropical biomedicine*, 26(3), 274-279.
- Salas-Gómez, A.L. 2013. EFECTO DEL EXTRACTO DE *Jatropha dioica* EN EL CONTROL DE *Fusarium oxysporum* en TOMATE (*Solanum lycopersicum*). Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Tesis de Maestría. 87pp.
- Sauceda, E. N. R. (2011). Uso de agentes antimicrobianos naturales en la conservación de frutas Y Hortalizas. *Ra Ximhai*, 7(1), 153-170.
- SAGARPA, Secretaría De Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca Y Alimentación. Aumentan Exportaciones De Fresa "Hecho En México" 21.2 Por Ciento. Consulta: 12 de agosto de 2017. Disponible en: <http://www.gob.mx/sagarpa/prensa/aumentan-exportaciones-de-fresa-hecho-en-mexico-21-2-por-ciento>
- SIAP, Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Avances de siembras y cosechas 2016. Consulta: 12 de agosto de 2017 Disponible en: [http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola\\_siap\\_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do](http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalSinPrograma.do)
- Shami, A.M.M., K. Philip And S. Muniady. 2013. Synergy of antibacterial and antioxidant activities from crude extracts and peptides of selected plant mixture. *BMC Complementary & Alternative medicine*, 2013, 13, 360.
- Shreve, F., and Wiggins, I.L. 1964. *Vegetation and Flora of the Sonoran Desert*. Vol. II. Stanford University Press. Stanford, California, USA. 75 p.
- Silva, E. C. N., & Guerrero, O. A. (2011). Efecto de *Trichoderma lignorum* y *Sacharomyces cerevisiae* en el control del hongo *Botrytis Cinerea*

causante del moho gris de la fresa y su rendimiento, en el municipio de Subachoque Cundinamarca. *Revista Inventum*, (11), 12-20.

- Stuardo, M., & San Martín, R. (2008). Antifungal properties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) alkali treated saponins against *Botrytis cinerea*. *Industrial crops and products*, 27(3), 296-302.
- Tengerdy, R. P., Nagy, J. G., & Martin, B. (1967). Quantitative measurement of bacterial growth by the reduction of tetrazolium salts. *Applied microbiology*, 15(4), 954.
- Tiwari, P., Kumar, B., Kaur, M., Kaur, G., & Kaur, H. 2011. Phytochemical screening and extraction: a review. *Internationale pharmaceutica sciencia*, 1(1), 98-106.
- Trejo-Márquez, M. A., M. G. Vargas-Martínez, A. Sánchez-Soto, A. A. Lira-Vargas, S. Pascual-Bustamante, G. Granados-López Y A. G. Villavicencio-González. 2015. Extracción De Compuestos Bioactivos De Plantas Del Desierto Mexicano Para Su Aplicación En Envases Activos Para Zarcamora. *Revista Iberoamericana de Tecnología Postcosecha*, 16(1), 101-107.
- Ulloa, M., & Hanlin, R. T. *Illustrated dictionary of mycology*. USA: American Phytopathological Society (APS Press), 2000, 448 pp., ISBN: 0890542570.
- USDA, United States Department of Agriculture. Informe completo de todos los nutrientes: 09316, Fresas, crudas. Consulta: 12 de agosto de 2017. Disponible en: <https://ndb.nal.usda.gov/ndb/foods/show/2385?fgcd=&manu=&facet=&format=Full&count=&max=50&offset=&sort=default&order=asc&qlookup=09316&ds=&qt=&qp=&qq=&qn=&q=&ing=>
- Usman, H., Abdulrahman F.I. and Usman A. 2009. Qualitative phytochemical screening and *in vitro* antimicrobial effects of methanol stem bark extract of *Ficus thonningii* (Moraceae). *Afr. J. Trad.*, 6(3), 289-295.
- Velasco, C. R., Cisneros, J. M. C., Reyes, D. I. B., Cisneros, M. F. R., Paz, J. J. O., Marina, M. Á. S., Villalobos P.E. & Prieto, V. M. G. (2016). Identification and antagonistic activity in vitro of *Bacillus* spp. and *Trichoderma* spp. isolates against common phytopathogenic fungi. *Revista mexicana de fitopatología*, 34(1), 84-99.
- Velázquez-Del Valle, M. G., S. Bautista-Baños, A. N. Hernández-Lauzardo, M. G. Guerra-Sánchez Y E. Amora-Lazcano. 2008. Estrategias de control de *Rhizopus stolonifer* Ehrenb.(Ex Fr.) Lind, agente causal de pudriciones postcosecha en productos agrícolas. *Revista mexicana de fitopatología*, 26(1), pp.: 49-55.

- Velásquez, V.R. 1981. Evaluación de la actividad fungicida de la resina de gobernadora sobre *Eutypa armeniaca* Hans and Carter. Tesis de Licenciatura. Universidad Autónoma
- Verástegui-Montemayor, M. D. L. A. 1995. Análisis del efecto antifúngico de 20 extractos de plantas. Tesis de Maestría. Universidad Autónoma de Nuevo León. Monterrey Nuevo León.
- Verástegui, Á., J. Verde, S. García, N. Heredia, A. Oranday And C. Rivas. 2008. Species of *Agave* with antimicrobial activity against selected pathogenic bacteria and fungi. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, 24: 1249-1252
- Wagner, V. y Hazel, W. 2005. *Carya illinoensis* Pecan. In R. E. Litz (Ed.), *Biotechnology of fruit and nut crops*. CABI.
- Walker, A. S., A. Gautier, J. Confais, D. Martinho, M. Viaud, P. Le Pêcheur, J. Dupont And E. Fournier. 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*, 101(12), pp: 1433-1445.
- Wan, M., Li, G., Zhang, J., Jiang, D., & Huang, H. C. (2008). Effect of volatile substances of *Streptomyces platensis* F-1 on control of plant fungal diseases. *Biological Control*, 46(3), 552-559.
- Weber, R. W., & Entrop, A. P. (2011). Multiple fungicide resistance in *Botrytis*: a growing problem in German soft-fruit production. In *Fungicides-beneficial and harmful aspects*. InTech.
- Williamson, B., B. Tudzynski, P. Tudzynski And J. A. Van Kan. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 8(5), 561-580.
- Wong-Paz, J. E., Castillo-Inungaray, M. L., López-López, L. I., Contreras-Esquivel, J. C., Nevárez-Moorillon, G. V., & Aguilar, C. N. (2010). *Jatropha dioica*: Fuente potencial de agentes antimicrobianos. 2. *Revista Científica*, 2(4).
- Yadav, R. N. S., & Agarwala, M. (2011). Phytochemical analysis of some medicinal plants. *Journal of phytology*, 3 (12).
- Yamaguchi, H., & Okuda, K. I. (1998). Chemically modified tannin and tannin-copper complexes as wood preservatives. *Holzforchung-International Journal of the Biology, Chemistry, Physics and Technology of Wood*, 52(6), 596-602.
- Yourman, L. F., & Jeffers, S. N. (1999). Resistance to benzimidazole and dicarboximide fungicides in greenhouse isolates of *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 83(6), 569-575.