



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA CHAPINGO

DEPARTAMENTO DE INGENIERÍA AGROINDUSTRIAL

**EXTRACTOS DE AGUACATE CRIOLLO PARA INHIBIR EL  
DESARROLLO DE HONGOS FITOPATÓGENOS**

TESIS

QUE COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE

**MAESTRO EN CIENCIAS**

EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA AGROALIMENTARIA

PRESENTA

**SERGIO MANUEL MÉNDEZ ZÚÑIGA**



DIRECCIÓN GENERAL ACADÉMICA  
CENTRO DE SERVICIOS ESCOLARES  
OFICINA DE EXÁMENES PROFESIONALES



Chapingo, Edo de México; septiembre del 2015

**EXTRACTOS DE AGUACATE CRIOLLO PARA INHIBIR EL  
DESARROLLO DE HONGOS FITOPATÓGENOS**

Tesis realizada por **Sergio Manuel Méndez Zúñiga** bajo la dirección del Comité Asesor indicado, aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

**MAESTRO EN CIENCIAS EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA  
AGROALIMENTARIA**

DIRECTOR:



DR. EDUARDO CAMPOS ROJAS

CÓ-DIRECTOR:



DR. JOEL E. CORRALES GARCÍA

ASESORA:



DRA. MARÍA DEL ROSARIO GARCÍA MATEOS

ASESORA:



DRA. MA. CARMEN YBARRA MONCADA

Chapingo, Edo de México; septiembre del 2015

## DEDICATORIA

*A mis padres y hermanos, por ser mi inspiración y por estar conmigo siempre.*

## **AGRADECIMIENTOS**

A la Universidad Autónoma Chapingo, por abrirme una vez más sus puertas para dar un paso más en mi desarrollo profesional.

Al Departamento de Ingeniería Agroindustrial, en especial el Posgrado en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, por su apoyo y confianza durante mi estancia en el Posgrado.

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT), por brindarme el apoyo financiero para llevar a cabo los estudios de maestría.

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT), por el financiamiento otorgado para la culminación de este trabajo.

Al Dr. Eduardo Campos Rojas, por la dirección y apoyo durante el desarrollo de la presente investigación.

Al Dr. Joel. E. Corrales García, por su apoyo y asesoría durante el desarrollo de la presente investigación.

A la Dra. Ma. del Rosario García Mateos, por su apoyo y asesoría en el planteamiento y desarrollo de la fase experimental de la presente investigación.

A la Dra. Ma. Carmen Ybarra Moncada, por su asesoría y apoyo para la culminación de este trabajo.

Al Ing. Daniel Gonzalo Lino Martínez, por la aportación del material biológico utilizado en la investigación.

Al Dr. Marcelo Acosta Ramos, por su asesoría, apoyo y por facilitar las instalaciones del Laboratorio de Posgrado del Departamento de Parasitología Agrícola para realizar la evaluación *in vitro* de esta investigación.

A mis compañeros de la 12<sup>a</sup> Generación de la Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria, por su amistad y aportaciones en la presente investigación, en especial a Laura Leidy Cruz de la Cruz, Pedro Sol Flores y Eduardo Galeano Martínez.

A mis compañeros del Doctorado en Horticultura, Ángeles Díaz Mota y Juan Vázquez Sánchez por sus aportaciones en la presente investigación.

A mi inseparable compañera y amiga Teresa de Jesús Cornejo Vivar, por su compañía y apoyo durante mi estancia en la maestría y durante el desarrollo de la investigación.

A la Sra. Esperanza Salinas Banda, por su apoyo administrativo en el desarrollo de la investigación.

## **DATOS BIOGRÁFICOS**

Oriundo de El Salto, Pueblo Nuevo, Dgo., realizó sus estudios de nivel medio superior en la Preparatoria Agrícola en la Universidad Autónoma Chapingo en el periodo 2004-2007, posteriormente realizó sus estudios de licenciatura en la carrera de Carrera de Ingeniería Agroindustrial en la Universidad Autónoma Chapingo en el periodo de 2008-2012.

Durante los meses de Julio de 2012 a Febrero de 2013 se desempeñó profesionalmente en la Agencia de Desarrollo Rural “Canatlán Nuestra Tierra” A.C. ubicada en Durango, Dgo., en donde participó activamente en diversas actividades como: Formulación y Evaluación de Proyectos, capacitación a jornaleros en la siembra y cosecha de hortalizas, supervisión de los programas Diesel 2012, Maquinaria 2012 y Reconversión 2012 (INCA-SAGARPA), entre otras.

Realizó estudios de posgrado en el programa Maestría en Ciencia y Tecnología Agroalimentaria en la Universidad Autónoma Chapingo en el periodo de 2013-2015.

# EXTRACTOS DE AGUACATE CRIOLLO PARA INHIBIR EL DESARROLLO DE HONGOS FITOPATÓGENOS

## EXTRACTS OF NATIVE AVOCADO TO INHIBIT THE DEVELOPMENT OF PHYTOPATHOGENIC FUNGI

Méndez Z., S. M.; Campos R., E.; Corrales G., J.; García M., M. R.; Ybarra M. C.

### Resumen

Los métodos de control de patógenos se han basado en el uso de agroquímicos, que originan cepas resistentes, contaminación el medio ambiente e incremento en costos de producción, por lo que es necesario buscar alternativas naturales para su control. El objetivo de esta investigación fue evaluar *in vitro* la actividad antifúngica de extractos a partir de hoja, cáscara y semilla de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*). La extracción se realizó en Soxhleth, se utilizó como solvente cloroformo-metanol (2:1, v/v), se utilizaron cepas monospóricas de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*. El efecto de inhibición del micelio se ensayó con el método modificado de agar envenenado, a los datos obtenidos se les realizó un ANOVA, una comparación de medias Tukey ( $p=0.05$ ) y se obtuvo la Concentración Mínima de Inibición ( $CI_{50}$ ) mediante un análisis Probit. El extracto de semilla fue el extracto con mayor efecto de inhibición (71.73 %) sobre *C. gloeosporioides* y presentó una  $CI_{50}$  de 13.61, Los extractos de cáscara al 85 %, cáscara 50 % y semilla al 85 % fueron los que tuvieron mayor efecto de inhibición sobre el desarrollo del micelio de *B. cinerea*, sin embargo, no mostraron una diferencia significativa entre ellos, el extracto de mayor efectividad fue el de cáscara con una  $CI_{50}$  de 26.59.

**Palabras clave:** Antifúngico, extractos vegetales, hongos fitopatógeno.

### Abstract

Pathogen control methods have been based on the use of agrochemicals, which have caused resistant strains, environmental pollution and increased production costs, making it necessary to seek more natural alternatives. The objective of this research was to evaluate *in vitro* antifungal activity of extracts obtained from leaf, peel and seed of native avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*). The extraction was performed by the Soxhlet method, using chloroform:methanol (2:1, v/v) as solvent and monosporic strains of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botrytis cinerea*. The inhibitory effect on mycelium was tested with the modified poisoned agar method. The data obtained were submitted to an ANOVA and Tukey's comparison of means test ( $p=0.05$ ) and the Minimum Inhibitory Concentration ( $IC_{50}$ ) was obtained by Probit analysis. The seed extract showed the highest inhibitory effect on *C. gloeosporioides* with 71.73% and presented an  $IC_{50}$  of 13.61. Extracts from peel (85 %), peel (50 %) and seed (85 %) showed the highest inhibitory effect on mycelial development of *B. cinerea*; however, there were no significant differences among them. The peel extract was the most effective with an  $IC_{50}$  of 26.59.

**Keywords:** Antifungal, plant extracts, phytopathogenic fungi.

## CONTENIDO

DEDICATORIA .....	iii
AGRADECIMIENTOS .....	iv
DATOS BIOGRÁFICOS.....	vi
1. INTRODUCCIÓN .....	1
1.1    Objetivos .....	4
1.1.1    Objetivo general .....	4
1.1.2    Objetivos específicos .....	4
2. MARCO TEÓRICO.....	5
2.1.    Hongos fitopatógenos de importancia económica en poscosecha .....	5
2.2.    Colletotrichum gloeosporioides .....	6
2.2.1.    Clasificación taxonómica .....	6
2.2.2.    Antracnosis.....	7
2.2.3.    Proceso de infección .....	7
2.2.4.    Especies frutales afectadas por antracnosis.....	9
2.2.5.    Control de antracnosis.....	10
2.3.    Botrytis cinerea .....	11
2.3.1.    Clasificación taxonómica .....	12
2.3.2.    Moho gris .....	13
2.3.3.    Proceso de infección .....	13
2.3.4.    Especies frutales afectadas por el moho gris.....	14
2.3.5.    Control del moho gris.....	15
2.4.    Persea americana var. drymifolia.....	15
2.4.1.    Origen y clasificación taxonómica.....	16
2.4.2.    Distribución en México.....	17
2.4.3.    Descripción botánica.....	17
2.4.4.    Usos.....	18
2.4.5.    Compuestos bioactivos de aguacate.....	19
2.5.    Extractos naturales .....	21

2.5.1. Métodos de extracción .....	22
3. MATERIALES Y MÉTODOS .....	23
3.1. Planeación experimental .....	23
3.1.1. Fase preliminar.....	23
3.2. Material biológico .....	23
3.2.1. Aguacate criollo .....	23
3.2.2. Aislamiento de hongos fitopatógenos .....	24
3.2.3. Preparación del medio PDA.....	25
3.2.4. Identificación de las cepas .....	25
3.2.5. Purificación del hongo .....	26
3.2.6. Pruebas de patogenicidad.....	27
3.3. Preparación de los extractos vegetales .....	27
3.4. Diseño de tratamientos.....	28
3.4.1. Diseño experimental.....	30
3.5. Evaluación fungicida de los extractos in vitro .....	31
3.6. Análisis fitoquímico de los extractos .....	32
4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	33
4.1. Rendimientos de los extractos de hoja, cáscara y semilla de aguacate criollo .	33
4.2. Aislamiento y purificación de hongos fitopatógenos.....	33
4.3. Análisis de varianza para la inhibición de los hongos fitopatógenos.....	34
4.4. Efecto de los tratamientos sobre la inhibición del micelio de <i>C. gloeosporioides</i>	35
4.5. Efecto de los tratamientos sobre la inhibición del micelio de <i>B. cinerea</i> .....	39
4.6. Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ).....	41
4.7. Análisis fitoquímico de los extractos de aguacate criollo.....	41
5. CONCLUSIONES .....	44
6. REFERENCIAS .....	45
7. ANEXOS.....	55

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Diseño de tratamientos para <i>C. gloeosporioides</i> y <i>B. cinerea</i> .....	30
<b>Cuadro 2.</b> Estadísticas del análisis de varianza para el efecto de inhibición del crecimiento del micelio de <i>C. gloeosporioides</i> y <i>B. cinerea</i> sometidos a tratamientos con diferentes concentraciones de extractos cloroformo-metanólicos de semilla, cáscara y hoja de aguacate criollo.....	36
<b>Cuadro 3.</b> Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) para los extractos cloroformo-metanólicos de semilla, cáscara y hoja de aguacate criollo sobre el crecimiento del micelio de <i>C. gloeosporioides</i> y <i>B. cinerea</i> . .....	42
<b>Cuadro 4.</b> Análisis fitoquímico de los extractos cloroformo-metanólicos de semilla, cáscara y hoja de aguacate criollo.....	43

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Ciclo biológico de Antracnosis causada por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	8
<b>Figura 2.</b> Frutos infectados con <i>C. gloeosporioides</i> : a) Aguacate, b) Mango, c) Papaya, y d) Plátano.....	10
<b>Figura 3.</b> Frutos y órganos infectados con <i>B. cinerea</i> : a) Tomate, b) Fresa, c) Uva, d) Naranja, e) Chile y f) Hoja .....	14
<b>Figura 4.</b> a) Árbol de aguacate criollo mexicano, b) Inflorescencia, c) Fruto y d) Hojas.....	18
<b>Figura 5.</b> Estructura química del compuesto (Z,Z )-1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-12,15-dieno (persina).....	19
<b>Figura 6.</b> Fruto de aguacate criollo colectado en Axocopan, Puebla.....	24
<b>Figura 7.</b> Proceso de aislamiento y purificación de hongos fitopatógenos.....	27
<b>Figura 8.</b> Cáscara seca de aguacate criollo .....	28
<b>Figura 9.</b> Semilla de aguacate criollo troseada.....	28
<b>Figura 10.</b> Extractor Soxhlet conectado en serie con muestras de hoja, cáscara y semilla de aguacate criollo.....	29
<b>Figura 11.</b> Vista macroscópica (a) y microscópica (b) del crecimiento de <i>B. cinerea</i> aislada y purificada a partir de fresa y Vista macroscópica (c) y microscópica (d) de <i>C. gloeosporioides</i> aislada y purificada a partir de aguacate ‘Hass’.....	35

<b>Figura 12.</b> Porcentaje de inhibición del micelio del hongo <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> por efecto de los extractos cloroformo-metanólicos de semilla, cáscara y hoja de aguacate criollo a seis concentraciones .....	37
<b>Figura 13.</b> a) Micelio de <i>C. gloeosporioides</i> sin ningún tratamiento, b) Micelio de <i>C. gloeosporioides</i> tratado con Amistar <sup>®</sup> y c) Micelio de <i>C. gloeosporioides</i> tratado con extracto de semilla de aguacate criollo a concentración del 85 % .....	38
<b>Figura 14.</b> Porcentaje de inhibición del micelio del hongo <i>Botrytis cinerea</i> por efecto de los extractos cloroformo-metanólicos de semilla, cáscara y hoja de aguacate criollo a seis concentraciones. ....	40
<b>Figura 15.</b> a) Micelio de <i>B. cinerea</i> sin ningún tratamiento, b) Micelio de <i>B. cinerea</i> tratado con Elevat <sup>®</sup> , c) Micelio de <i>B. cinerea</i> tratado con extracto de semilla de aguacate criollo a una concentración de 85 %, d) Micelio de <i>B. cinerea</i> tratado con extracto de cáscara de aguacate criollo a una concentración de 50 % y e) Micelio de <i>B. cinerea</i> tratado con extracto de cáscara de aguacate criollo a una concentración de 85 % .....	41

## 1. INTRODUCCIÓN

En la agricultura mundial los hongos fitopatógenos son causantes de enfermedades de pre y poscosecha en hortalizas, cereales y frutas, siendo responsables de pérdidas económicas cuantiosas (Juárez-Becerra *et al.*, 2010). El daño que ocasionan no sólo se refiere a pérdidas de producción económica, sino también, la pérdida de producción biológica, es decir, a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedantes atacadas por estos microorganismos (Agrios, 2005).

Asegurar suficientes alimentos para la población mundial, podría lograrse a través de las tecnologías disponibles como: el aumento de la superficie de tierras agrícolas, aumento de rendimiento de los cultivos a través de agroquímicos, mejora de la gestión de suelo y agua, promoción de organismos genéticamente mejorados, más productivos y resistentes, y uso de pesticidas sintéticos. Sin embargo, dichas tecnologías deben aplicarse con precaución tomando en cuenta, la protección al medio ambiente, la biodiversidad y la salud del consumidor. De lo contrario, la aplicación imprudente de herramientas tecnológicas podría ser contraproducente (Carvalho, 2006), entre los riesgos se destaca el uso de pesticidas en la producción de alimentos (Hubbell, 1997).

En los últimos años se han buscado alternativas que contrarresten los problemas ligados al uso de plaguicidas organosintéticos, como aquellas obtenidas a partir de insumos biológicos como los bioproductos, los cuales son obtenidos a partir de organismos vivos

o recursos renovables e incluso del uso de prácticas de producción tradicionales en combinación con nuevas prácticas tecnológicas (Guédez *et al.*, 2008).

El control biológico es una herramienta que utiliza estos recursos para mantener las poblaciones de especies dañinas en cultivos por debajo de niveles que causen daños económicos (Guédez *et al.*, 2008).

En general, las plantas se defienden contra los patógenos mediante una combinación que involucra dos sistemas de acción: características estructurales que actúan como barreras físicas y las reacciones bioquímicas que tienen lugar en los tejidos de la planta y producen sustancias que son tóxicas o inhiben el crecimiento (Agrios, 1988). Por su parte los patógenos secretan compuestos que alteran directamente las células y los reguladores del crecimiento, provocando el deterioro general en las plantas (Agrios 2009).

Las plantas producen compuestos con propiedades antimicrobianas que pueden ser empleadas para controlar diferentes enfermedades en productos hortofrutícolas. La obtención de extractos vegetales y el estudio de sus compuestos activos propician su empleo contra diferentes fitopatógenos (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007).

En condiciones *in vitro* los extractos inhiben el crecimiento del patógeno, así como la esporulación y germinación de esporas, de modo que ayudan a controlar las enfermedades de frutos y hortalizas. *In vivo*, el efecto fungicida de los extractos vegetales varía en función de la metodología de extracción (disolvente, tiempo de almacenamiento, etc.), especie botánica, órgano de la planta (raíz, hoja, tallo y semilla), fecha de cosecha, etc.

Sin embargo, la combinación de los extractos vegetales con algún otro compuesto natural puede potenciar su actividad biológica (fungicida, bactericida, insecticida, etc.) (Hernández-Lauzardo *et al.*, 2007).

Unas de las enfermedades más severas en los frutos por las pérdidas económicas que ocasionan son la antracnosis y el moho gris causadas por *Colletotricum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*, respectivamente, por lo que se hace necesario intensificar la búsqueda de alternativas naturales para el control de dichos patógenos (Figtree *et al.*, 2013; Kumari *et al.*, 2014).

Como un caso especial de inmunidad a los ataques de hongos fitopatógenos, el aguacate criollo (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*) representa un material de estudio con gran potencial para evaluar las propiedades antifúngicas que pudiese tener en sus hoja, cáscara y semilla como una alternativa al manejo con plaguicidas que se da en poscosecha para el control de fitopatógenos (Torres-Gurrola *et al.*, 2011).

## **1.1 Objetivos**

### **1.1.1 Objetivo general**

Evaluar la actividad antifúngica de extractos de hoja, cáscara y semilla de aguacate criollo mediante bioensayos *in vitro* para inhibir el desarrollo de *Colletotricum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*.

### **1.1.2 Objetivos específicos**

- Aislar, identificar, purificar y propagar cepas monospóricas de *Colletotricum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*.
- Preparar extractos a partir de hoja, cáscara y semilla de aguacate criollo para evaluar su actividad fungicida.
- Identificar en los extractos presencia de terpenoides, flavonoides y alcaloides por cromatografía en capa fina.
- Evaluar *in vitro* la actividad de los extractos para el control de *Colletotricum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Hongos fitopatógenos de importancia económica en poscosecha

Las frutas son productos perecederos, susceptibles al ataque de microorganismos causantes de enfermedades, antes o después de la cosecha y durante su almacenamiento. Los hongos que causan estas enfermedades son denominados fitopatógenos (phyton: “planta”; pathos: “enfermedad”) (Trigos *et al.*, 2008; García, 2004).

Se considera que existen más de 8000 especies de hongos que producen enfermedades en las plantas. La mayoría de las plantas pueden ser atacadas por algún tipo de hongo (por uno o varios) y también se sabe que un mismo hongo fitopatógeno puede infectar a uno o más tipos de diferentes familias. Los hongos fitopatógenos pasan la mayoría de su ciclo de vida en la planta huésped (como parásitos) y otra parte en el suelo, en los residuos vegetales que se encuentran ahí (como saprófitos), aunque algunos sólo se desarrollan como parásitos (García, 2004).

Estos microorganismos constituyen un grupo de suma importancia en la agricultura debido a su número y a su capacidad de reproducción, lo que con frecuencia dificulta su control (FAO, 2004).

Los hongos fitopatógenos pueden producir manchas cloróticas y necróticas, cribados, tizones, podredumbres húmedas o secas, agallas, abolladuras, costras, ahogamientos y marchitamientos (Urbina, 2011).

Los hongos fitopatógenos no solo manchan, desfiguran o causan pudrición en los frutos, sino también reducen su valor en el mercado. Las pérdidas causadas por hongos fitopatógenos están entre el 30-95 % del total de la producción. Los hongos como *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, y *Penicillium* spp. afectan en todo el mundo principalmente en países con climas tropicales y subtropicales (Juárez-Becerra *et al.*, 2010).

## **2.2. *Colletotrichum gloeosporioides***

*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) es un patógeno prolífero y económicamente importante, ya que induce pérdidas sustanciales en el rendimiento, al afectar partes vegetativas y reproductivas al causar deterioro poscosecha de frutos de clima templado, subtropical y tropical (Latunde - Dada, 2001; Freeman *et al.*, 1996). Las enfermedades inducidas por este hongo incluyen: antracnosis, marchitamiento, pudrición radical, mancha foliar, pudrición de flores y tizón en plántulas (Kim *et al.*, 2001, Freeman *et al.*, 1996).

### **2.2.1. Clasificación taxonómica**

*Colletotrichum gloeosporioides* es el estado imperfecto de *Glomerella cingulata* (teleomorfo *Glomerella*) (Sutton, 1992). Su clasificación taxonómica según Agrios (1995) es la siguiente:

**Reino:** Mycetae o Fungi

**División:** Eumycota

**Subdivisión:** Deuteromycotina

**Clase:** Coelomycetes

**Orden:** Melanconiales

**Género:** *Colletotrichum*

**Especie:** *C. gloeosporioides*

### **2.2.2. Antracnosis**

La antracnosis es una enfermedad provocada por el hongo *C. gloeosporioides*, ataca tejidos muy jóvenes o tejidos muy viejos y físicamente débiles. Los ataques más severos a los frutos ocurren cuando coincide el estado más susceptible de cultivo (floración o fructificación) con un tiempo lluvioso y días de permanente humedad relativa, mayor al 90 % y temperaturas mayores a 20 °C. Las fuentes del inóculo se encuentran en las hojas, ramas, inflorescencias, brácteas de las yemas en los frutos, en términos generales en todo el árbol (Alarcón *et al.*, 2007). La mayor incidencia de la enfermedad se presenta en las áreas tropicales y subtropicales del planeta (Menezes-Morales *et al.*, 1996).

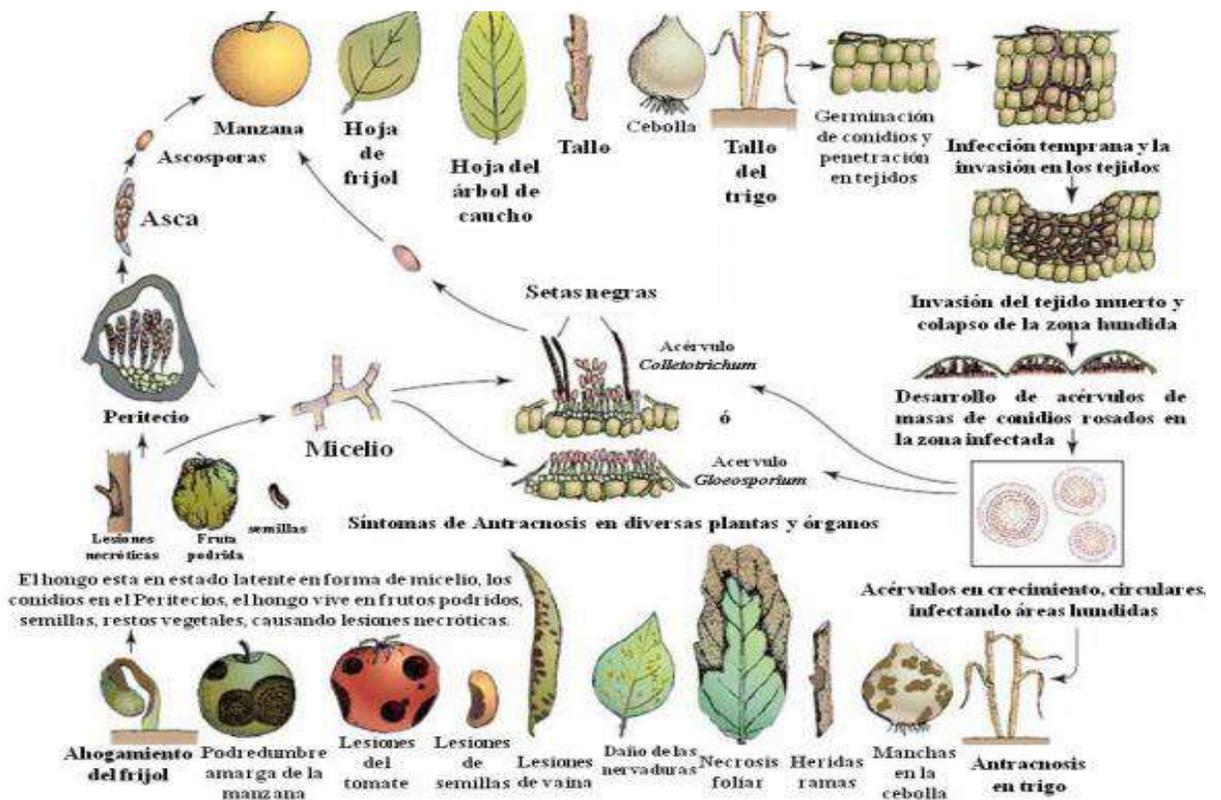
La enfermedad causada por las diferentes especies del género *Colletotrichum* spp se manifiesta por la aparición de manchas oscuras en hojas y frutos, con formas redondeadas u ovaladas, con tamaños variables que pueden oscilar entre 1 a 2 mm hasta 5 cm de diámetro, en algunas ocasiones. Las lesiones se presentan ligeramente hundidas o poseen un contorno levemente elevado; se presentan con tonalidades negras o marrones; en otras ocasiones, la infección aparece con coloración que va del rojo ladrillo al púrpura, y posteriormente cambian hacia coloraciones pardas oscuras, hasta adquirir tonalidades muy negras. El nombre de antracnosis hace alusión al aspecto visual de las manchas necróticas hundidas (Rivera, 1991).

### **2.2.3. Proceso de infección**

El proceso de infección de *C. gloeosporioides* se inicia con el contacto del hongo y el fruto o estructura que pueda afectar, sin ser necesaria la presencia de una herida para facilitar la entrada del hongo. El inóculo puede tener su origen en plantas enfermas. Por

medio de la lluvia (salpicadura) y el viento; las esporas son transportadas hasta los frutos que se encuentran en desarrollo (Chau *et al.*, 1983).

Uno de los conidios se establece en la superficie del fruto y germina si la humedad relativa es cercana al 100 % y si la temperatura fluctúa entre 25 y 29 °C, entonces el hongo produce una enzima llamada cutinasa, la cual es esencial en la penetración del tejido verde del fruto. Después de varias horas, el tubo germinativo se alarga y la punta se hincha para formar una estructura conocida como apresorio, el cual mantiene al hongo firmemente unido al fruto (Figura 1) (Binyamini *et al.*, 1971).



**Figura 1.** Ciclo biológico de Antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Agrios, 2002).

El hongo permanece en forma quiescente o latente (inactivo por un tiempo, pero con capacidad de reactivarse posteriormente unido a la epidermis por medio del apresorio y de la hifa subcuticular) y la reactivación se manifiesta principalmente en la etapa de poscosecha, cuando el fruto ingresa en la etapa climatérica o de maduración, es decir, cuando la temperatura es mayor a 25 °C y la humedad relativa es alta (>90 %) y los nutrientes son adecuados para la germinación de esporas y el desarrollo micelial, ya que en esta etapa numerosas enzimas degradan los carbohidratos presentes en el fruto, transformándolos en azúcares sencillos y ácidos orgánicos, necesarios para la nutrición y desarrollo del hongo.

Las hifas subcuticulares que habían permanecido inactivas o quiescentes, vuelven a estimularse y se ramifican a través del tejido hospedero, al que invade rápidamente, produciendo los síntomas típicos de la antracnosis (Verhoeff, 1974).

El desarrollo de la antracnosis se presenta también en el fruto en anaquel, favorecido por el mal manejo que se le da a la fruta antes, durante y después de la cosecha (Arauz *et al.*, 1983).

#### **2.2.4. Especies frutales afectadas por antracnosis**

Las especies frutales con reportes de infecciones causadas por *C. gloeosporioides* son: aguacate, cítricos, mango, papaya, plátano, maracuyá y guayaba. Este hongo que causa la antracnosis ataca hojas y frutos formando en el follaje lesiones que se presentan como manchas necróticas concéntricas de color negro a lo largo de las nervaduras siendo más conspicuas en el envés; las lesiones en los frutos aparecen ligeramente hundidas de color negro y bien definidas (Figura 2) (Alarcón *et al.*, 2007).



**Figura 2.** Frutos infectados con *C. gloeosporioides*: a) Aguacate, b) Mango, c) Papaya, y d) Plátano.

En México los productores han estimado pérdidas en poscosecha de fruta de papaya fresca (*Carica papaya*) entre 40 y 100 % (INIFAP, 2007), en aguacate (*Persea americana* Mill.) enfermedad que ocasiona pérdidas cercanas al 20 % de la producción (Rodríguez-López *et al.*, 2008), en tomate de árbol, manzano y mora causa pérdidas superiores al 50 % cuando se cultivan a campo abierto (Saldarriaga, 2006).

### 2.2.5. Control de antracnosis

En México el control químico de la antracnosis se ha basado en el uso de fungicidas Benzimidazoles, no obstante su control ha sido deficiente debido a la adquisición de resistencia. Entre los productos recomendados para el control de enfermedades poscosecha en frutales tropicales y subtropicales se encuentran el Procloraz (ingrediente activo: N-propil-N-[2-(2,4,6-triclorofenoxi) etil] imidazol-1-carboxamida) e Imazalil (ingrediente activo: (RS)-1-( $\beta$ -aliloxi-2,4-diclorofeniletil)imidazol), que se utilizan

ampliamente en Centro y Sudamérica, principalmente para el control de la antracnosis en plátano, mango y cítricos (INIFAP, 2007).

El caso de procloraz, tiene una efectividad de 96.5 % en la inhibición de la germinación y el crecimiento del micelio (Zavala *et al.*, 2005), en otras investigaciones se obtuvo un 100 % de inhibición con hidróxido de cobre y difenoconazol (ingrediente activo: 1-[2-[4-(4-clorofenoxi)-2-clorofenil]-4-metil-1). En cuanto a inhibición de la biomasa, los productos con mayor porcentaje de efecto inhibitorio son: difenoconazol (100 %) y benomil (benzimidazol) (93 % a 99 %) (Gaviria *et al.*, 2013).

Sin embargo, el uso de químicos en la fruticultura ha sido restringido en muchos países (Serrano *et al.*, 2005; Dayan *et al.*, 2009). Así, los países consumidores demandan productos agrícolas sin residuos de plaguicidas (Cutler *et al.*, 1999; Serrano *et al.*, 2005). Además, los plaguicidas pueden afectar las poblaciones de diversos organismos benéficos, y sus formas tóxicas pueden persistir en el suelo. Asimismo, se puede incrementar la resistencia de patógenos hacia los químicos sintéticos (Cakir *et al.*, 2005).

### **2.3. *Botrytis cinerea***

*Botrytis cinerea* (Pers), es un hongo necrotrófico, agente causal de la podredumbre gris, infecta una amplia variedad de plantas y puede hacer uso de diferentes mecanismos de infección (Benito *et al.*, 2000). Se desarrolla bajo condiciones de elevada humedad relativa y temperaturas de 15 a 20 °C (óptimo 18 °C) (Jarvis *et al.*, 1980).

El micelio se encuentra formado por un conjunto de hifas o filamentos tabicados y cilíndricos, los cuales se multiplican de forma vegetativa mediante división citoplasmática. Se considera una estructura de resistencia y tienen la capacidad de vivir por largo tiempo en bulbos, semillas y partes vegetativa de las plantas (Espinosa, 2006).

A partir del micelio, generalmente envejecido, se forman diversas estructuras tales como los macroconidióforos, microconidióforos y esclerocios cuya función es la propagación (Holz *et al.*, 2007).

Los conidios son las principales estructuras de dispersión y de resistencia del hongo, se consideran de corta duración en el campo y su supervivencia está determinada por la temperatura, humedad, actividad microbiana y la exposición a la luz. Los conidios son capaces de sobrevivir sobre la superficie vegetal, manteniendo su viabilidad y capacidad infectiva bajo las condiciones adversas (Holz *et al.*, 2007).

### **2.3.1. Clasificación taxonómica**

El nombre del género *Botrytis* se deriva del griego por la organización de las esporas en forma de racimos, ya que en griego *Botrytis* significa grupos de uvas. Mientras que el nombre de la especie *Botrytis cinerea* deriva del latín por uvas como cenizas.

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

**Reino:** Fungi

**División:** Amastigomycota

**Subdivisión:** Deuteromycota

**Clase:** Deuteromycetes

**Subclase:** Hyphomycetidae

**Familia:** Moniliales

**Género:** *Botrytis*

**Especie:** *B. cinerea*

### **2.3.2. Moho gris**

El moho gris es una de las principales enfermedades en frutas poscosecha, en la fresa, aparece como una mancha marrón claro o amarillenta hacia el final del cáliz y a los pocos días cubre de un moho gris, de apariencia polvosa, toda la superficie de hojas, tallos, flores y frutos, es capaz de afectar el 95 % de los frutos después de 48 h de cosechados (Matamoros, 1986). En general, las epidemias ocurren en condiciones frías y húmedas, que favorecen la infección y también pueden predisponer al hospedero de ser susceptible. Humedad relativa alta en el invernadero y libre de humedad en las superficies de las plantas se consideran los factores ambientales más importantes que influyen en la infección (Elad *et al.*, 1995).

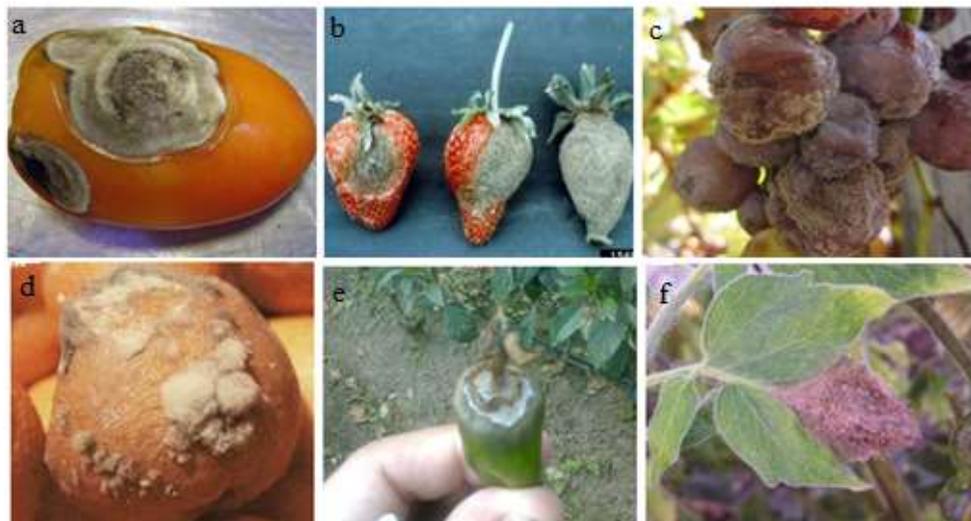
### **2.3.3. Proceso de infección**

Las esporas de *B. cinerea* pueden ser producidas sobre cualquier material vegetal y transportadas grandes distancias por corrientes de aire (Jarvis, 1977). Una vez que la espora ha alcanzado la superficie del huésped se inicia el ciclo de infección que, para facilitar su descripción y estudio, puede considerarse dividido en fases de acuerdo a Espinoza, (2006): 1) la adhesión y germinación de las esporas sobre la superficie del huésped; 2) su penetración en el tejido vegetal, bien a través de heridas o de aberturas naturales, o directamente mediante la participación de distintas actividades enzimáticas o mediante la participación de diversos procesos mecánicos (incluyendo la diferenciación de estructuras de penetración en algunos sistemas; 3) el establecimiento del patógeno en la zona de penetración, determinando la muerte de las células adyacentes al punto de penetración y dando lugar a la formación de una lesión primaria como consecuencia de la expresión de los mecanismos de defensa de la planta.

4) en muchos casos se inicia entonces una fase de latencia durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en la áreas de necrosis correspondientes a las lesiones primarias; 5) transcurrido un tiempo, en algunas lesiones primarias el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta e inicia su diseminación en el tejido vegetal circundante a partir de aquéllas, determinando la colonización y la maceración del tejido infectado en un breve periodo de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección.

#### 2.3.4. Especies frutales afectadas por el moho gris

El moho gris causado por *B. cinerea* tiene gran incidencia en cultivos de importancia tales como vid, tomate, chile, cítricos, fresa, ornamentales, entre otros (Figura 3), debido a lo anterior son muy numerosos los estudios que se han realizado sobre las interacciones en las que éste participa y sobre los posible métodos de control del patógeno (Coley *et al.*, 1980).



**Figura 3.** Frutos y órganos infectados con *B. cinerea*: a) Tomate, b) Fresa, c) Uva, d) Naranja, e) Chile y f) Hoja.

En los frutos de fresa aparece como una mancha marrón claro o amarillenta hacia el final del cáliz y a pocos días cubre de un moho gris, de apariencia polvosa, toda la superficie de la fruta (Matamoros, 1986, Baraona *et al.*, 1992).

### **2.3.5. Control del moho gris**

Cómo herramienta de manejo integrado el control biológico debe ser considerado; microorganismos parásitos como *Gliocladium roseum*. Aplicaciones de *Trichoderma harzianum* y *T. viridae*. Mantener el suelo enriquecido de materia orgánica con composta, enriquecido de microorganismos esenciales, el uso de *Bacillus subtilis*, *Pseudomonas spp.* y *Streptomyces spp.* (Chaves *et al.*, 2004; Esterio y Auger, 2007).

El control químico de *Botrytis* ha evolucionado ya que en un principio se basó casi exclusivamente al uso de fungicidas de la familia de los bencimidazoles, posteriormente la de las dicarboximidias; actualmente, con las nuevas moléculas desarrolladas en el mercado para controlar la enfermedad (Yourman *et al.*, 2000). Actualmente, las alternativas de aplicación son mayores, tales como Cabo<sup>®</sup> (Fenhexamida), Teldor Combi<sup>®</sup> (Fenhexamida y Tebuconazol) y Scala<sup>®</sup> (Pirimetanil) hacen parte esencial en los programas de rotación. Fenhexamida es el único miembro de la Clase 3 “Inhibidores de la C<sub>3</sub>-reductasa” de la biosíntesis de los esteroides (Lachaise, 2007; Steiger, 2007).

### **2.4. *Persea americana* var. *drymifolia***

En México, se han clasificado más de 500 variedades de aguacate, de estas se han seleccionado algunas para la creación de nuevas variedades comerciales, y se han clasificado en tres razas ecológicas básicas que incluyen “mexicana”, “guatemalteca” y “antillana”.

Existen diferencias fisiológicas entre razas, dentro de las que destacan el tamaño y forma de fruto, sabor, contenido de aceite, tolerancia a enfermedades, adaptación al clima y requerimientos de almacenamiento (Velázquez, 2008).

En México el consumo de aguacate está fuertemente arraigado en la mayor parte del territorio nacional, forma parte de la dieta como fuente de energía integrándose en diversos platillos tradicionales y a pesar de que su consumo en fresco ha limitado su desarrollo agroindustrial, se están innovando nuevas formas de valor agregado como pulpa procesada para elaboración de guacamole, mitades empacadas al vacío, pulpa deshidratada y otros procesos ya consolidados como el aceite para usos cosméticos (SIAP, 2015).

#### **2.4.1. Origen y clasificación taxonómica**

De la familia de las lauráceas, el aguacate es el nombre común con el que se conoce a esta generosa planta. La denominación se deriva del náhuatl y significa testículo, probablemente por la forma del fruto. Se sabe que el árbol creció por primera vez en las zonas altas del centro y del este de México, así como en las partes de la misma latitud de Guatemala, y el nombre científico que se le dio a la primera especie cultivada fue *Persea americana* (Villasis, 2009).

Su clasificación taxonómica es la siguiente:

**Reino:** Plantae

**División:** Magnoliophyta

**Familia:** Lauraceae

**Género:** *Persea*

**Especie:** *P. drymifolia*

### **2.4.2. Distribución en México**

Al ser México parte del centro de origen y dispersión del aguacate, se cuenta con gran diversidad de tipos “criollos”, la cual se ha diversificado a través del tiempo. Los estados con mayor variación de tipos de aguacate criollos son el Estado de México, Puebla y Oaxaca (Campos *et al.*, 2008).

En las áreas donde los aguacates criollos son nativos, prosperan a altitudes entre 950 a 2250 m; con una temperatura media anual de 13.5 a 20.5 °C donde predominan los ambientes templados y subtropicales, con una precipitación media anual de 650 a 2,200 mm. El eje neovolcánico constituido por los estados de Nayarit, Jalisco, Colima, Michoacán, Estado de México, Morelos y Puebla, es el área de mayor diversidad dentro de la raza mexicana y muy probablemente el centro de origen de la misma (de la Luz Sánchez-Pérez, 1999).

### **2.4.3. Descripción botánica**

Se caracteriza por ser un árbol perennifolio extremadamente vigoroso, pudiendo alcanzar hasta 20 m de altura (Figura 4a). Su sistema radical es bastante superficial. Hojas alternas, pedunculadas, muy brillantes; con flores perfectas en racimos subterminales, sin embargo, cada flor abre en dos momentos distintos y separados, es decir los órganos femeninos y masculinos con funcionales en diferentes tiempos, lo que evita la autofecundación. Por esta razón, las variedades se clasifican con base en el comportamiento de la inflorescencia en dos tipos A y B (protándrica y protoginia), en ambos tipos, las flores abren primero como femeninas, cierran por un periodo fijo y luego abren como masculinas en su segunda apertura (Figura 4b).

Su fruto es una baya de forma periforme, ovoide, globular o elíptica alargada (Campos *et al.*, 2008) (Figura 4c).

Su color varía del violeta al negro, son de más de 5 cm de longitud, con sabor y olor a anís, la cáscara es delgada, lisa y suave, las hojas en su mayoría son membranosas, presentan venas laterales, son de color verde oscuro (Figura 4d), tanto en las hojas como en el tallo tienen esencia a anís (Bergh, 1992).



**Figura 4.** a) Árbol de aguacate criollo mexicano, b) Inflorescencia, c) Fruto y d) Hojas.

#### 2.4.4. Usos

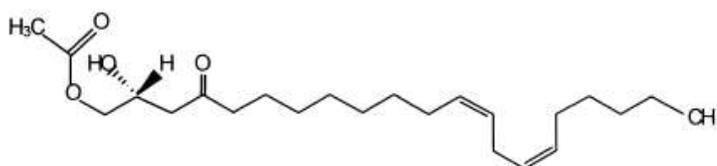
El aprovechamiento del árbol del aguacate criollo es integral, su madera es de buena calidad y en zonas rurales se le utiliza para la elaboración de distintas herramientas e instrumentos. La industria también obtiene beneficios, pues se le utiliza para obtener aceites, lociones, jabones, cremas y shampoo para el cabello. Su cultivo trae innumerables beneficios económicos a un amplio sector de la población rural y semiurbana de varios estados de la República (Villasis, 2009).

Es común ver en las casas rurales un árbol de aguacate criollo para consumo familiar, o, algunas huertas en cuyos frutos tienen la venta asegurada en los mercados ambulantes locales (Villasis, 2009).

En cuanto a sus propiedades farmacológicas, el banco de datos del IMEPLAN (1990) enlista las siguientes propiedades populares de la especie en el país: afrodisíaco, contra abscesos, anginas, antigripal, antidiarreico, antisentérico, antineurálgico, contra la sarna, el paludismo, como antiparasitario, antitumoral, antirreumático, cicatrizante, hemostático, dermatitis, sordera, tónico capilar, y para aumentar la secreción espermática (Ortíz de Montellano, 1993).

#### 2.4.5. Compuestos bioactivos de aguacate

Los extractos etanólicos de hojas inhiben el crecimiento de *Staphylococcus aureus*, *S. typhimurium* y *Mycobacterium tuberculosis* (Gómez-Flores *et al.*, 2008). El compuesto (Z, Z)-1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-12,15-dieno (persina) (Figura 5), mostró una notable actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides* disminuyendo la germinación de las esporas y el crecimiento del micelio (Domergue *et al.*, 2000), dicho compuesto se presenta en mayor concentración en hojas jóvenes (Raymond *et al.*, 1998).



**Figura 5.** Estructura química del compuesto (Z, Z)-1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa-12,15-dieno (persina).

En extractos metanólicos de las hojas de aguacate se ha reportado la presencia de alcaloides y triterpenos, por otra parte, también en los extractos acuosos se encontró la presencia de alcaloides, taninos, saponinas y flavonoides (Adeyemi *et al.*, 2002).

Con respecto al fruto, los extractos metanólicos de semillas tienen efecto antimicrobiano contra *Bacillus subtilis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Streptococcus pyogenes*, *Shigella dysenteriae*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus* y *Corynebacterium ulcerans* (Neeman *et al.*, 1970). El gen Snakin presente en la semilla de aguacate criollo y mostró actividad antimicrobiana contra cepas de *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* sugiriendo además que el gen actúa como un protector de la semilla del aguacate (Gusmán-Rodríguez *et al.*, 2013). Otros estudios sugieren que los ácidos grasos del aguacate; avocadenol, avocadenol B, (2R, 4R) -1, 2, 4-trihidroxinonadecano, y (2R, 4R) - 1,2,4-trihidroxihexadec-16-eno presentan actividad antimicobacteriana contra *Mycobacterium tuberculosis* (Lu *et al.*, 2012). Otro compuesto con actividad antifúngica fue identificado como fenol-2 ,4-bis (1, 1-dimetiletil), en una concentración de 100 µgml<sup>-1</sup>, la sustancia reduce la longitud del halo germinativo en *Aspergillus* y el crecimiento radial de *Phytophthora cinnamomi* (Rangel *et al.*, 2014).

Sobre la actividad de los metabolitos de la cáscara existen pocos reportes, sin embargo, se mostró que la exposición de los frutos de aguacate recién cosechadas a etileno o CO<sub>2</sub> incrementa las concentraciones de epicatequina y dieno antifúngico en la cáscara (Ardi *et al.*, 1998).

Los compuestos como el forbol y algunas acetogeninas presentan efecto antibacteriano (Neeman *et al.*, 1970; Ciegler *et al.*, 1971).

Otros estudios señalan varias clases de compuestos tales como los fitoesteroles, terpenoides, ácidos grasos, ácidos furanoicos, flavonoides y proantocianidinas, son responsables tanto de su efecto antifúngico como antibacteriano (Morais *et al.*, 2007).

## **2.5. Extractos naturales**

Los fitoquímicos juegan un papel importante en la prevención de enfermedades en frutas y hortalizas (Ding *et al.*, 2007), por dicha razón, las plantas han sido capaces de protegerse de plagas por sí mismas antes de que el hombre jugara un rol activo en protegerlas (Wilson *et al.*, 1999).

La defensa de las plantas contra el ataque de herbívoros está determinada por los compuestos individuales o mezclas específicas de ellos, aparentemente cada interacción entre una planta y su herbívoro puede ser determinado por las combinaciones específicas de compuestos, a diferentes concentraciones, y sus efectos sobre las diferentes etapas del herbívoro y sus procesos fisiológicos; se conoce que sintetizan una gran variedad de metabolitos secundarios relacionados con los mecanismos de defensa (Torres *et al.*, 2011).

Diversos productos derivados de las plantas han mostrado un efecto antimicrobiano. Entre estos compuestos destacan los flavonoides, fenoles, terpenoides, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos (Cowan, 1999). Sus mecanismos de acción son variables; por ejemplo, la toxicidad de los fenoles en microorganismos se atribuye a inhibición enzimática por oxidación de compuestos. El modo de acción de los

terpenoides y aceites esenciales no ha sido dilucidado por completo, pero se postula que pueden causar rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos.

De los alcaloides se ha postulado que interactúan con el DNA, y de las lectinas y polipéptidos se conoce que pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana o causar la inhibición por competencia de proteínas con el hospedero (Cowan, 1999).

### **2.5.1. Métodos de extracción**

El proceso para obtener metabolitos secundarios de los extractos vegetales es variable; se pueden obtener extractos acuosos o polvos (Bautista *et al.*, 2002a), el rendimiento de la extracción de compuestos está muy influenciado por la polaridad de los disolventes, y las metodologías de extracción (Abou-Jawdah *et al.*, 2002).

Durante el procesamiento del fruto de aguacate hay varios factores (temperatura, tipo de disolvente, tiempo de extracción, etc.) que influyen en el rendimiento del extracto y la pureza de los componentes extraídos.

### **3. MATERIALES Y MÉTODOS**

#### **3.1. Planeación experimental**

##### **3.1.1. Fase preliminar**

Consistió en la colecta de aguacate criollo; estandarización del proceso de extracción de los extractos de aguacate criollo; estandarización del proceso de obtención de cepas monospóricas de hongos fitopatógenos y evaluación fungicida de los extractos *in vitro*.

Se realizaron dos experimentos; uno para evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides* y el segundo para evaluar el porcentaje de inhibición del crecimiento del micelio de *B. cinerea*.

#### **3.2. Material biológico**

##### **3.2.1. Aguacate criollo**

Se colectaron frutos y hojas de un genotipo de aguacate criollo Mexicano (*Persea americana* Mill. var. *drymifolia*), en la región de Axocopan, municipio de Atlixco, Puebla (LN 18°54'45" y LO 98°25'40"). El material fue proporcionado por el Ingeniero Daniel Gonzalo Lino Martínez presidente del Sistema Producto Aguacate en el estado de Puebla. La colecta se realizó en la época de maduración fisiológica del fruto (julio 2014), momento en el cual el fruto alcanza su máximo tamaño y la tasa mínima de respiración (OCDE, 2004).

Para la colecta se escogió un árbol (Axocopan 2; Martínez, 2014) libre de lesión o daño típico de antracnosis u otro hongo fitopatológico, los frutos fueron principalmente de cáscara delgada, de color oscuro y con olor a anís.

El aguacate criollo colectado (Figura 6), se transportó dentro de cajas de aislamiento térmico a la Universidad Autónoma Chapingo, se congeló en nitrógeno líquido a -195 °C y se mantuvo a -80 °C hasta su procesamiento.



**Figura 6.** Fruto de aguacate criollo colectado en Axocopan, Puebla.

### **3.2.2. Aislamiento de hongos fitopatógenos**

El hongo *C. gloeosporioides* se obtuvo de frutos de aguacate ‘Hass’ provenientes de Coatepec Harinas, Estado de México, que presentaron lesiones características de la enfermedad, caracterizada por la presencia de necrosis circular, *B. cinerea* se obtuvo de frutos de fresa proveniente de Valle de Bravo, Estado de México. Los frutos infectados se sometieron a un proceso de esporulación en cámara húmeda a temperatura de 28 °C y humedad relativa cercana a 90 %.

Tanto en los frutos de aguacate como en los de fresa se tomaron fragmentos de tejido enfermo de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup>, fue necesario desinfectarlos con una solución de hipoclorito de sodio al 1.5 % por dos min con la finalidad de eliminar bacterias, posteriormente el material vegetal se enjuagó con agua estéril y después se colocó en

cajas Petri con 15 mL de medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA). El aislamiento de los hongos se realizó en una cámara de flujo laminar (Veco ®) y las cajas sembradas se incubaron durante siete días a 28 °C.

### **3.2.3. Preparación del medio PDA**

El medio de cultivo PDA, se preparó conforme a las especificaciones del fabricante (Marca BIOXON, BD-Bioxon PDA), se agregaron 39 g del medio en un litro de agua destilada, la mezcla se calentó a 60 °C en una parrilla eléctrica (CORNING PC-620-D) con una agitación de 300 rpm hasta disolver completamente el medio. Posteriormente, se esterilizó en olla de presión (Steele, modelo Presto 21 L) a 121 °C y 15 lb de presión por 15 min.

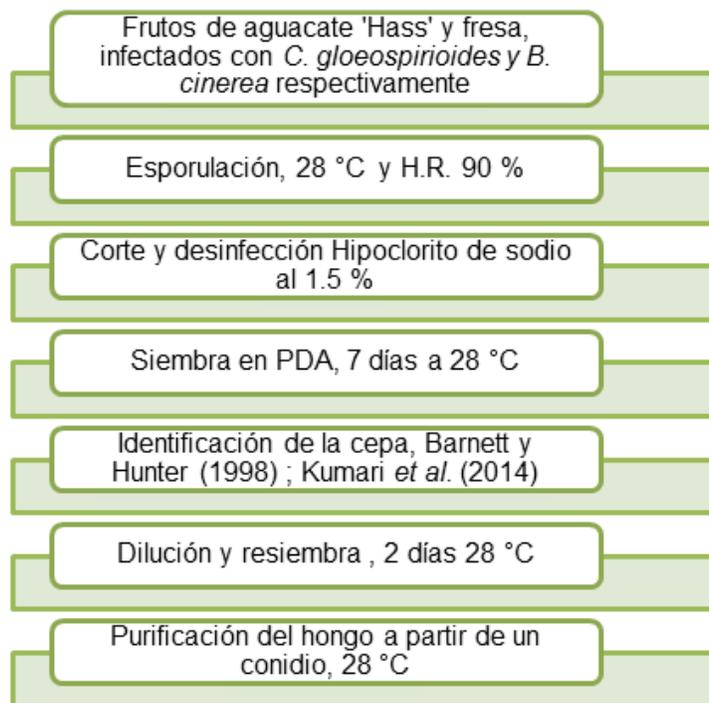
### **3.2.4. Identificación de las cepas**

Para la identificación de ambos hongos, se colocó una azada en un portaobjeto y se tiñó adicionando una gota de azul lactofenol (J.T. Baker ®) para ser observado en un microscopio óptico (Olympus, modelo CX31) utilizando el objetivo a 40 X y 100 X. Para identificar las características morfológicas de los hongos se utilizó la técnica de cinta pegante (Contreras, 2006). Las características morfológicas de la cepa de *C. gloeosporioides* obtenida se comparó con las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (1998) para género y Sutton, (1992) para especie y para *B. cinerea cinérea* se basó en la descripción de Kumari *et al.* (2014).

### 3.2.5. Purificación del hongo

Para ambos hongos fitopatógenos se siguió la misma técnica modificada del manual de procedimientos para la obtención de cultivos monospóricos (CORPOICA, 2001). Se vertió agua destilada en una caja Petri la cual contenía cepas de los hongos y se realizó un raspado moderado con la finalidad de desprender los conidios del medio. Se tomó 1 mL del agua destilada de la caja Petri y se diluyó en un tubo de ensayo con 9 mL de agua destilada y posteriormente se agitó el tubo con ayuda de un vortex para homogenizar, en total se hicieron nueve diluciones (CORPOICA, 2001).

Para realizar la resiembra se tomaron 10 µL de la última dilución y se sembró en una caja Petri con medio PDA. Después de 24 h se observó el crecimiento de las colonias en microscopio estereoscópico; se procedió a realizar una resiembra de una de las primeras colonias que comenzaron a crecer y se incubó a 28 °C (Figura 7) (CORPOICA, 2001).



**Figura 7.** Proceso de aislamiento y purificación de hongos fitopatógenos.

### 3.2.6. Pruebas de patogenicidad

Esta prueba se realizó para comprobar si la cepa aislada conserva su poder de infección en los frutos y generar los síntomas característicos de antracnosis en aguacate ‘Hass’ y de moho gris en fresas. Se seleccionaron tres frutos de aguacate ‘Hass’ y tres frutos de fresa sanos, sobre los frutos se inoculó 1 mL de solución a una concentración de  $10^5$  UFC mL<sup>-1</sup> sobre heridas causadas previamente mediante punción con aguja de disección estéril, se utilizaron tres frutos de cada especie como testigos en los cuales también se provocaron heridas en las cuales solo se colocó agua estéril.

Se colocaron en cámaras húmedas a una temperatura de  $\pm 25$  °C y se revisaron cada 24 h para observar los síntomas (Saldarriaga, 2006).

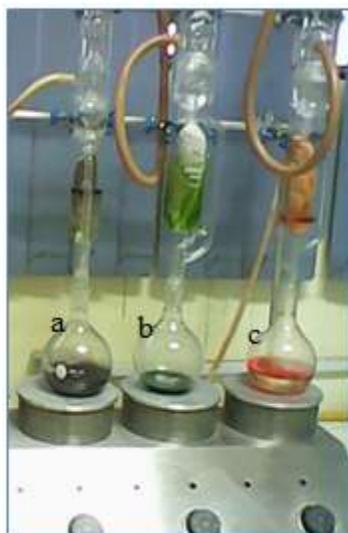
### 3.3. Preparación de los extractos vegetales

Las hojas y la cáscara del fruto de aguacate criollo se secaron en una estufa a temperatura constante de 45 °C durante 48 h (Figura 8), al terminar el secado, la cáscara y las hojas se pulverizaron en seco en una licuadora doméstica. La semilla de aguacate criollo se sometió a un troceado manual con un cuchillo y se sometió al proceso de extracción en fresco (Figura 9).



**Figura 8.** Cáscara seca de aguacate criollo. **Figura 9.** Semilla de aguacate troseada.

La extracción se realizó en aparato Soxhlet conectado en serie (Figura 10) con una mezcla cloroformo:metanol (2:1, v/v) (Fulgencio, 2011), se colocó el material a extraer, previamente molido y pesado en un cartucho de papel filtro que se introdujo en el tubo de extracción. El disolvente se calentó a punto de ebullición del metanol (>65 °C) por ser el disolvente con el punto de ebullición más alto. La extracción se realizó durante 48 h, después se retiró el disolvente con ayuda de un rotaevaporador Buchi y el extracto crudo se conservó en viales de vidrio color ámbar en refrigeración (García-Mateos *et al.*, 2007).



**Figura 10.** Extractor Soxhlet conectado en serie con muestras de a) cáscara, b) hoja y c) semilla de aguacate criollo.

### 3.4. Diseño de tratamientos

La unidad experimental consistió de una caja Petri con medio PDA a la que se le asignó un tratamiento y posteriormente se sembró un fragmento de PDA de 5 mm<sup>2</sup> con micelio de un hongo fitopatógeno, se realizaron cinco repeticiones por tratamiento.

Se prepararon soluciones acuosas a concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50 y 85 % de cada extracto y se utilizó el fungicida comercial Amistar<sup>®</sup> como testigo positivo para *C. gloeosporioides* y para *B. cinerea* se utilizó Elevat<sup>®</sup> (Cuadro 1).

**Cuadro 1.** Diseño de tratamientos para *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*

	Tratamientos		Variable respuesta
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>B. cinerea</i>	
1	Testigo	Testigo	Crecimiento (mm) del diámetro del micelio
2	Amistar <sup>®</sup>	Elevat <sup>®</sup>	
3	Extracto de cáscara al 10 %	Extracto de cáscara al 10 %	
4	Extracto de cáscara al 20 %	Extracto de cáscara al 20 %	
5	Extracto de cáscara al 30 %	Extracto de cáscara al 30 %	
6	Extracto de cáscara al 40 %	Extracto de cáscara al 40 %	
7	Extracto de cáscara al 50 %	Extracto de cáscara al 50 %	
8	Extracto de cáscara al 85 %	Extracto de cáscara al 85 %	
9	Extracto de hoja al 10 %	Extracto de hoja al 10 %	
10	Extracto de hoja al 20 %	Extracto de hoja al 20 %	
11	Extracto de hoja al 30 %	Extracto de hoja al 30 %	
12	Extracto de hoja al 40 %	Extracto de hoja al 40 %	
13	Extracto de hoja al 50 %	Extracto de hoja al 50 %	
14	Extracto de hoja al 85 %	Extracto de hoja al 85 %	
15	Extracto de semilla al 10 %	Extracto de semilla al 10 %	
16	Extracto de semilla al 20 %	Extracto de semilla al 20 %	
17	Extracto de semilla al 30 %	Extracto de semilla al 30 %	
18	Extracto de semilla al 40 %	Extracto de semilla al 40 %	
19	Extracto de semilla al 50 %	Extracto de semilla al 50 %	
20	Extracto de semilla al 85 %	Extracto de semilla al 85 %	

Para dar cumplimiento al supuesto de normalidad de las observaciones los datos obtenidos se sometieron Box-Cox (Box y Cox, 1964):

Donde  $X'_\lambda$  = variable respuesta  $x'_\lambda = \frac{x^\lambda - 1}{\lambda}$  transformada

$x$  = variable respuesta

$\lambda$  = valor redondo (se selecciona el valor que logra que la transformación se acerque al máximo a los datos).

Para comprobar el supuesto de homogeneidad de varianzas se realizó la prueba de Levene para distribuciones continuas (Johnson y Wichern, 2007).

### 3.4.1. Diseño experimental.

Se usó un diseño experimental completamente al azar, cuyo modelo lineal es (Montgomery, 2004 ):

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Donde:

$y_{ij}$ : variable respuesta

$\mu$ : media general

$\tau_i$ : tratamientos

$\epsilon_{ij}$ : error experimental

con los supuestos  $\epsilon_{ij} \sim NI(0, \sigma^2)$ ,  $\sigma^2$  constante.

Se realizó una prueba de comparación de medias de Tukey con  $\alpha = 0.05$  (Montgomery, 2004) y se calculó la concentración letal media ( $CI_{50}$ ) mediante un modelo probit (Finney, 1952), cuyo modelo probabilístico corresponde a:

$$P = \alpha + \beta[\log_{10}(\text{Dosis})]$$

Donde

P: Valor de la normal inversa, más una constante de corrección (para evitar valores negativos)

$\alpha$ : valor estimado de la intersección, con su error estándar asociado

$\beta$ : valor estimado de la pendiente, con su error estándar asociado

Para el análisis de los datos se usaron los paquetes estadísticos Minitab<sup>®</sup> y Statistical Analysis System (SAS, 2002), versión 9.13.

### 3.5. Evaluación fungicida de los extractos *in vitro*

Para establecer la Concentración Letal Media (CI<sub>50</sub>), se prepararon soluciones acuosas a concentraciones de 10, 20, 30, 40, 50 y 85 % de cada extracto. Para el testigo negativo se utilizaron 100 µL de metanol para ambos hongos fitopatógenos y para los testigos positivos se utilizó Amistar<sup>®</sup> a 0.05 % para *C. gloeosporioides* y para *B. cinerea* Elevat<sup>®</sup> a 300 ppm.

El medio utilizado fue PDA (Papa Dextrosa Agar), el efecto fungicida de los extractos se probó mediante la modificación del método de agar envenenado (Reyes *et al.*, 1998) y se hicieron cinco repeticiones para cada tratamiento. Se colocaron 100 µL del extracto en el medio solidificado en cajas Petri y se extendió sobre la superficie del medio, después de 2 min se colocó en el centro un fragmento de PDA infectado con la cepa de interés a evaluar de aproximadamente 5 mm<sup>2</sup>, la incubación se realizó a 28 °C y el crecimiento radial del micelio se observó durante 10 días en *C. gloeosporioides* y ocho días en *B. cinerea* o hasta que el micelio del testigo negativo cubrió el total de la superficie de la caja Petri.

La variable a medir fue el Porcentaje de Inhibición del Crecimiento (PIC), el cual se calculó con la fórmula  $PIC = (D_1 - D_2 / D_1) * 100$ ; donde PIC = Porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio, D<sub>1</sub> = Diámetro en mm del testigo, D<sub>2</sub> = Diámetro (mm) del tratamiento.

### **3.6. Análisis fitoquímico de los extractos**

Por cromatografía en capa fina (CCF) de gel de sílice 60 F<sub>254</sub> (Merck), se detectó cualitativamente la presencia de alcaloides, flavonoides y terpenoides en los extractos cloroformo-metanólicos de semilla, cáscara y hoja de aguacate criollo. Para la identificación de alcaloides se usó como eluyente metanol:diclorometano (8:2 % v/v) y el agente cromogénico fue el reactivo Dragendorff. La presencia de manchas color marrón en la cromatoplaaca indicaron la presencia de alcaloides (Wagner y Bladt, 1996).

Para la identificación de flavonoides se empleó como eluyente una mezcla de butanol:ácido acético:agua (BAW) en una proporción de 40:10:50 % (v/v), los agentes cromogénicos fueron 2-aminoetil difenilborinato (NP) y polietilenglicol 4000 (PEG); los componentes se visualizaron mediante UV a una longitud de onda de 365 nm para observar la fluorescencia de color anaranjado esperada para flavonoides (Wagner y Bladt, 1996). Para la identificación de terpenoides se utilizó como eluyente una mezcla de tolueno:acetato de etilo (85:15 % v/v), el agente cromogénico empleado fue vainillina al 1% en etanol y ácido sulfúrico al 10 % en etanol, la presencia de manchas en la placa de color violeta indicó prueba positiva para terpenoides (Wagner y Bladt, 1996).

## 4. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

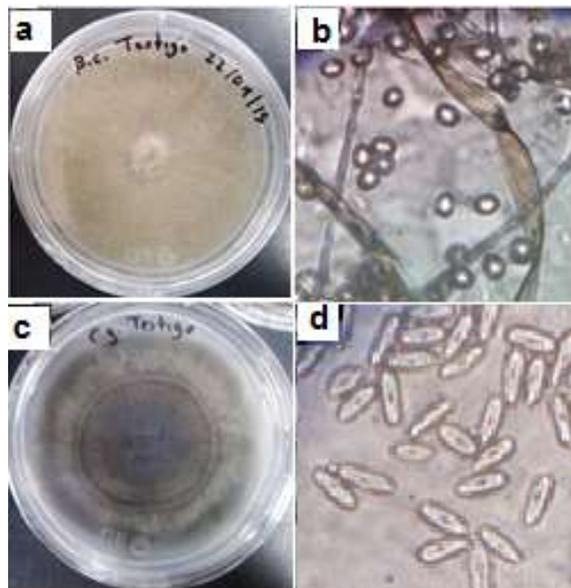
### 4.1. Rendimientos de los extractos de hoja, cáscara y semilla de aguacate criollo

Los rendimientos de extracción para hoja, cáscara y semilla fueron de 9.18, 15.67 y 12.31 g 100 g<sup>-1</sup> de peso seco, respectivamente. No existen reportes anteriores de extracción con el mismo método y material biológico. Sin embargo, Adeyemi. (2002) obtuvo un rendimiento de 7 % del extracto acuoso de hojas de *Persea americana* Mill. obtenido por decocción en agua. Existen factores que afectan directamente el rendimiento de la extracción como: los disolventes utilizados, el tiempo de extracción, y otros factores que afectan la calidad fitoquímica de un extracto como lo son, la familia y género de la planta, estrés precosecha de la planta, estado fenológico, órgano o parte de la planta, el tiempo transcurrido desde la cosecha hasta su procesamiento, temperatura de extracción, temperatura y método de almacenamiento, entre otros, por lo que los resultados siempre serán variables (Bruneton, 2001).

### 4.2. Aislamiento y purificación de hongos fitopatógenos

Los aislamientos de los hongos fitopatógenos *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* coincidieron con la descripción macroscópica y microscópica propuesta por Sutton (1992) para *C. gloeosporioides* y descrita por Kumari *et al.* (2014) para *B. cinerea*, obteniendo conidios con las siguientes características: conidios rectos, céreos y cilíndricos con ambos extremos redondeados para *C. gloeosporioides* y para *B. cinerea*

conidios ovalados y dispuestos en racimos además de una estructura semejante a una raíz vegetal al inicio del conidióforo septado, el crecimiento del micelio fue típico en ambas especies, para *C. gloeosporioides* el crecimiento fue radial y regular de color rosa en los primeros siete días y cambiando de gris a oscuro en días posteriores (Figura 11). En *B. cinerea* se observó un crecimiento radial e irregular con coloraciones claras en los cinco primeros días y cambiando a café claro en los días posteriores desarrollando estructuras aéreas con apariencia esponjosa.



**Figura 11.** Vista macroscópica (a) y microscópica (b) del crecimiento del micelio de *B. cinerea* aislado y purificado a partir de fresa y Vista macroscópica (c) y microscópica (d) del micelio de *C. gloeosporioides* aislado y purificado a partir de aguacate ‘Hass’.

#### 4.3. Análisis de varianza para la inhibición de los hongos fitopatógenos

Los análisis de varianza mostraron diferencia significativa en el efecto de inhibición causado por los tratamientos sobre el crecimiento de los dos hongos fitopatógenos. El coeficiente de determinación para ambos hongos fue mayor a 0.99, lo que indica que el

modelo utilizado describe correctamente a los datos obtenidos; el coeficiente de variación en ambos casos fue menor del 3 % lo que indica un buen control en el experimento (Cuadro 2).

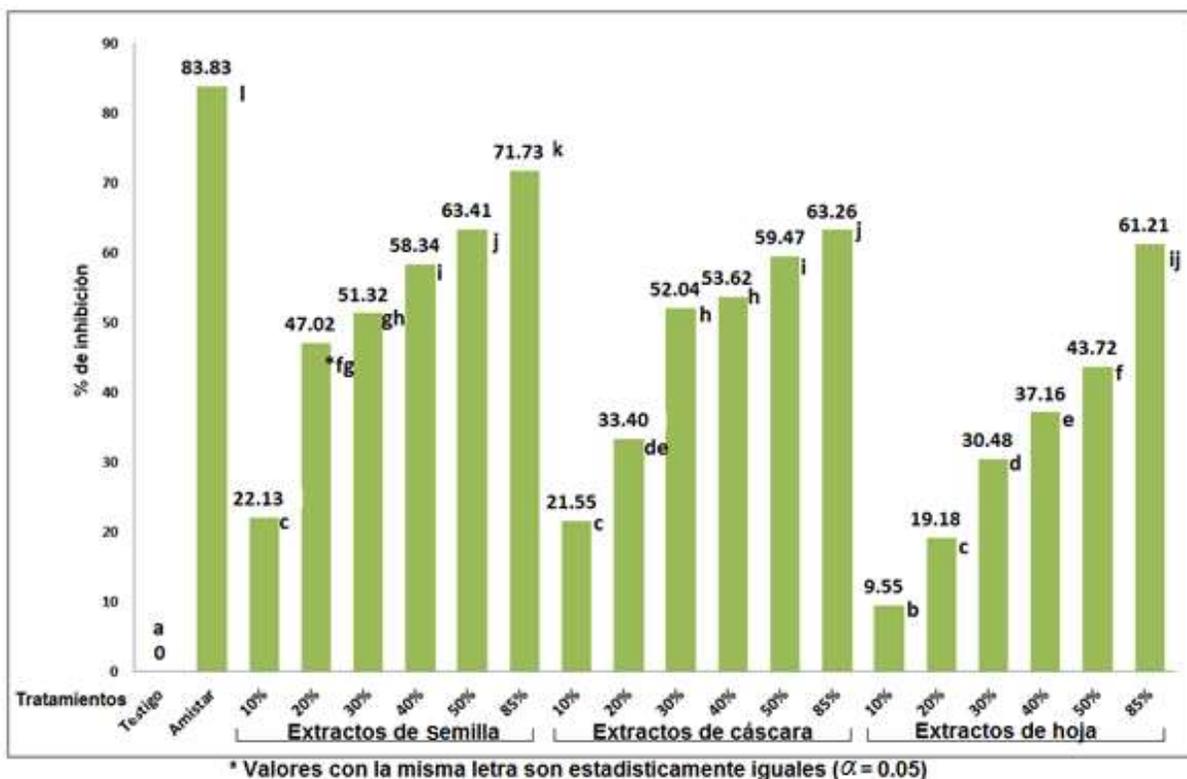
**Cuadro 2.** Estadísticas del análisis de varianza para el efecto de inhibición del crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* sometidos a tratamientos con diferentes concentraciones de extractos cloroformo:metanólicos de semilla, cáscara y hoja de aguacate criollo.

Patógeno	$\bar{\alpha}$	R <sup>2</sup>	C.V.	S	e.e. $\bar{y}$	CMM	CME
<i>C. gloeosporioides</i>	<0.001	0.993	2.10	0.233	0.02	36.23	0.054
<i>B. cinerea</i>	<0.001	0.991	2.48	0.286	0.03	42.02	0.082

$\bar{\alpha}$ : Nivel de significancia observado, R<sup>2</sup>: Coeficiente de determinación, C.V.: Coeficiente de Variación, e.e. $\bar{y}$ : Error estándar, CMM: Cuadrado medio del modelo, CME: Cuadrado medio del error.

#### 4.4. Efecto de los tratamientos sobre la inhibición del micelio de *C. gloeosporioides*

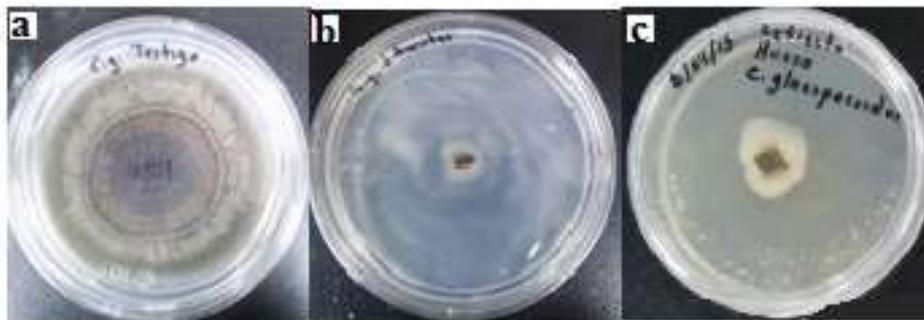
Para *C. gloeosporioides* el tratamiento que presentó la mayor inhibición (83.8 %) sobre el crecimiento del micelio fue el fungicida comercial Amistar<sup>®</sup>. El ingrediente activo de este fungicida es una estrobilurina llamada azoxystrobin, actúa interfiriendo el flujo de electrones desacoplando la fosforilación oxidativa y, por consiguiente, afectando la producción de energía en forma de ATP (Zavala *et al.*, 2005). Todos los tratamientos con extractos de aguacate criollo mostraron un efecto positivo en la inhibición del micelio, sin embargo, ninguno logró igualar el efecto inhibitorio del fungicida comercial (Figura 12).



**Figura 12.** Porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* por efecto del fungicida Amistar® y de los extractos cloroformo:metanólicos de semilla, cáscara y hoja de aguacate criollo a seis concentraciones.

En general se observó una tendencia de aumento en el porcentaje de inhibición al aumentar la concentración de los extractos, las tendencias sugieren que al usar los extractos de semilla a concentraciones cercanas al 100 % se podría igualar el efecto de inhibición del fungicida comercial Amistar®, el tratamiento de mayor concentración de semilla fue el que causó mayor efecto de inhibición.

Con respecto a Amistar<sup>®</sup>, la inhibición fue menor en un 14.4 % (Figura 13).



**Figura 13.** a) Micelio de *C. gloeosporioides* sin ningún tratamiento, b) Micelio de *C. gloeosporioides* tratado con Amistar<sup>®</sup> y c) Micelio de *C. gloeosporioides* tratado con extracto de semilla de aguacate criollo a concentración del 85 %.

El extracto de semilla al 85 % superó en la inhibición del crecimiento de micelio de *C. gloeosporioides* a los extractos metanólicos al 100 % de *Opuntia* reportados por Mecalco *et al.* (2014), que inhibieron el 30.36 %, los extractos de aguacate criollo probados en esta investigación, también superaron los resultados obtenidos con extractos etanólicos de *Piper auritum*, *Psidium guajava* y *Eucalyptus globulus* reportados por Baños-Guevara *et al.* (2004), que redujeron el crecimiento de *C. gloeosporioides* en 48.82, 47.77 y 39.03 %, respectivamente. Sin embargo, el efecto de los extractos cloroformo-metanólicos de aguacate criollo está por debajo del efecto inhibitorio de extractos etanólicos de ajo reportados por Landero *et al.* (2013), que al 10 y 15 % son capaces de inhibir *in vitro* al 100 % el crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides* y al del aceite esencial de canela, que a concentraciones de 0.0050, 0.0100 y 0.0150 % inhibieron en un 100 % el crecimiento miceliar de *C. gloeosporioides* aislado de papaya, considerando estos extractos como promisorios para inhibir el desarrollo del hongo.

Los extractos de semilla al 50 %, cáscara al 85 % y hoja al 85 % no mostraron diferencia significativa entre ellos, sin embargo, mostraron un efecto positivo en la inhibición del hongo (61.21 a 63.41 %).

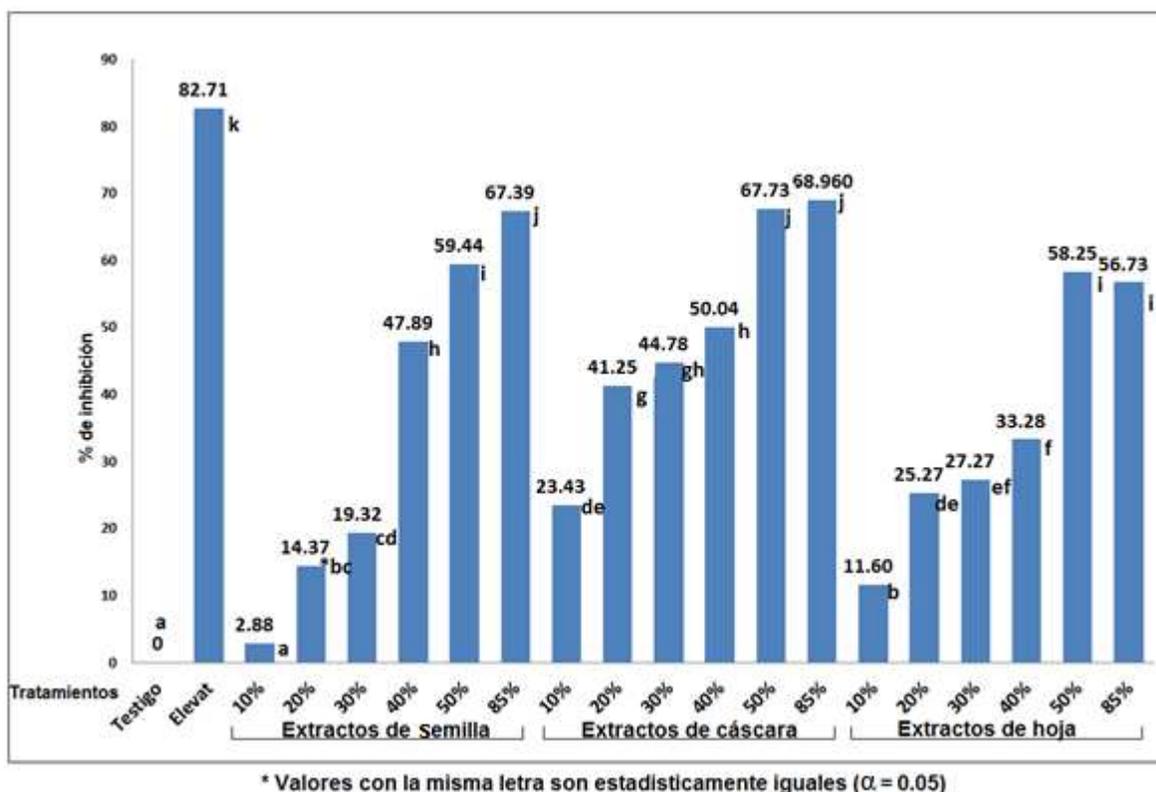
Desde épocas prehispánicas existe conocimiento empírico de las propiedades antimicrobianas y antiparasitarias de la semilla de aguacate criollo; recientemente se han respaldado tales afirmaciones con estudios científicos, Guzmán-Rodríguez *et al.* (2013) decodificaron el gen péptido “Snakin”, que proporciona protección y resistencia a la semilla, atribuyéndole en gran parte el efecto antimicrobiano. En cuanto a los compuestos fitoquímicos de la semilla se han reportado taninos, azúcares reductores (Pahua *et al.*, 2007) y terpenoides (Ding *et al.*, 2007).

Con respecto a la cáscara de aguacate son pocas las investigaciones que se tienen. No obstante, la cáscara de aguacate contiene grandes concentraciones de dieno antifúngico y epicatequina, las cuales aumentan en presencia de *C. gloeosporioides* y disminuyen de manera significativa durante la etapa de maduración del fruto (Ardi *et al.*, 1998). Tres compuestos antifúngicos aislados a partir de la cáscara de la fruta inmadura de aguacate ‘Hass’ han sido identificados como 1,2,4-trihidroxiheptadec-16-ino, 1,2,4-trihidroxiheptadec-16-eno y 1 acetoxi-2,4-dihidroxiheptadec-16 -ino, detectado previamente en extractos de semillas de aguacate (Adikaram *et al.*, 1992).

La hoja de aguacate ha sido estudiada ampliamente, Domergue *et al.* (2000) aisló, describió y caracterizó la acetogenina (E, Z, Z) -1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosá-5,12,15-trieno (persina) presente en las hojas jóvenes de aguacate y demostró que dicho compuesto inhibe la germinación de esporas de *C. gloeosporioides*.

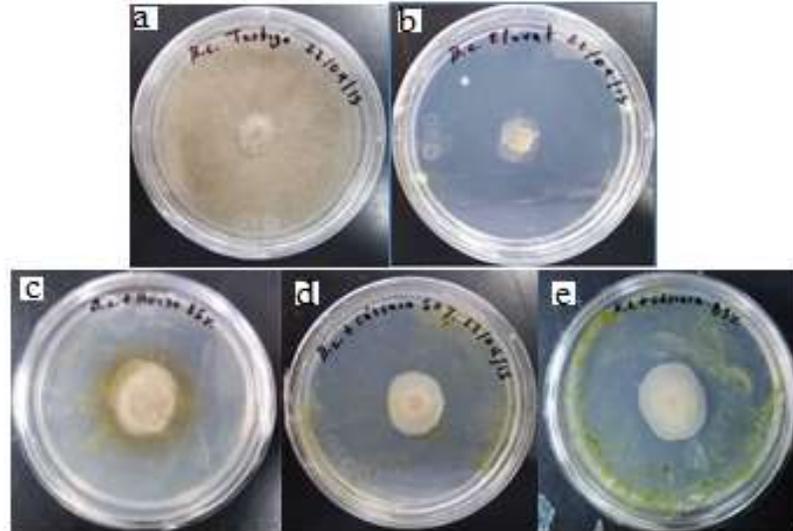
#### 4.5. Efecto de los tratamientos sobre la inhibición del micelio de *B. cinerea*

Para *B. cinerea*, el tratamiento que promovió mayor inhibición sobre el crecimiento de micelio fue el fungicida comercial Elevat® (Figura 14).



**Figura 14.** Porcentaje de inhibición de crecimiento del micelio del hongo *Botrytis cinerea* por efecto del fungicida Elevat® y de los extractos cloroformo:metanólicos de semilla, cáscara y hoja de aguacate criollo a seis concentraciones.

Todos los extractos cloroformo:metanólicos mostraron un efecto positivo sobre la inhibición del hongo, los extractos de cáscara 85 %, semilla 85 % y cáscara 50 % fueron los que tuvieron mayor efecto de inhibición sobre el crecimiento del micelio de *B. cinerea*, sin embargo, no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre ellos (Figura 15).



**Figura 15.** a) Micelio de *B. cinerea* sin ningún tratamiento, b) Micelio de *B. cinerea* tratado con Elevat<sup>®</sup>, c) Micelio de *B. cinerea* tratado con extracto de semilla de aguacate criollo a una concentración de 85 %, d) Micelio de *B. cinerea* tratado con extracto de cáscara de aguacate criollo a una concentración de 50 % y e) Micelio de *B. cinerea* tratado con extracto de cáscara de aguacate criollo a una concentración de 85 %

En comparación con el fungicida comercial Elevat<sup>®</sup> dichos extractos causaron en promedio un 16.62 % menos de efectividad.

Los resultados superan los ensayos *in vitro* realizados por Álvarez *et al.* (2012) con extractos etanólicos de hojas de fresa (*Fragaria vesca*), los cuales inhibieron el crecimiento del micelio de *B. cinerea* en un 40 %, los resultados también superan el tratamiento térmico a 50 °C por 20 s ensayado por Widiastuti *et al.* (2011) el cual obtuvo el 49 % de inhibición, sin embargo, están reportados otros tipos de tratamientos que inhiben el 100 % del desarrollo de *B. cinerea* como la irradiación a 4 kGy de gamma (Chun *et al.*, 2015) y control biológico con *Sporidiobolus pararoseus* Sp. (Huang *et al.*, 2012).

Otras investigaciones demostraron que los extractos hexano-clorofórmicos de orujo de uva llegaron a la concentración mínima de inhibición con el 0.004 % (Mendoza *et al.*, 2012).

#### 4.6. Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>)

Para *C. gloeosporioides* el extracto de semilla presentó la CI<sub>50</sub> más eficiente (Cuadro 3), estos datos reafirman los resultados obtenidos en la comparación de tratamientos de la inhibición de crecimiento del micelio, por lo tanto resulta una alternativa para el control de *C. gloeosporioides*. Para el caso de *B. cinerea*, el extracto más eficiente fue el de cáscara.

**Cuadro 3.** Concentración Inhibitoria Media (CI<sub>50</sub>) para los extractos cloroformo-metanólicos de semilla, cáscara y hoja de aguacate criollo sobre el crecimiento del micelio de *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*.

Extracto	Concentración Inhibitoria Media (CI <sub>50</sub> ) (%)	
	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>B. cinerea</i>
Semilla	13.61	35.75
Cáscara	18.06	26.59
Hoja	61.24	42.66

#### 4.7. Análisis fitoquímico de los extractos de aguacate criollo

Por cromatografía en capa fina (CCF) se identificaron la presencia de alcaloides y terpenoides en el extracto de semilla de aguacate criollo, la presencia de terpenoides en la semilla coincide con Ding *et al.* (2007), sin embargo, no existen reportes de la presencia de alcaloides en este tejido.

El análisis fitoquímico en el extracto de cáscara mostró la presencia de flavonoides y terpenoides, los primeros reportados por Mereci *et al.* (1992) y los terpenoides por Sneh y Gross (1981). Para el extracto de hoja resultaron positivos los tres tipos de fitoquímicos (alcaloides, flavonoides y terpenoides (Cuadro 4).

**Cuadro 4.** Análisis fitoquímico de los extractos cloroformo-metanólicos de semilla, cáscara y hoja de aguacate criollo

Estructura Vegetal	Tipo de metabolito			Referencias
	Alcaloides	Flavonoides	Terpenoides	
Semilla	+++	-	+	Terpenoides (Ding <i>et al.</i> , 2007)
Cáscara	-	++	+	Flavonoides (Mereci <i>et al.</i> , 1992) y terpenoides (Sneh y Gross, 1981)
Hoja	+	+	+	Alcaloides (Adeyemi <i>et al.</i> , 2002), flavonoides (Mereci <i>et al.</i> , 1992) y terpenoides (Torres-Gurrola <i>et al.</i> , 2011)

- Prueba negativa, + Prueba positiva de baja intensidad, ++ Prueba positiva de mediana intensidad, +++ Prueba positiva muy intensa

El efecto fungicida del extracto de semilla de aguacate criollo contra *C. gloeosporioides* y *B. cinerea* podría deberse a la presencia de alcaloides o bien a un efecto sinérgico de alcaloides y terpenoides. Varios alcaloides afectan a más de una red molecular (intercalación en el ADN, inhibición en la producción de encimas de ADN y ARN e inhibición en la síntesis de proteínas) en las células de microorganismos y animales (Wink *et al.*, 1999; Körper *et al.*, 1998). Ohmiya *et al.* (1995) y Kinghorn and Balandrin (1983) describieron la actividad biológica de varios alcaloides (Pérez-Lainez *et al.*, 2008).

Aun se conoce muy poco acerca de sus mecanismos en la planta (Wink *et al.*, 1999), sin embargo, en concentraciones altas interfiere eficazmente en las redes moleculares de los patógenos y previene las infecciones por hongos y bacterias en las plantas (Wink, 1984).

El efecto fungicida del extracto de cáscara podría explicarse a la presencia de terpenoides o bien a un efecto sinérgico entre terpenoides y flavonoides.

Por lo tanto, el efecto fungicida de los extractos de diferentes tejidos podría deberse a: 1) el tipo de fitoquímicos presentes en de los extractos de cada tejido vegetal; 2) del extracto con los componentes de la membrana celular y a los polisacáridos presentes en el micelio al observar una respuesta diferencial del micelio al tipo de extracto.

## 5. CONCLUSIONES

Se obtuvieron cepas monospóricas de *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*, además se prepararon extractos cloroformo-metanólicos a partir de semilla, cáscara y hoja de aguacate criollo de acuerdo a las metodologías planteadas.

Por cromatografía en capa fina, se identificó la presencia de terpenoides y alcaloides en los extractos de semilla; flavonoides y terpenoides en los extractos de cáscara y alcaloides, flavonoides y terpenoides en los extractos de hoja de aguacate criollo.

El producto comercial Amistar<sup>®</sup>, fue el tratamiento de mayor efecto fungiestático para el crecimiento de *C. gloeosporioides* e inhibió el desarrollo del micelio en un 83.83 %, para *B. cinerea* el producto comercial Elevat<sup>®</sup>, fue el tratamiento de mayor efecto fungiestático, inhibió el desarrollo del micelio en un 82.71 %.

Para *C. gloeosporioides*, el extracto de semilla a una concentración de 85 % fue el extracto con mayor efecto de inhibición con 71.73 %, además presentó una  $CI_{50}$  de 13.61 por lo que podría ser una alternativa para ensayar el control de dicho hongo fitopatógeno *in vivo*. Para *B. cinerea*, los extractos de cáscara al 85%, cáscara 50% y semilla al 85 % resultaron estadísticamente iguales y fueron los que tuvieron mayor efecto de inhibición sobre el crecimiento del micelio, sin embargo, no mostraron una diferencia estadísticamente significativa entre ellos.

## 6. REFERENCIAS

- Abou-Jawdah, Y.; Sobh, H.; Salameh, A. 2002. Antimicrobial activities of selected plant flora, growing wild in Lebanon, against phytopathogenic fungi. *J. Agric. Food Chem.* 50:3208-3213.
- Adeyemi, O.; Okpo, S. O.; Ogunti, O. O. 2002. Analgesic and anti-inflammatory effects of the aqueous extract of leaves of *Persea americana* Mill. (Lauraceae). *Fitoterapia* 73(5) 375-380.
- Adikaram, N.K.B.; Ewing, D.F.; Karunaratne, A.M.; Wijeratne, E.M.K. 1992. Antifungal compounds from immature avocado fruit peel. *Phytochemistry* 31: 93-96
- Agrios, G. N. 1988. 5 - how plants defend themselves against pathogens. In G. N. Agrios (Ed) *Plant pathology*. Academic Press. (pp. 97-115).
- Agrios G. N. 2002. *Fitopatología*. Editorial Limusa. México, D.F. 838p.
- Agrios, G.N. 2005. *Plant pathology*. Quinta edición. Academic Press. Nueva York. 803 p.
- Agrios, G. N. 2009. Plant pathogens and disease: General introduction. In M. Schaefer (Ed.), *Encyclopedia of microbiology* (pp. 613-646).
- Alarcón R. J. J.; Chavarriaga M. W. 2007. Diagnóstico precoz de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) (Penz) Penz and Sacc. En tomate de árbol mediante el empleo de infecciones quiescentes. *Agron.* 15(1):89-102.
- Álvarez, T.; Angoa, M.; Mena, H. 2012. Biocontrol de *Botrytis cinerea* a partir de extractos fenólicos de fresa. Instituto Politécnico Nacional. Unidad Michoacán. 72p.
- Arauz, F. L.; Mora, D. 1983. Evaluación preliminar de los problemas postcosecha en seis frutas tropicales de Costa Rica. *Agronomía Costarricense* 7(1/2):43-53.

- Ardi, R.; Kobiler, I.; Jacoby, B.; Keen, N. T.; Prusky, D. 1998. Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 53(5–6): 269-285.
- Baños-Guevara, P.E., Zavaleta-Mejía, E., Colinas-León, M. T., Luna-Romero, I., Gutiérrez-Alonso, J. G. 2004. Control Biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. y Sacc.] en Papaya Maradol Roja (*Carica papaya* L.) y Fisiología Postcosecha de Frutos Infectados. Colegio de Postgraduados, Instituto de Recursos Genéticos y Productividad. Montecillo, Edo. de México. pp. 198-205
- Baraona M., Sancho E. 1992. Fruticultura especial: manzana, melocotón fresa y mora. Fascículo 6. EUNED. San José, Costa Rica. 140 p.
- Barnett, H.L y Hunter, B.B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Cuarta edición. Minesota. APS Press. 218 p.
- Bautista, S., Barrera N., Bravo, L. y Bermúdez, T. 2002a. Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruits after storage. *Rev. Mex. Fitopatol.* 20:8-12.
- Benito, E., Arranz, M., y Eslava, A. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Area de Genética, Departamento de Microbiología y Genética, Universidad de Salamanca, España.
- Bergh, B. O. 1992. The origin nature and genetic improvement of the avocado. *California Avocado Society Yearbook* 70: 135-145.
- Binyamini, N., Schiffmann-Nadel, M. 1971. Latent infection in avocado fruit due *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 62:592-594.
- Box, G. E. P. y Cox, D. R. 1964. An analysis of transformations, *Journal of the Royal Statistical Society Series B*, 26, 211-252.
- Bruneton, J. 2001. Farmacognosia, Fitoquímica, Plantas medicinales (2ª ED). Acribia Editorial. 1120 p.
- Cakir, A., Kordali, S., Kilic, H., and Kaya, E. 2005. Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 245–256.

- Campos, R. E.; Espíndola B., M.; Mijares O, P. 2008. Diversidad del género *Persea* y sus usos. Fundación Salvador Sánchez Colín, Centro de Investigaciones Científicas y Tecnológicas del Aguacate en el Estado de México (CICTAMEX), S.C. Coatepec Harinas, Mex. 65 p.
- Carvalho, F. P. 2006. Agriculture, pesticides, food security and food safety. *Environmental Science and Policy* 9(7-8): 685-692.
- Chau, K. F.; Álvarez, A. M. 1983. A histological study of anthracnose in *Carica papaya*. *Phytopatology* 73:113-116.
- Chaves, N.; Wang, A. 2004. Combate del moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa Mediante *Gliocladium roseum*. *Agronomía Costarricense* 28(2): 73-85
- Ciegler, A.; Detroy R.W.; Lillehoj E.B. 1971. Patulin, penicillin acid and other carcinogenic lactones. En: *Microbial Toxins Academic Press, New York and London*, pp 409-434.
- Coley-Smith J.R.; Verhoeff K.; Jarvis W.R.. 1980. (Eds). *The biology of Botrytis*. Academic Press, London. 114p.
- Contreras, C. 2006. Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum spp.* Obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betacea* Sendt), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), mango (*Mangifera indica* L) y tallos de mora (*Rubís glaucus* Benth) con síntomas de antracnosis. Pontificia Universidad Javeriana. 104p.
- CORPOICA. 2001. Manual de Procedimientos para Obtención de Cultivos Monospóricos. 89 p.
- Cutler, H. G.; Cutler, S. J. 1999. *Biological active natural products: Agrochemicals*. Boca Raton, USA: CRC Press. 299 p.
- Dayan, F.E.; Cantrell, C.L.; Duke, S.O. 2009. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4022-4034.
- De la Luz Sánchez-Pérez. 1999. Recursos genéticos de aguacate (*Persea americana* 'Mill'.) y especies afines en México. In: *Proceedings of Fourth World Avocado Congress*. México, 1999. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 5: 7-18.

- Djami-Tchatchou, A. T.; Allie, F.; Straker, C. J. 2013. Expression of defence-related genes in avocado fruit (cv. fuerte) infected with *Colletotrichum gloeosporioides*. South African Journal of Botany 86(0): 92-100.
- Ding, H.; Chin, Y.; Kinghorn, A. D.; D'Ambrosio, S. M. 2007. Chemopreventive characteristics of avocado fruit. Seminars in Cancer Biology, 17(5), 386-394
- Domergue, F.; Helms, G. L.; Prusky, D.; Browse, J. 2000. Antifungal compounds from idioblast cells isolated from avocado fruits. Phytochemistry 54(2): 183-189.
- Elad, Y., Shtienberg. 1995. *Botrytis cinerea* in greenhouse vegetables: chemical, cultural, physiological and biological controls and their integration. Integrated Pest Management Reviews: 15-29
- Espinosa, M. 2006. Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Tesis Doctoral Universidad de Cádiz. 223p.
- Esterio, M.; Auger, J. 2004. Análisis molecular de las poblaciones de *Botrytis* presentes en vides de mesa en Chile, y su implicancia en el manejo de la enfermedad (genotipos predominantes en principales zonas productoras, eficacia diferencial de fungicidas). Estudios efectuados. Convenio Universidad de Chile – Bayer CropScience. Folleto divulgativo. 6p.
- FAO. 2014. Efectos económicos de las plagas y enfermedades transfronterizas. Consultado el 4/04/2015 <http://www.fao.org/docrep/003/x9800s/x9800s16.htm>
- Figtree, M.; Weeks, K.; Chan, L.; Leyton, A.; Bowes, A.; Giuffre, B.; Hudson, B. J. (2013). *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato causing deep soft tissue mycosis following a penetrating injury. Medical Mycology Case Reports 2(0): 40-43.
- Finney, D.J.1952. Análisis Probit. Cambridge University Press. Cambridge, Inglaterra. 230p.
- Freeman, S.; Shabi, E. 1996. Cross infection of subtropical and temperate fruits by *Colletotrichum gloeosporioides* species from various hosts. Physiological and Molecular Plant Pathology 49: 395-404.
- Fulgencio, R. 2011. Determinación del contenido de persina en diferentes accesiones de aguacate criollo Mexicano y evaluación antimicrobiana. Facultad de Biología. Tesis de licenciatura. Universidad Michoacana de San Nicolás de Hidalgo. México. 62p.
- García, C.V. 2004. Introducción a la Microbiología. Segunda Edición. Editorial EUNED. Costa Rica. pp 103-107.

- García-Mateos, M. R.; Elizalde, S. E.; Espinosa-Robles P.; Álvarez-Sánchez M. E. 2007. Toxicity of *Petiveria alliacea* L. on white fly (*Trialeurodes vaporariorum* West.) in laboratory and greenhouse. *Interciencia* 32:121-125.
- Gaviria-Hernández, V.; Patiño-Hoyos, L.; Saldarriaga-Cardona. 2013. *In vitro* evaluation of commercial fungicides for control of *Colletotrichum* spp., in blackberry. *Corpoica Ciencia y Tecnología Agropecuaria*. 14(1) 67-75
- Gómez-Flores, R.; Verástegui-Rodríguez, L.; Quintanilla-Licea, R.; Tamez-Guerra, P.; Rodríguez-Padilla, C. 2008. *In vitro* rat lymphocyte proliferation induced by *Ocimum bacilicum*, *Persea americana*, *Plantago virnica* and *Rosa* spp. Extracts, *J. Med. Plant Res.* 2(1): 5-10.
- Guédez, C.; Castillo, C.; Cañizales, L.; Olivar, R. 2008. Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Revista Control Biológico*, vol. 7(13):50-74.
- Guzmán-Rodríguez, J. J.; Ibarra-Laclette, E.; Herrera-Estrella, L.; Ochoa-Zarzosa, A.; Suárez-Rodríguez, L. M.; Rodríguez-Zapata, L. C., 2013. Analysis of expressed sequence tags (ESTs) from avocado seed (*Persea americana* var. *drymifolia*) reveals abundant expression of the gene encoding the antimicrobial peptide snakin. *Plant Physiology and Biochemistry* 70(0): 318-324.
- Hernández-Lauzardo A.N.; Bautista-Baños S.; Velázquez-del Valle M.G. 2007. Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades Postcosecha hortofrutícolas. *Revista Fitotecnia Mexicana*, vol. 30, núm. 2, abril-junio, 2007, pp. 119-123, México.
- Holz, G; Coertze, S.; Williamson, B. 2007. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. Springer, USA, pp:9-27
- Hubbell, B. J. 1997. Growing food security: Challenging the link between pesticides and access to food: Edited by barbara dinham and the pesticides Trust/Pesticides action network (PAN) the pesticides Trust/PAN. *Food Policy* 22(2): 185-187.
- INIFAP. 2007. Reporte Anual de Investigación e Innovación Tecnológica. Campo Experimental Mocochoá, Yucatán.
- Jarvis WR. 1977. Botryotinia and *Botrytis* species. Taxonomy and pathogenicity. Can Dep Agric. Monogr 15, Harrow, Ontario, Canada.

- Johnson, R. A.; Wirchen. D.W. 2007. Applied Multivariate Statical Analysis. Pearson Prentice Hall. Sixth Edition. 773 p.
- Juárez-Becerra. G.; Sosa-Morales. M.; López-Malo .A. 2010. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. Departamento de Ingeniería Química. Alimentos y Ambiental. Universidad de las Américas. Puebla.
- Kaushik, G.; Satya S.; Naik S.N. 2009. Food processing a tool to pesticide residue dissipation a review. Food Research International 42: pp. 26–40
- Kim, K. D.; Oh, B. J.; Yang, J. 2001. Differential interactions of a *Colletotrichum gloeosporioides* isolate with green and red pepper fruits. Phytoparasitica 27: 1-10.
- Kinghorn, A. D. and Balandrin, M. F. 1983. Quinolizidine alkaloids of the Leguminosae: structural types, analysis, chemotaxonomy, and biological activities. In: The Alkaloids, Vol. 2 (Pelletier W., ed.). Pergamon Press, London, UK., pp. 105-148.
- Körper, S.; Wink, M.; Fink, R. H. A. 1998. Differential effects of alkaloids on sodium currents of isolated single skeletal muscle fibers. FEBS Lett. 436, 251-255.
- Kumari, S.; Tayal, P., Sharma, E.; Kapoor, R. 2014. Analyses of genetic and pathogenic variability among botrytis cinerea isolates. Microbiological Research 169(11): 862-872.
- Lachaise, H. 2007. Life Cycle Management of a Botryticide In 14<sup>th</sup> international Botrytis Symposium Abstract book. 21-26 October 2007 – Cape Town, South Africa.16 p.
- Landero, N.; Nieto, D.; Téliz, D.; Alatorre, R.; Orozco, M.; Ortiz, C. 2013. Antifungal potential of extracts from four vegetables species on the growth of *Colletotrichum gloeosporioides* in postharvest papaya (*Carica papaya*). Colegio de Posgraduados. México.
- Latunde-Dada, A.O. 2001. *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. Molecular Plant Pathology 2: 187-198.
- Lu, Y.; Chang, H.; Peng, C.; Lin, C.; Chen, I. 2012. Secondary metabolites from the unripe pulp of *Persea americana* and their antimycobacterial activities. Food Chemistry 135(4): 2904-2909.

- Martínez E. 2014. Caracterización de frutos de aguacate criollo (*Persea americana* var. *drymifolia*) en términos de su contenido de fitoquímicos y actividad antioxidante. Tesis de maestría. Universidad Autónoma Chapingo. 104 p.
- Matamoros G. 1986. La fresa, prácticas de cultivo. Estación Experimental Fabio Baudrit, Escuela de Fitotecnia, Vicerrectoría de Acción Social, Universidad de Costa Rica – Instituto del Café de Costa Rica. San José, Costa Rica. 29 p.
- Mendoza, L.; Yañez, K.; Vivanco, M.; Melo, R.; Cotoras, M. 2013. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against botrytis cinerea. *Industrial Crops and Products*.43: 360-364
- Menezes-Morales, J. and Hanlin, R. T. 1996. Appressoria of brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. Causal agent of anthracnoses disease. *Revista de Microbiología* 27: 247-251.
- Merici, F.; Merici, A.H.; Yilmaz, F.; Yunculer, G.; Yunculer O. 1992. Flavonoids of avocado (*Persea americana*) leaves. *Acta Pharm Turc.* 34:61–3.
- Molina, B.E.; Ronquillo, E. J.; Bautista, B. S.; Verde, C. J.R.; Morales, L. J. 2010. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology* 57:132–137.
- Montgomery, D. 2004. Diseño y Análisis de Experimentos. Ed. Limusa Wiley, Universidad Estatal de Arizona. Estados Unidos de América. 686 p.
- Morais, S.M.; Facundo V.A.; Bertini L.M.; Cavalcanti E.S.B.; Anjos-Junior J.F.; Ferreira S.A., Brito E.S.; Sousa-Neto M.A. 2007. Chemical composition and larvicidal activity of essential oils from Piper species. *Biochemical Systematics and Ecology* 35: 670-675.
- Neeman, I.; Lifshitz , A.; Kashman, Y. 1970. New antibacterial agent isolated from the avocado pear. *Appl. Microbiol.* 19: 470-473.
- Ohmiya, S.; Saito, K.; Murakoshi, I. 1995. Lupine alkaloids. In: *The Alkaloids. Chemistry and Pharmacology*, Vol. 47 (Cordell G. A., ed.). Academic Press, San Diego, USA. pp. 1-114.
- Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económicos (OCDE). 2004. Normalización internacional de frutas y hortalizas: aguacates (paltas). Francia. 130 p.

- Ortiz de Montellano, B. 1993. Medicina, salud y nutrición aztecas, Siglo XXI, México. 351 p.
- Pahua, R.M., Ortiz, M. A., Chamorro, G. y Garduño, S.L. 2007. Estudio de las Propiedades de la Semilla de Aguacate (*Persea americana*) Variedad Hass, para el Aprovechamiento Integral del Fruto. Instituto Politécnico Nacional. Memoria IX Congreso de Ciencia de los Alimentos. 7 p.
- Pérez, D. L.; García-Mateos, R.; San Miguel, R.; Soto-Hernández, M.; Rodríguez-Pérez, E. 2008. Bactericidal and fungicidal activities from *Calia secundiflora* (Ort.) Yakovlev. *Zeitschrift für Naturforschung*. 63c: 653-657.
- Rangel-Sánchez, G.; Castro-Mercado, E.; García-Pineda, E. 2014. Avocado roots treated with salicylic acid produce phenol-2,4-bis (1,1-dimethylethyl), a compound with antifungal activity. *Journal of Plant Physiology* 171(3–4): 189-198.
- Raymond, M., Carman.; Handley, P. 1998. Antifungal diene in leaves of various avocado cultivars. Department of Chemistry, The University of Queensland, Brisbane, Queensland, 4072, Australia.
- Reyes, R. S.; Gomez, G.; Moreno, M.; Jiménez, R. 1998. “Flavonoids and isoflavonoides with antigungal properties from *Platymiscium yucatanum* Heart Wood”, *Holzforschung* 52: 459-462.
- Rincón-Hernández, C. A. and Espinosa-García. F. J. 2008. Relationship between the phytochemical diversity in creole avocado (*Persea americana* var. *drymifolia*) leaves and the incidence of foliar gall psyllid (*Trioza anceps*). *Allelopathy Journal* 21:175-182.
- Rivera, G. 1991. Descripción y combate de las principales enfermedades de papaya. In: *Fruticultura especial fascículo 3 piña y papaya*. San José, Costa Rica. 128 p.
- Rodríguez-López, E., González-Prieto, J.M., y Mayek-Pérez, N. 2008. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Fitopatología* 53: 11 p.
- Saldarriaga, A. 2006. Caracterización del agente causante de la Antracnosis en tomate de árbol, manzana y mora. Manizales. 191p. Tesis de Magíster en Fitopatología. Universidad de Caldas. Facultad de Ciencias Agropecuarias. 12 p.
- Serrano, M., Martínez-Romero, D., Castillo, S., Guillen, F. and Valero, D. 2005. The use of the natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 6: 115–123.

- SIAP. 2015. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Descripción del aguacate. Consultado 3/04/2015 <http://www.siap.gob.mx/aguacate/>
- Sneh, B.; Gross, S.1981. Toxicity of avocado leaves (*Persea americana*) to young larvae of *Spodoptera littoralis* Bois (Lep., Noctuidae). Z. Angew. Entomol. 92: 420–422.
- Steiger, D. 2007. Global economic importance of Botrytis protection. In 14th international Botrytis Symposium Abstract book. 21-26 October 2007 – Cape Town, South Africa.
- Sutton, B C. The Coelomycetes: Fungi imperfecti with Picnidia, Acervuli and Stromata. 1992. Commonwealth Mycological Institute. New York. 696 p.
- Torres-Gurrola, G., Delgado-Lamas, G., & Espinosa-García, F. J. 2011. The foliar chemical profile of criollo avocado, *persea americana* var. *drymifolia* (Lauraceae), and its relationship with the incidence of a gall-forming insect, *trioza anceps* (triozidae). Biochemical Systematics and Ecology 39(2): 102-111.
- Trigos, A., Ramírez, K y Luric, S. 2008. Presencia de hongos fitopatógenos en frutas y hortalizas y su relación en la seguridad alimentaria. Revista Mexicana de Micología 28: 125-129.
- Urbina M. 2011. Enfermedades causadas por hongos. Fitopatología general. Universidad Católica Agropecuaria del Tropicó Seco. Esteli, Nicaragua. 21 p.
- Velázquez, M. 2008. Manual Operativo de la Nom-066-Fito-1995 para la campaña plagas reglamentadas del aguacatero. Dirección General de Sanidad Vegetal. SENASICA. México
- Verhoeff, K. 1974. Latent infection by fungi. Annual Review of Phytopathology 12:99-100 pp.
- Villasis R. 2009. Curaciones con el aguacate. Editorial Época. México, D.F. 96 p.
- Wagner, H.; Blatt S.1996. Plant Drug Analysis: A thin Layer Chromatography Atlas. Springer. Berlin, Alemania. 383 p.
- Widiastuti, A.; Yoshino, M.; Saito, H.; Maejima, K.; Zhou, S.; Odani, H., et al. (2011). Induction of disease resistance against botrytis cinerea by heat shock treatment in melon (*Cucumis melo* L.). Physiological and Molecular Plant Pathology, 75(4): 157-162.

Wink M. (1984), Chemical defense of Leguminosae. Are quinolizidine alkaloids part of the antimicrobial defense system of *Lupinus*? Z. Naturforsch. 39c: 548-552.

Yourman, L., Jeffers, N., Dean, A. 2000. Genetic Analysis of Isolates of *Botrytis cinerea* Sensitive and Resistant to Benzimidazole and Dicarboximide Fungicides. Department of Plant Pathology and Physiology. North Carolina. USA

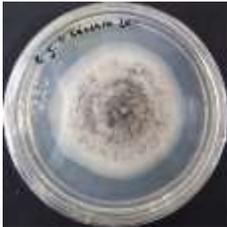
Zavala, M., Tun, J., Cristóbal, J., Ruíz E., Gutierrez, O., Vázquez, M., Méndez, R. 2005. Control postcosecha de la Antracnosis en papaya y sensibilidad de *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) Sacc. a fungicidas organosintéticos. Maestría en horticultura tropical del Instituto Tecnológico Agropecuario. 5 p.

## 7. ANEXOS

**Anexo 1.** Bioensayo del extracto de semilla en *Colletotrichum gloeosporioides* a diferentes concentraciones.

Testigo negativo 	Testigo positivo (Amistar) 
Extracto de semilla al 10 % 	Extracto de semilla al 20 % 
Extracto de semilla al 30 % 	Extracto de semilla al 40 % 
Extracto de semilla al 50 % 	Extracto de semilla al 85 % 

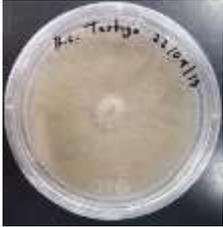
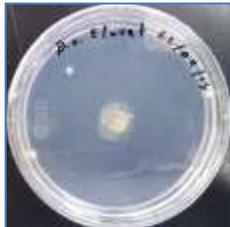
**Anexo 2.** Bioensayo del extracto de en *Colletotrichum gloeosporioides* a diferentes concentraciones.

<p>Testigo negativo</p> 	<p>Testigo positivo (Amistar)</p> 
<p>Extracto de cáscara al 10 %</p> 	<p>Extracto de cáscara al 20 %</p> 
<p>Extracto de cáscara al 30 %</p> 	<p>Extracto de cáscara al 40 %</p> 
<p>Extracto de cáscara al 50 %</p> 	<p>Extracto de cáscara al 85 %</p> 

**Anexo 3.** Bioensayo del extracto de hoja en *Colletotrichum gloeosporioides* a diferentes concentraciones.

<p>Testigo negativo</p> 	<p>Testigo positivo (Amistar)</p> 
<p>Extracto de hoja al 10 %</p> 	<p>Extracto de hoja al 20 %</p> 
<p>Extracto de hoja al 30 %</p> 	<p>Extracto de hoja al 40 %</p> 
<p>Extracto de hoja al 50 %</p> 	<p>Extracto de hoja al 85 %</p> 

**Anexo 4.** Bioensayo del extracto de semilla en *Botrytis cinerea* a diferentes concentraciones.

<p>Testigo negativo</p> 	<p>Testigo positivo (Elevat)</p> 
<p>Extracto de semilla al 10 %</p> 	<p>Extracto de semilla al 20 %</p> 
<p>Extracto de semilla al 30 %</p> 	<p>Extracto de semilla al 40 %</p> 
<p>Extracto de semilla al 50 %</p> 	<p>Extracto de semilla al 85 %</p> 

**Anexo 5.** Bioensayo del extracto de cáscara en *Botrytis cinerea* a diferentes concentraciones.

<p>Testigo negativo</p> 	<p>Testigo positivo (Elevat)</p> 
<p>Extracto de cáscara al 10 %</p> 	<p>Extracto de cáscara al 20 %</p> 
<p>Extracto de cáscara al 30 %</p> 	<p>Extracto de cáscara al 40 %</p> 
<p>Extracto de cáscara al 50 %</p> 	<p>Extracto de cáscara al 85 %</p> 

**Anexo 6.** Bioensayo del extracto de hoja en *Botrytis cinerea* a diferentes concentraciones.

<p>Testigo negativo</p> 	<p>Testigo positivo (Elevat)</p> 
<p>Extracto de hoja al 10 %</p> 	<p>Extracto de hoja al 20 %</p> 
<p>Extracto de hoja al 30 %</p> 	<p>Extracto de hoja al 40 %</p> 
<p>Extracto de hoja al 50 %</p> 	<p>Extracto de hoja al 85 %</p> 