



COLEGIO DE POSTGRADUADOS

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

FRUTICULTURA

**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Sechium*
compositum CONTRA *Botrytis cinerea* Y
Colletotrichum gloeosporioides EN
CONDICIONES *in vitro***

LAURA SIMEONA GORDILLO SALINAS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, ESTADO DE MÉXICO

2019

CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y
DE LAS REGALÍAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACIÓN

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe, "**Laura Simeona Gordillo Salinas**", Alumna de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor "**Ma. de Lourdes Catalina Arévalo Galarza**", por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis "**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Sechium compositum* CONTRA *Botrytis cinerea* Y *Colletotrichum gloeosporioides* EN CONDICIONES *in vitro***", y de los productos de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre del Colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mexico a 27 de mayo de 2019

Laura Simeona Gordillo Salinas

Vo. Bo. Dra. Ma. De Lourdes C. Arevalo Galarza

La presente tesis titulada: “**ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Sechium compositum* CONTRA *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides***” realizada por la alumna: **Laura Simeona Gordillo Salinas** con la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRA EN CIENCIAS

FRUTICULTURA

CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERA

DRA. MA. DE LOURDES C. AREVALO GALARZA

ASESOR

DR. ANGEL VILLEGAS MONTER

ASESORA

DRA. BERTHA TLAPAL BOLAÑOS

Montecillo, Estado de México, mayo del 2019

ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE *Sechium compositum* CONTRA *Botrytis cinerea* Y *Colletotrichum gloeosporioides* EN CONDICIONES *in vitro*

**Laura Simeona Gordillo Salinas. M en C.
Colegio de Postgraduados, 2019**

RESUMEN

Antes y después de la cosecha, los cultivos son susceptibles al ataque de patógenos causantes de enfermedades, generalmente bacterias y hongos, siendo estos últimos más frecuentes, con aproximadamente 66 % de las infecciones acelerando su deterioro. En el 2009 se estimó que las pérdidas causadas por enfermedades postcosecha durante el manejo, transporte y almacenamiento, alcanzaron 25 % en los EE. UU. y 50 % en los países en vías de desarrollo. El uso indiscriminado de fungicidas ha provocado el desarrollo de resistencia de los patógenos, así como daños a la salud humana, por lo que el uso de alternativas más amigables para el control de hongos, ha recibido atención en los últimos años. Por lo anterior en este estudio se determinó la efectividad antifúngica del jugo de frutos de *Sechium compositum* (Donn. Sm.), una especie de chayote silvestre, en cuya composición se encuentran flavonoides, terpenoides y ácidos fenólicos, lo que le confiere potencial en la inhibición de ciertos procesos celulares. Este estudio evaluó la efectividad de diferentes concentraciones de jugo, en el control *in vitro* de dos hongos postcosecha: *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) (2.0 % hasta 52.5 %) y *Botrytis cinerea* Pers.: Fr. (1.0 % hasta el 40.0 %). Los resultados mostraron efectividad en el control del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, con $CE_{50}=2.27$ %, mientras que *B. cinerea* tuvo $CE_{50}=0.307$ %. Además, se observó que el jugo provoca una esporulación temprana de las cepas de los hongos, como respuesta a su toxicidad, lo que evidenció efecto fungistático. Se concluye que el jugo del chayote *S. compositum* tiene potencial para inhibir el crecimiento y desarrollo de estos dos patógenos por lo que es necesario realizar estudios *in vivo* más detallados.

Palabras clave: Lacasa, cucurbitacinas, flavonoides, compuestos fenólicos, género *Sechium*.

ANTIFUNGAL ACTIVITY OF *Sechium compositum* AGAINST *Botrytis cinerea* AND *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro* CONDITIONS

Laura Simeona Gordillo Salinas. M en C.
Colegio de Postgraduados, 2019

ABSTRACT

Before and after harvesting all crops are susceptible to pathogens attack provoking diseases, usually bacteria and fungi. This pathogen are more frequent, with approximately 66 % of infections in plants, causing accelerated deterioration of fruits, leaves, stems, roots, among others. It is estimated that losses caused by postharvest diseases during handling, transport and storage can reach 25 % in the United States and up to 50 % in some developing countries. The indiscriminate use of fungicides has led to the development of resistance of pathogens as well as damage to human health, so the use of a friendly alternatives for fungal control has received attention in recent years. Therefore, in this study, the antifungal effectiveness of the fruit juice of *Sechium compositum*, a wild chayote species, whose composition includes flavonoids, terpenoids, phenolic acids, among others, was determined, which gives it great potential in the inhibition of certain cellular processes. This study evaluated the effectiveness of different juice concentrations in the *in vitro* control of two fungi of importance in postharvest: *Colletotrichum gloeosporioides* (from 2.0% to 52.5%), and *Botrytis cinerea* (from 1.0% to 40.0%). The results showed great effectiveness in the control of mycelial growth on *C. gloeosporioides*, with $EC_{50} = 2.27\%$, while for *B. cinerea* with $EC_{50} = 0.307\%$. In addition, it was observed that the juice causes an early sporulation of the fungal strains, in response to a toxic effect, which showed a fungistatic effect. It is concluded that the juice of the chayote *Sechium compositum* has the potential to inhibit the growth and development of these two pathogens, so it is necessary to carry out more detailed studies *in vivo*.

Key words: Laccase, cucurbitacins, flavonoids, phenolic compounds, genus *Sechium*.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Mexiquense de Ciencia y Tecnología (COMECyT), por el financiamiento durante mi programa de estudio de Maestría.

Al Colegio de Postgraduados por permitirme alcanzar una meta más en mi formación académica.

A la Dra. Ma. De Lourdes C. Arevalo Galarza, por la invaluable dirección en la planeación, ejecución y culminación de esta investigación.

A la Dra. Bertha Tlapal Bolaños y Dr. Angel Villegas Monter, por sus acertadas aportaciones y sugerencias que enriquecieron este trabajo de investigación.

Al Dr. Jorge Cadena Iñiguez, por el aporte del material experimental y por la revisión de sintaxis y estilo de documento.

Al Dr. Crescenciano Saucedo Veloz, Dr. Guillermo Calderón Zavala y M. en C. David Jaén Contreras por las facilidades brindadas durante mi estancia en la institución.

A la Dra. Leticia Robles y Dr. Moises Camacho, con todo respeto y agradecimiento por sus aportaciones y asesoría técnica.

A la Sra. Angeles Arenas, encargada del laboratorio de cultivo *in vitro*, por su amistad y facilidades brindadas en la fase de laboratorio.

A la Lic. Adriana Zamora y Sra. Elena por su amistad y facilidades brindadas en la fase administrativa.

DEDICATORIA

A: Mis padres Arturo Gordillo Martinez y Maria Idalia Salinas Nicolas, por el apoyo incondicional, por enseñarme que el trabajo, la honestidad, el respeto y la dedicación te llevan a lograr lo que deseas en la vida.

Al Sr. Jaime Villeda y esposa, Sra. Libertad Monsalvo, por el apoyo y cariño brindado en diversas etapas de mi vida profesional.

A mi hermano, Victor Manuel Gordillo Salinas, cuñada Alondra Villeda Monsalovo y sobrinos, Santiago y Leonardo, por el apoyo y los consejos para seguir adelante y lograr mis metas.

A mi Hermana Ana Silvia Gordillo Salinas, esposo e hijos por el cariño brindado.

A Antonio Morgado e Isabel Nativitas por su sincera e infinita amistad, que me dejan grandes enseñanzas como son la sinceridad, dedicación, constancia, cordialidad y sobre todo la manera de dar sin recibir... GRACIAS.

A Yanira Villeda, Sra. Elena Molsalvo, Sra. Amparo Monsalvo y Thalina Arteaga por el cariño brindado en mi vida profesinal y estancia en Téxcoco, quienes, me han dado mucho cariño, necesario cuando sientes que las fortalezas se vienen abajo... GRACIAS.

A mis amigos que siempre han estado en cada momento: Toño, Rocio, Claudia, Yuliana, Karen, Bety, Miriam, Tatiana, Itzel, Frida, Irasema, Abraham, Jesus, Emanuel, Anahí, Sonia, Nuria, Sandra, Rosalba, Nicolas, Cristian, Luz, Gis, Dona, Naye, Odilón, Aurora, Carmen, compañeros de postgrado, por el apoyo y cariño brindado en todas las etapas en las que lo he requerido... GRACIAS.

CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	v
LISTA DE FIGURAS	x
LISTA DE CUADROS.....	xi
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	3
2.1 Objetivo general.....	3
2.2 Objetivos particulares.....	3
IV. REVISIÓN DE LITERATURA	4
4.1 Fitopatógenos causantes de pérdidas postcosecha	4
4.2 Importancia de <i>Botrytis cinerea</i> como hongo fitopatógeno	9
4.3 Importancia de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> como hongo fitopatógeno	14
4.4 Control de <i>Botrytis cinerea</i> y <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	17
4.5 Uso potencial de extractos de <i>Sechium sp.</i> para el control de enfermedades postcosecha	20
V. MATERIALES Y MÉTODOS.....	24
5.1 Aislamiento y caracterización morfológica de <i>Botrytis</i>	24
5.2 Aislamiento y caracterización morfológica de <i>Colletotrichum</i>	25
5.3 Caracterización molecular de ambas especies de hongos.....	25
5.4 Obtención de jugo de chayote (<i>Sechium compositum</i>)	27
5.5 Identificación de compuestos del jugo por HPLC	27
5.6 Control <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i> , con jugo de <i>S. compositum</i>	28
5.7 Control <i>in vitro</i> de <i>C. gloeosporioides</i> con jugo de <i>S. compositum</i>	29
5.8 Germinación de esporas.....	30
5.9 Efecto antifúngico <i>in vivo</i> del jugo de <i>S. compositum</i> en <i>B. cinerea</i>	31

5.10 Análisis estadístico	31
VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	32
6.1 Morfología y características de <i>Botrytis cinerea</i>	32
6.2 Morfología y caracteres de la colonia de <i>C. gloeosporioides</i>	34
6.3 Análisis molecular de <i>Botrytis</i> sp. y <i>C. gloeosporioides</i>	36
6.4 Compuestos del jugo de frutos de <i>S. compositum</i>	37
6.5 Efectividad del jugo de frutos de <i>S. compositum</i> sobre el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i>	40
6.6 Efectividad del jugo de frutos de <i>S. compositum</i> en el crecimiento <i>in vivo</i> de <i>B. cinerea</i>	46
6.7 Efectividad del jugo de frutos de <i>S. compositum</i> en el crecimiento <i>in vitro</i> de <i>C. gloeosporioides</i>	50
VII. CONCLUSIONES.....	56
VIII. LITERATURA CITADA	57

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. (A) Colonia de <i>B. cinerea</i> con cuatro días de crecimiento en medio de cultivo papa-dextrosa- agar (PDA), aisladas de tejidos de <i>Rosa</i> sp., con síntomas de moho gris. (B) Conidios de <i>B. cinerea</i> formados en medio de cultivo PDA después de 22 días de incubación a 23 °C en oscuridad continua. Microscopio de luz de campo brillante 40 X.....	34
Figura 2. (A) Colonia de <i>C. gloeosporioides</i> con ocho días de crecimiento, aislados de tejidos de aguacate con síntomas de antracnosis. (B) Conidios de <i>C. gloeosporioides</i> formados en medio PDA después de 10 días de incubación a 23 °C en oscuridad continua. Microscopio de luz de campo brillante (40 X).....	36
Figura 3. Estructura química de las cucurbitacinas B, D, E, e I.....	38
Figura 4. Crecimiento micelial de <i>B. cinerea</i> en medio de cultivo papa-dextrosa- agar (PDA) con diferentes concentraciones de jugo de frutos de <i>S. compositum</i> y fungicida químico Swicht® (Ciprodinil + Fludioxonil).....	41
Figura 5. Crecimiento micelial de las colonias de <i>B. cinerea</i> en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) a diferentes concentraciones de jugo de frutos de <i>S. compositum</i> y con fungicida químico Swicht® (Ciprodinil + Fludioxonil) 4 días después de inoculación.....	41
Figura 6. Porcentaje de germinación de conidios de <i>B. cinerea</i> en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) en presencia de jugo de frutos de <i>S. compositum</i> a diferentes concentraciones y testigo químico Switch® (Ciprodinil + Fludioxonil).....	45
Figura 7. Apariencia de pétalos de Rosas “Proud” 72 h después de inoculación con <i>B. cinerea</i> , co-cultivadas en diferentes concentraciones de jugo de <i>S. compositum</i> mezclado con PDA.	47
Figura 8. Apariencia de pétalos de Rosas “Polar star”, 72 h después de inoculación con <i>B. cinerea</i> , co-cultivadas en diferentes concentraciones de jugo de <i>S. compositum</i> mezclado con PDA.....	48
Figura 9. Crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> con ocho días de crecimiento en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA).	51
Figura 10. Curvas de crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA).	51
Figura 11. Porcentaje de germinación de conidios de <i>C. gloeosporioides</i> en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) en presencia de jugo de frutos de <i>S. compositum</i> a diferentes concentraciones y testigo químico Tecto® (Tiabendazol)	54

LISTA DE CUADROS

Cuadro 1. Concentraciones de jugo de frutos de <i>Sechium compositum</i> probado para la inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i>	29
Cuadro 2. Jugo de frutos de <i>Sechium compositum</i> probado para la inhibición del crecimiento micelial <i>in vitro</i> de <i>C. gloeosporioides</i>	30
Cuadro 3. Características morfológicas de <i>Botrytis</i> sp.	32
Cuadro 4. Características morfológicas de <i>C. gloeosporioides</i>	35
Cuadro 5. Contenido medio de compuestos fenólicos, flavonoides y cucrbitacinas en jugo de frutos de <i>S. compositum</i> sin tratamiento y con tratamiento UV-C	37
Cuadro 6. Porcentaje de inhibición (96 h de inoculación) y germinación (5 h de inoculación) <i>in vitro</i> de <i>B. cinerea</i> en medio con diferentes concentraciones de jugo de <i>S. compositum</i>	44
Cuadro 7. Daño en pétalo de rosa inoculada con <i>B. cinerea</i> , con la presencia de diferentes concentraciones de jugo de <i>S. compositum</i> a las 72 h...	49
Cuadro 8. Porcentaje de inhibición (192 h de inoculación) y germinación (5 h de inoculación) <i>in vitro</i> de <i>C. gloeosporioides</i> en medio con diferentes concentraciones de jugo de <i>S. compositum</i>	55

I. INTRODUCCIÓN

Los fungicidas químicos han sido utilizados para la producción agrícola, aumentando la protección de los cultivos y rendimiento (Ali *et al.*, 2014). Sin embargo, estas acciones han desarrollado resistencia en los fitopatógenos, contaminado la atmósfera y afectado la salud humana, debido a los compuestos tóxicos que permanecen en los alimentos, de tal forma que es necesario buscar alternativas al uso de fungicidas tradicionales (De Rodríguez *et al.*, 2011)

Las regiones de México con sus diferentes climas, hacen factible la variabilidad de plantas silvestres que se desarrollan en condiciones climáticas extremas (Adame *et al.*, 2000). Estas especies silvestres presentan compuestos diversos entre los que destacan polifenoles, saponinas, triterpenos, azúcares y flavonoides, que han probado tener uso terapéutico como propiedades antiinflamatorias, antifúngicas, antioxidantes y antiproliferativas (Harborne, 1998; Zuanazzi *et al.*, 2004).

Sechium compositum (Cucurbitaceae), es una de las 10 especies del género *Sechium* P. Br., procedente de Mesoamérica, que se encuentra en estado silvestre (Cadena *et al.*, 2007). Los frutos de esta especie se caracterizan por el sabor amargo, atribuido a las cucurbitacinas (triterpenos tetracíclicos) además amplia gama de flavonoides y saponinas. Estudios recientes han mostrado propiedades antiproliferativas en células animales en los frutos de *S. compositum* (Aguñiga *et al.*, 2015; Miró *et al.*, 1995). Las cucurbitacinas son de interés biomédico, ya que se ha descrito su actividad citotóxica en células tumorales a bajas concentraciones (Setzer *et al.*, 2003), además de activar la ruta JaK/STAT en el proceso de apoptosis de células tumorales inhibiendo su desarrollo (Sun *et al.*, 2005; Thoennissen *et al.*, 2009). Por otra parte, Bar-Nun *et al.* (1990) demostraron la actividad fungistática de la cucurbitacina I en frutos de pepino (*Cucumis lattu*s L.) y hojas de col (*Brassica oleracea*) inoculados con *B. cinerea*. Song *et al.* (2011) evaluaron la actividad de los triterpenos de *Astilbe myriantha* Diels contra *C. gloeosporioides*, demostrando actividad fungistática, además, observaron que aquellos triterpenos que poseen grupos hidroxilo en C-6 y C-24 y el grupo funcional carboxílico C-27, poseen actividad contra hongos patógenos; Sibi *et al.*

(2013) utilizaron extractos clorofórmicos y metanólicos de pulpa y semilla de *Sechium edule* (Jacq) Sw. los cuales mostraron actividad antibacteriana contra cepas Gram negativa de *Escherichia coli* ATCC 8739, *Salmonella typhimurium* ATCC 3224 y *Shigella flexneri* ATCC 12022.

Se estima que las pérdidas causadas por enfermedades en la etapa postcosecha (manejo, transporte y almacenamiento) pueden alcanzar hasta 25 % en los Estados Unidos y 50 % en algunos países en desarrollo (Sharma *et al.*, 2009). Las principales pérdidas son causadas por los géneros de hongos: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Mucor* y *Sclerotina* (Barkai-Golan, 1977; Sharma *et al.*, 2009).

Botrytis cinerea Pers.: Fr., en el año 2012 ha sido clasificado como el segundo hongo más importante por el número de especies que ataca más de 200 especies, adaptabilidad y los costos que representa su control (Elad *et al.* 1995; Dean *et al.*, 2012). Por otra parte, *Colletotrichum* spp., infecta alrededor de 470 géneros de hospedantes diferentes, es un hongo de distribución cosmopolita y con predominancia en los trópicos y subtrópicos (Xiao *et al.*, 2004; Sharma *et al.*, 2015), fue denominado como el octavo grupo más importante de hongos fitopatógenos en el mundo, basado en la percepción de importancia científica y económica que representa antracnosis (Dean *et al.*, 2012). La enfermedad ocasiona daños desde producción hasta postcosecha atacando hojas, ramas, panículas y frutos. Más del 50 % de las pérdidas de frutas y hortalizas (Paull *et al.*, 2011; Awang *et al.*, 2011).

Las investigaciones recientes se enfocan a la búsqueda de compuestos con actividad fungicida, amigables con el ambiente y con baja cantidad de compuestos xenobióticos. En este trabajo se probó la actividad fungicida del jugo de frutos de *Sechium compositum* en *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides* en condiciones *in vitro* e *in vivo*.

II. OBJETIVOS

2.1 Objetivo general

Determinar la actividad fungicida *in vitro* e *in vivo* de jugo de frutos de chayote (*Sechium compositum*) en el control de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

2.2 Objetivos particulares

Evaluar el efecto de jugo de frutos de *Sechium compositum* en la germinación y crecimiento micelial de aislamientos de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*, determinando su efecto *in vitro* sobre la severidad de los patógenos.

Evaluar el efecto *in vivo* de jugo de frutos de *Sechium compositum* en la severidad de *B. cinerea* en pétalos de rosa (*Rosa* sp.).

III. HIPOTESIS

El contenido de cucurbitacinas, flavonoides y compuestos fenólicos del jugo de los frutos de *Sechium compositum* puede actuar como fungicida, limitando el crecimiento de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*.

IV. REVISIÓN DE LITERATURA

4.1 Fitopatógenos causantes de pérdidas postcosecha

Los frutos son susceptibles al ataque de microorganismos antes y después de la cosecha o durante almacenamiento (Agrios, 1997). Los organismos patógenos que causan mayores pérdidas económicas en la producción suelen ser principalmente bacterias y hongos, siendo estos últimos más frecuentes con aproximadamente 66 % de las infecciones en: frutos, hojas, tallos, raíces, entre otros. (FAO, 2016). Las principales pérdidas postcosecha son causadas por hongos de los generos: *Alternaria*, *Aspergillus*, *Botrytis*, *Colletotrichum*, *Diplodia*, *Monilinia*, *Penicillium*, *Phomopsis*, *Rhizopus*, *Mucor* y *Sclerotina* (Barkai-Golan, 1977; Sharma *et al.*, 2009).

Los procesos específicos que caracterizan los síntomas de las enfermedades, varían considerablemente según el agente causal y el hospedero. En un principio, la reacción del hospedero ante el agente que ocasiona la enfermedad se concentra en la zona enferma, y es de naturaleza química y no perceptible. Sin embargo, poco tiempo después la reacción se difunde y producen cambios histológicos que se hacen notables y constituyen los síntomas de la enfermedad (Agrios, 1997).

En el manejo postcosecha de frutos, numerosos hongos, aunque presentes, son incapaces de penetrar a través de la epidermis; sin embargo, pueden invadir fácilmente si existe un medio de acceso (daño físico, aberturas naturales, etc.). Por ejemplo, el corte del pedúnculo es una vía de penetración y muchos productos hortofrutícolas como aguacate (*Persea americana* Mill.), mango (*Mangifera indica* L.), entre otros, inician infección en este punto (Wills *et al.*, 1999).

Algunos microorganismos causan daños, a los frutos a través de la secreción de enzimas celulasas que degradan la pared celular de los tejidos, al hidrolizar la celulosa a glucosa (Sarkar *et al.*, 2012; Banerjee *et al.*, 2010).

Los principales eventos del ciclo de una enfermedad incluyen la inoculación, penetración, establecimiento de la infección, colonización (invasión), crecimiento, reproducción, dispersión y supervivencia del patógeno en ausencia de su hospedante, o la llegada de condiciones extremas (Agrios, 1997). El inóculo es cualquier parte del patógeno que puede producir infección (fragmentos del micelio, esporas o esclerocios), siendo una de las formas en que atacan en la etapa postcosecha de los productos vegetales, a través de la formación de apresorios que penetran el fruto degradando la cutícula y produciendo una hifa subcuticular latente que no se desarrolla hasta que el fruto madura. Los cambios fisiológicos en el fruto (ablandamiento, reducción de compuestos fenólicos y ácidos orgánicos, e incremento de azúcares) permiten la activación del patógeno quiescente (Benoualelem *et al.*, 2000; Freeman *et al.*, 1995).

La maduración de los frutos, conduce a la pérdida de firmeza, facilita la infección del patógeno, aumenta la descomposición, reduciendo la vida útil y calidad del producto. Los cambios en la estructura y composición de la pared celular son la causa principal de este reblandecimiento. Durante la maduración, en la pared celular, los poliuronidos solubles aumentan, mientras que la pectina insoluble unida covalentemente disminuye. La pectinmetilesterasa (PME) y la poligalacturonasa (PG) son enzimas que actúan sobre la fracción de pectina de la pared celular. La PME cataliza la desmetilación de pectina, lo que hace que las paredes sean susceptibles a mayor degradación por PG (Brummell *et al.*, 2001). Como es común al inicio de la maduración de los frutos, las pectinas generalmente se modifican tempranamente, lo que implica la pérdida de azúcares neutros (AN), particularmente galactosa y arabinosa. Ambos AN suelen existir como cadenas laterales unidas a los residuos de ramnosa de la columna vertebral de ramnogalacturona, estos son los residuos de glicosilo de la pared celular más dinámicos (Redgwell *et al.*, 1997), y se degradan por la acción de β -galactosidasa (β -Gal) y α -1-arabinofuranosidasa (α -1-Af) (Fry, 1995). La β -Gal y α -1-Af son glicosidasas que pueden eliminar los residuos galactosilo y arabinosilo de los polisacáridos de la pared celular, y se cree que son

responsables de la disminución de dichos residuos en muchos frutos durante el proceso de maduración (Ross *et al.*, 1994).

Actualmente se desconocen los mecanismos de reconocimiento entre hospedante y patógeno; sin embargo, al parecer cuando el patógeno entra en contacto con el hospedante, ocurren eventos iniciales que desencadenan respuestas rápidas en cada organismo, que permite o evita el crecimiento posterior del patógeno y desarrollo de la enfermedad. La naturaleza del "evento inicial temprano" se desconoce en todas las asociaciones hospedante-parásito, pero puede ser una de muchas sustancias, estructuras o vías bioquímicas, las cuales pueden incluir moléculas inductoras específicas producidas por un organismo que induce la formación de productos específicos por el otro organismo (Agrios, 1997).

La generación de toxinas del hospedante que reaccionan con los sitios receptores del mismo, pueden ser la liberación de hormonas que afectan el crecimiento y desarrollo del otro organismo; enzimas que pueden alterar la membrana o la pared celular; sustancias que estimulan la activación de las rutas enzimáticas; sustancias quelantes que alteran la permeabilidad de la membrana y afectan el equilibrio de iones; polisacáridos que interfieren con la translocación de agua y nutrientes; y proteínas o glucoproteínas que reaccionan con los polisacáridos de la membrana o de la pared celular (Agrios, 1997).

Cuando la señal de reconocimiento inicial es percibida por el patógeno favorece su crecimiento y desarrollo, y entonces la enfermedad es inducida; pero si la señal se suprime, el crecimiento y actividad del patógeno ceden. Por otro lado, si la señal de reconocimiento inicial percibida por el hospedante desencadena una reacción de defensa, el crecimiento y actividad del patógeno disminuye o cesa, y es posible que no se produzca la enfermedad; por el contrario, si la señal se suprime o anula la reacción de defensa del hospedante, se desarrolla la enfermedad (Agrios, 1997).

Botrytis spp., es un patógeno fúngico filamentoso, que infecta a muchas especies, en todas las áreas climáticas del mundo, atacando principalmente las partes de plantas superiores en las etapas previas y posteriores a la cosecha (Jarvis, 1997).

La infección puede ocurrir con alta humedad en presencia o ausencia de películas de agua (Elad, 1995). La infección puede ser inactiva, agresiva, restringida o ampliamente desarrollada (los síntomas van desde lesiones restringidas a secas o presentando pudriciones blandas, con o sin aparición de esporulación conspicua). La producción de alto número de conidios, rápida tasa de germinación conidial, infección, crecimiento de micelio y formación de apresorios, representan amenazas duraderas para los huéspedes susceptibles (Elad *et al.*, 2007). Además, *B. cinerea* es oportunista ya que puede iniciar la infección en los sitios de la herida o previamente infectados por otros patógeno; también puede ingresar vía estomática, aunque es perfectamente capaz de penetrar en las superficies intactas del huésped mediante la cutícula, el cual consiste en cutina, poliéster de C16-hidroxiado y epoxidado, y ácidos grasos C18 (Williamson *et al.*, 1995; Cole *et al.*, 1996). Por lo tanto, se considera que requiere actividad enzimática (cutinolítica) para penetrar en las superficies intactas del huésped (Salinas *et al.*, 1995; Vlugt-Bergmans, 1997a). La enzima diferente que puede mediar en la penetración del huésped es lipasa de 60 kDa. (Comménil *et al.*, 1995). La lipasa posee actividad cutinolítica, aunque con propiedades cinéticas claramente distintas a la cutinasa 'típica' (Comménil *et al.*, 1998).

Se ha reportado que los filtrados de cultivo de *B. cinerea* pueden inducir efectos tóxicos cuando se aplican a tejidos vegetales (Rebordinos *et al.*, 1996). Los compuestos fitotóxicos se identificaron como botcinolida, lactona altamente hidroxilada (Dulik, 1993) y botrydial, sesquiterpeno tricíclico (Colmenares *et al.*, 2002). La variación genotípica y fenotípica en el patógeno confiere un amplio espectro a *B. cinerea*. Las técnicas mejoradas para cultivo y espermatización (Faretra *et al.*, 1988) permitieron el apareamiento de cepas de *Botrytis* para análisis genético, que mostró conidios multinucleados y compartimientos hifales, con tendencia a cambiar constantemente durante generaciones sucesivas *in vitro* y en condiciones de campo. Además, los cambios en las poblaciones en respuesta a la selección por exposición a compuestos xenobióticos, especialmente fungicidas, son comunes en el género, de allí que la resistencia a los fungicidas de *Botrytis* a lo largo de la historia de la era moderna es notable (Elad *et al.*, 2007).

Reavill *et al.* (1954) notaron que *B. cinerea* podía tolerar los fungicidas de nitrobenzeno clorados, y cuando se usó por primera vez a los fungicidas sistémicos de bencimidazol, se comprobó el desarrollo de aislados resistentes a las dicarboximidias (Bollen *et al.*, 1971; Katan, 1982).

Colletotrichum spp., este patógeno y su teleomorfo *Glomerella* infecta alrededor de 470 géneros de hospedantes diferentes (Sharma *et al.*, 2015). *C. gloeosporioides* es un hongo de distribución cosmopolita y con predominancia en los trópicos y subtrópicos (Xiao *et al.*, 2004), ocasiona daños desde la producción hasta postcosecha atacando hojas, ramas, panículas y frutos (Paull *et al.*, 2011). El hongo produce enzimas (poligalacturonasas y pectatoliasas) que degradan las paredes celulares y causan pérdidas económicas significativas (Rodríguez-López *et al.*, 2009). El patógeno inicialmente infecta frutas verdes inmaduras intactas, sin heridas en campo. Posteriormente se produce la germinación rápida de esporas y la formación de apresorios en condiciones ambientales favorables que resultan en infección quiescente. El hongo, utiliza su apresorio que penetra la cutícula a través de la degradación enzimática, produciendo una hifa subcuticular latente que no se desarrolla hasta que el fruto madura. Los cambios fisiológicos en el fruto permiten la activación del patógeno quiescente. Los conidios de *C. gloeosporioides* se producen dentro de acérvulos, que son la fuente principal de inóculo para el desarrollo y diseminación de la enfermedad (Jeffries *et al.*, 1990; Latunde-Dada, 2001). La dispersión del patógeno puede ser por aire o salpicaduras de lluvia (Téliz *et al.*, 2007); y al dispersarse, los conidios se adhieren al hospedero por medio de una capa mucilaginosa compuesta de polisacáridos y glucoproteínas presentes en el acérvulo, la cual se ha observado en el tubo germinativo y el apresorio de *C. gloeosporioides* cuando infecta mango (*Mangifera indica* L.) (Téliz *et al.*, 2007; Ruiz, 2001).

En *Candida albicans* ((C.P. Robin) Berkhout), se producen procesos en el cual las manoproteínas son responsables de la adhesión del patógeno al hospedero (Hazen *et al.*, 1992). Se sugiere que este mecanismo también opera en

Colletotrichum lindemuthianum ((Sacc. y Magnus) Lams.-Scrib). (O'Connell *et al.*, 1996) procesos que pueden ser extrapolados a *C. gloeosporioides*. Adicionalmente, *Colletotrichum trifolii* Bain y Essary contienen cutinasas y esterases que le ayudan en la adhesión y penetración del hospedero, así como a la señalización y germinación de los conidios (Dickman *et al.*, 2003). Una vez que el conidio de *C. gloeosporioides* se encuentra en la superficie, responde a las ceras epiculares del hospedante y al etileno, coincidiendo con la maduración del fruto; para tal efecto la señal del hospedante es el incremento en la producción de etileno en concentraciones internas cercanas a $0.2 \mu\text{L L}^{-1}$, requiriendo el contacto del conidio con la superficie por 2 h (Kim *et al.*, 1998, 2000), para inducir la germinación y formación del apresorio.

Cuando los cambios fisiológicos en el hospedero inhiben sus propios mecanismos de defensa en respuesta a las actividades del patógeno, la interacción patógeno-hospedante es compatible. La resistencia del fruto inmaduro de aguacate al ataque de *Colletotrichum* sp. se ha asociado con la presencia de compuestos preformados en el pericarpio (Podila *et al.*, 1993). Con frecuencia este hongo infecta frutos inmaduros y permanece latente hasta que disminuyen las concentraciones de compuestos antifúngicos a niveles no tóxicos, lo que en aguacate coincide con la maduración del fruto (Beno-Moualem *et al.*, 2000; Wharton *et al.*, 2004; Yakoby *et al.*, 2001). El pericarpio del aguacate contiene monoenos (1-acetoxi-2,4-dihidroxi-n-heptadeca-16-eno) y dienos y (1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicoso-12,16-dieno). Los niveles de estos compuestos disminuyen durante la maduración del fruto permitiendo el ataque de hongos (Morrissey, *et al.*, 1999) en ambientes con humedad relativa entre 80 a 100% (Prusky *et al.*, 2001; Talhinhos *et al.*, 2005; Yakoby *et al.*, 2002). El pH óptimo de crecimiento del hongo es de 5.5 y 7.0 (Drori *et al.*, 2003; Prusky *et al.*, 2001; Villanueva-Arce *et al.*, 2004).

4.2 Importancia de *Botrytis cinerea* como hongo fitopatógeno

Botrytis cinerea y su teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana*, agente causal de la "moho gris", es la única especie en el género con amplio rango de hospederos, infecta más de 200 especies de plantas dicotiledóneas (Elad *et al.*, 2004), mientras que

todas las demás especies de *Botrytis* se consideran especializadas en una especie de planta, por ejemplo *B. fabae* infecta a *Vicia faba* L., *B. elliptica* infecta *Lilium* sp. y *B. tulipae* infecta a *Tulipa* sp.; *B. cinerea* es un necrotrofo típico y puede producir múltiples metabolitos y proteínas que lo hacen polífago (Van Kan, 2006).

B. cinerea es un haploide filamentoso, heterotálico que ataca en campo e invernadero. Tiene importancia en productos agrícolas almacenados en los que comienzan como infección latente en el cultivo y se desarrolla posteriormente durante la recolección, transporte y almacenamiento (Coley-Smit, 1980).

La máxima incidencia de este hongo se presenta en postcosecha, llegando a afectar hasta 89 % de la cosecha almacenada (Donmez *et al.*, 2011). Se ha clasificado en el segundo lugar dentro de los hongos patógenos de las plantas basado en importancia económica y científica (Dean *et al.*, 2012). El patógeno es capaz de atacar el cultivo en cualquier estado de desarrollo, e infectar cualquier parte de la planta (flores, hojas, tallos y frutos) (Chardonnet *et al.*, 2000); y va asociado a factores como la humedad relativa y temperatura altas, haciendo uso de diferentes mecanismos de acción y provocando serias pérdidas económicas (Benito *et al.*, 2000).

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 varias fases: 1) la adhesión y germinación de las esporas sobre la superficie del huésped. Se han propuesto condiciones en la adhesión al tejido huésped. Comienza antes de la hidratación de los conidios, y típicamente implica fuerzas adhesivas débiles que resultan de las interacciones hidrófobas entre el huésped y las superficies conidiales cuando se produce una unión más fuerte varias horas después la inoculación, cuando los conidios han germinado (Doss *et al.*, 1993; 1995). Las puntas de los tubos germinales están cubiertas con material de matriz extracelular de tipo fibrilar (Doss *et al.*, 1995; Cole *et al.*, 1996),

que consiste en carbohidratos y proteínas (Doss, 1999). La matriz contiene enzimas fúngicas (Gil-Ad *et al.*, 2001). Puede actuar como adhesivo en la superficie del huésped (Doss *et al.*, 1995) y proteger a las hifas de la deshidratación y de los mecanismos de defensa del huésped ; 2) su penetración en el tejido vegetal, a través de heridas o de aberturas naturales así como los estomas, o bien directamente mediante la participación de distintas actividades enzimáticas o procesos mecánicos (incluyendo la diferenciación de estructuras de penetración en algunos sistemas, un ejemplo: la cutícula consiste en cutina, un poliéster de C16- hidroxilado y epoxidado y ácidos grasos C18, cubiertos con cera. El daño físico o penetración mecánica de la cutícula por *B. cinerea* generalmente no se observa; 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 (*B. cinerea* mata las células huésped antes de que sean invadidas por las hifas) (Clark *et al.*, 1976). La invasión del tejido vegetal desencadena la condensación nuclear y daño a la membrana celular, indicadores de muerte celular programada, en un anillo de células rodeando las hifas (Govrin *et al.*, 2000). Estos resultados muestran actividad fitotóxica directa o indirecta. La inducción de la muerte celular programada facilita la invasión de *B. cinerea* y puede ser esencial para su infección exitosa (Govrin *et al.*, 2000). 4) en muchos casos se inicia la fase de latencia durante la cual los mecanismos de defensa de la planta parecen controlar al patógeno que permanece localizado en el área de necrosis correspondientes a las lesiones primarias.

Las fitoalexinas en frutos inmaduros contribuyen a la quiescencia del moho gris; y el resveratrol en uvas (*Vitis vinífera* L.) se correlaciona con su resistencia al ataque del moho gris (Langcake, 1981; Bavaresco *et al.*, 1997); 5) en algunas lesiones primarias el patógeno es capaz de vencer las barreras defensivas de la planta iniciando su diseminación en el tejido vegetal circundante a partir de aquéllas, determinando la colonización y maceración del tejido infectado en breve periodo

de tiempo. Sobre el tejido infectado el patógeno produce una nueva generación de esporas que pueden iniciar un nuevo ciclo de infección (Salinas, 1992)

Se ha observado que la enzima cutinasa, es necesaria para la penetración a través de la cutícula (Salinas *et al.*, 1995), además de enzimas hidrolíticas extracelulares (endo y exo-poligalacturonasas) (pectin metil esterases), pectin liasas, enzimas celulolíticas y proteasas (Johnston *et al.*, 1992; Reignault *et al.*, 1994; Movahedi *et al.*, 1990a, b; Sasaki *et al.*, 1994).

Para seguir invadiendo a su huésped, *Botrytis* necesita que el tejido esté muerto (Clark *et al.*, 1976), lo que sugiere que la producción de toxinas del propio patógeno mata las células que va a colonizar. Por otra parte, la planta despliega diversos mecanismos de defensa ante el ataque del patógeno, entre ellos la producción de distintos tipos de fitoalexinas (Mansfield, 1980). *B. cinerea*, a su vez, produce enzimas responsables de la detoxificación de estos compuestos, y supera el efecto perjudicial de compuestos de defensa de plantas preformados (fitoanticipinas) o inducidos (fitoalexinas). Tal mecanismo implica una secreción dependiente de energía por los transportadores ABC que confiere cierto grado de tolerancia a los efectos fungitóxicos de tales compuestos (de Waard, 1997; Pezet *et al.*, 1991).

El mejor ejemplo estudiado para la desintoxicación de fitoalexina. por *B. cinerea* es la desintoxicación de las vitis fitoalexinas pterostilbeno y resveratrol. La capacidad de los aislamientos de hongos para desintoxicar estas fitoalexinas se correlaciona con la virulencia (Sbaghi *et al.*, 1996). Por el contrario, el nivel de resistencia de los genotipos de *Vitis* L., contra el moho gris se correlaciona con su contenido de fitoalexina (Langcake, 1981; Jeandet *et al.*, 1992). *B. cinerea* produce una lacasa específica del sustrato (estilbeno oxidasa) que es capaz de oxidar ambos compuestos a derivados no tóxicos (Pezet *et al.*, 1991).

Sintomatología: El moho gris causada por *B. cinerea*, coloniza restos florales (estambres, caliptras) senescentes y de esta forma puede persistir en los racimos, proporcionando el inóculo necesario para infecciones en la cosecha o postcosecha

(Wolf *et al.*, 1997). El patógeno infecta todas las partes aéreas de la planta, siendo las flores las más vulnerables (Laha *et al.*, 1983).

En condiciones naturales, la enfermedad aparece en parches aislados donde el cultivo tiene una planta con mucha densidad, cuando prevalece humedad relativa alta ($\geq 95\%$ HR) y temperatura baja (20-25 °C). Los síntomas aparecen en tallos, ramas, hojas, flores y vainas como lesiones de color marrón oscuro o gris cubiertas por esporóforos vellosos erectos y masas de esporas hialinas. Las lesiones del tallo son de 10 a 30 mm de registro y rodean completamente el tallo.

Las flores y racimos florales son susceptibles a la infección, las cuales muestran color café y posteriormente se secan. La enfermedad avanza rápidamente hacia los pedicelos (Rebollar-Alviter, 2011). En las hojas, los primeros síntomas del hongo, son lesiones de color café oscuro localizadas en el ápice, que se caracterizan por no presentar halo clorótico, pero sí algunos anillos concéntricos por el haz de la hoja y abundante moho café por su envés, que corresponde a la esporulación del hongo que causa la enfermedad. El patógeno afecta los pecíolos de las hojas, donde también produce lesiones de color café claro a oscuro, con abundante esporulación (Pande *et al.*, 2001).

En tallos gruesos y duros, se manifiestan lesiones deprimidas, circulares o elipsoides de color café oscuro, cubiertas de abundante esporulación, el crecimiento de moho gris se transforma gradualmente en una masa gris sucia que contiene esporodoquios verde oscuro a negro que luego progresan y pueden comprometer uno o varios tallos, producir su doblamiento y causar la muerte de la planta. En ocasiones, se pueden ver pequeños esclerocios negros en los tejidos muertos. Los esclerocios son cuerpos pequeños y oscuros, y no deben confundirse con esclerocios más grandes de color negro o marrón oscuro incrustados en el micelio blanco de la *Esclerotinia esclerotiorum* (Lib.) (De Bary) (Joshi *et al.*, 1969).

En los frutos, la infección por *B. cinerea* se manifiesta como áreas cafés claro de consistencia blanda o acuosa, y se presentan en la región apical y en la unión del pedúnculo con el fruto, que avanza hasta cubrirlo completamente. Posteriormente

los frutos se cubren de polvillo gris, el cual se caracteriza por la abundante esporulación de color grisáceo o café oscuro, y finalmente momifica. Aunque es posible observar frutos con los síntomas típicos de la enfermedad, especialmente los sobremaduros, la manifestación más clara se presenta en postcosecha, aunque ocasionalmente en condiciones de alta humedad es posible observar síntomas y esporulación del hongo en campo (Rebollar-Alviter, 2011).

4.3 Importancia de *Colletotrichum gloeosporioides* como hongo fitopatógeno

La antracnosis, causada por *Colletotrichum* sp. y su teleomorfo *Glomerella* infecta alrededor de 470 géneros de hospedantes (Sharma *et al.*, 2015), entre ellos mango (*Mangifera indica* L.), papaya (*Carica papaya* L.), banano (*Musa acuminata* L.), soja (*Glycine max* L.), chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), carambola (*Averrhoa carambola* L.), aguacate (*Persea americana* Mill.), menta (*Menta piperita* L.), gandul (*Cajanus cajan* L.), fresa (*Fragaria vesca* L.), manzana (*Malus domestica* Borkh), almendra (*Terminalia catappa* L.), lenteja (*Lens culinaris* Medik), algodón (*Gossypium hirsutum* L.), café (*Coffea arabica* L.), flores como violetas (*Viola odorata* L.), lluvia de oro (*Cassiana fistula* L.), orquídeas (*Orchidaceae*) de diferentes géneros y especies, entre otras plantas (Wajid *et al.*, 1974; Lenné, 1992), además de actuar como cepas endofíticas que se aíslan de partes de plantas sin síntomas (Sharma *et al.*, 2015).

Recientemente, el género *Colletotrichum* fue nominado como el octavo grupo más importante de hongos fitopatógenos en el mundo, basado en la percepción de importancia científica y económica que representa la antracnosis (Dean *et al.*, 2012). Es de las más importantes en las áreas de producción, debido a que ocasiona daños desde la producción hasta postcosecha atacando hojas, ramas, panículas y frutos. Más del 50 % de las pérdidas de frutas y hortalizas frescas son causadas por especies de *Colletotrichum* (Paull *et al.*, 2011; Awang *et al.*, 2011).

Proceso de infección: se inicia con el contacto del hongo y el fruto, sin ser necesaria la presencia de una herida para facilitar la entrada, por lo cual se considera un hongo polimórfico y polífago, por la forma de causar infección en los frutos, clasificándose como hongo de infección latente (Rodríguez *et al.*, 2009;

Mena-Nevarez *et al.*, 2012; Kamle *et al.*, 2013). El inóculo puede tener su origen en plantas enfermas (hojas, flores y frutos). Por medio de la lluvia (salpicadura) y el viento; las esporas son transportadas hasta los frutos que se encuentren en desarrollo (Chau *et al.*, 1983). En general, los estados iniciales de infección (germinación de conidios y formación del apresorio) de *Colletotrichum* en frutos son favorecidos por la temperatura que oscila de 20 a 30 °C y humedad relativa (HR) > 95% (Fitzell *et al.*, 1984; Dodd *et al.*, 1991). Sin embargo, los conidios pueden sobrevivir de 1-2 semanas a baja humedad relativa y después germinar, cuando estos se exponen a HR 100 % (Estrada *et al.*, 1996) entonces el hongo, produce 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.

Los apresorios se melanizan y fortalecen, lo que facilita la infección en la cutícula a través de la hifa de penetración. La presencia y prevalencia de apresorios melanizados se ha utilizado para predecir la infección por antracnosis y cuando se necesitan medidas para su control (Fitzell *et al.*, 1984; Dodd *et al.*, 1991).

Por lo general, este microorganismo se adquiere cuando el fruto está en la fase inmadura, pero las infecciones permanecen quiescentes o latentes, posiblemente a través de una hifa subcuticular que permanece temporalmente inactiva, hasta que el fruto madura (Dickman *et al.*, 1982; Coates *et al.*, 1993b).

Cuando las condiciones de temperatura, humedad y etapa de maduración del fruto lo permiten, se presenta la germinación de esporas y desarrollo micelial; en esta etapa numerosas enzimas degradan los carbohidratos presentes en el fruto, transformándolos en azúcares sencillos y ácidos orgánicos, de tal forma que la hifas subcuticulares que habían permanecido inactivas o quiescentes, se estimulan y ramifican a través del tejido hospedero, al que invaden rápidamente, produciendo los síntomas de antracnosis (Verhoeff, 1974; Dickman *et al.*, 1983; Coates *et al.*, 1993b; Prusky *et al.*, 2009).

Sintomatología: La antracnosis causada por las diferentes especies de *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella*), se observa en hojas, ramas, panículas y frutos. Los frutos pueden ser afectados en cualquier estado de desarrollo. En tanto, la infección severa de frutos jóvenes se presenta a manera de momificación, mientras que las infecciones en frutos más grandes permanecen latentes, hasta que los frutos maduran, y la enfermedad se observa con la aparición de manchas oscuras o lesiones negras, irregulares y hundidas en la superficie de los frutos (Prusky *et al.*, 2009; Ploetz *et al.*, 2009)

Las lesiones por este patógeno pueden presentarse 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 negras. Bajo condiciones favorables se pueden formar, sobre las lesiones, cuerpos fructíferos (acérvulos) del patógeno de color salmón a naranja (Arauz, 2000; Ploetz, 2003)

En algunos vegetales, la enfermedad produce disminución significativa del área foliar, ya que, en ramas, los síntomas comienzan de manera de lesiones necróticas pequeñas oval-alargadas, que se expanden, que conlleva debilitamiento de las plantas por reducción de la capacidad fotosintética. Los ataques a las inflorescencias presentan pequeños puntos negros que se amplían gradualmente y se unen hasta causar tizón de flores. Los frutos en formación pueden ser atacados y ocasionar caída prematura, lo que disminuye la productividad; los brotes tiernos y los tallos en formación de las plantas adultas y jóvenes son afectados drásticamente. El ataque ocasiona, en muchos casos, la muerte del huésped. Los efectos de la enfermedad se ven incrementados por la tendencia del patógeno a causar daños en los frutos durante los procesos de postcosecha; este estadio de la enfermedad afecta a todos los frutos destinados a la exportación y aquéllos que son almacenados para su posterior comercialización (Castro *et al.*, 2004; Prusky *et al.*, 2009; Ploetz *et al.*, 2009)

4.4 Control de *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*

Botrytis cinerea: El control del moho gris es especialmente importante en el almacenamiento porque se desarrolla a bajas temperaturas (-0.5 °C) y se propaga rápidamente (Karabulut *et al.*, 2004). Por ejemplo en uva (*Vitis* sp. L.) el control se ha basado en el uso de dióxido de azufre (SO₂) (Rosslénbroich *et al.*, 2000). Sin embargo, este enfoque no se considera sostenible, debido a la relativa facilidad con que emergen las cepas de *B. cinerea* resistentes a estos compuestos y a los fungicidas y creciente preocupación por la residualidad y salud ambiental (Latorre *et al.*, 1997; Janisiewicz *et al.*, 2002).

Daferera *et al.*, (2003), probaron la eficiencia de aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare* L.), tomillo (*Thymus capitatus* L.), dictamnus (*Origanum dictamnus* L.), mejorana (*Origanum majorana* L.), lavanda (*Lavandula angustifolia* P. Mill.), romero (*Rosmarinus officinalis* L.), salvia (*Salvia fruticosa* Mill), y poleo (*Mentha pulegium* L.) contra *Botrytis cinerea* en medios de crecimiento artificial. El crecimiento del patógeno fue completamente inhibido por los aceites de orégano, tomillo, dictamnus y mejorana en concentraciones relativamente bajas (85-300 µg mL⁻¹). El timol era el componente principal del aceite de orégano, mientras que los aceites de tomillo, dictamnus y mejorana eran ricos en carvacrol. Los aceites esenciales de lavanda, romero, salvia y poleo presentaron menor actividad inhibitoria. El crecimiento de los microorganismos se vio afectado en concentraciones de hasta 1000 µg mL⁻¹. El aceite de lavanda se caracterizó por el alto contenido de linalool y acetato de linalilo, mientras que el eucaliptol, fue el componente principal de los aceites de salvia y romero. El aceite de poleo fue encontrado rico en *cis*-menthone y pulegone.

Hébert *et al.* (2002), extrajeron proantocianidinas (PA) de seis genotipos de fresa (*Fragaria x ananassa*), y evaluaron su capacidad para controlar germinación y crecimiento de *Botrytis* sp. El crecimiento del micelio se determinó en papa-dextrosa-agar (PDA), la germinación en caldo de dextrosa de papa (PDB). Un panel evaluó la vida útil (primer aspecto del moho) y la calidad de los cultivares después de 14 días de almacenamiento a 2 °C. Los extractos inhibieron *Botrytis*

sp. en su desarrollo. El crecimiento radial del micelio en PDA enriquecido con PA se redujo hasta 75 % y mostró correlación significativa cuando el extracto se aplicó en frutos de fresa y se observó incremento en vida de anaquel. La germinación y la elongación del tubo germinativo se redujeron en PDB enriquecido con PA y se observó ramificación múltiple de hifas, contrario a la formación de hifas libres que permiten al hongo invasión eficiente. Los resultados de esta investigación sugieren que el contenido de proantocianidina se puede usar como indicador de la resistencia al moho gris para seleccionar variedades de fresas y mejorar la vida útil.

Colletotrichum sp.: El control postcosecha de la antracnosis tiene como objetivo la erradicación de infecciones latentes, esta erradicación se realiza con los tratamientos térmicos y químicos, o combinación de ambos (Arauz, 2000). El manejo de la temperatura de los productos cosechados es crucial para el control de las enfermedades postcosecha, en general los estados iniciales de infección (germinación de conidios y formación del apresorio) de *Colletotrichum* son favorecidos por temperaturas que oscilan de 20 a 30 °C y humedad relativa (HR)>95% (Fitzell *et al.*, 1984; Dodd *et al.*, 1991). La inmersión de la fruta en agua caliente (50-55 °C durante 3-15 min) es un tratamiento moderadamente eficiente, y una de las ventajas de este tratamiento es la ausencia de residuos químicos en los frutos (McGuire, 1991). Sin embargo, la desventaja es que puede afectar la maduración del producto, además de requerir de alta precisión de la temperatura y tiempo a controlar. Temperatura demasiado alta para un huésped puede aumentar las posibilidades de susceptibilidad a patógenos, aunque no es evidente un daño visible y también puede afectar el proceso de maduración en algunas frutas (Prusky *et al.*, 2009).

Cuando los tratamientos de agua caliente se combinan con fungicidas, la temperatura del agua debe oscilar entre 52 y 53 °C con buenos resultados, pero los tratamientos de inmersión en fungicidas con agua fría han mostrado menor efectividad (Ploetz, 2003; Prusky *et al.*, 2009). En Filipinas, el tratamiento de agua caliente (hot water treatment: HWT) se acepta como estrategia efectiva de control

de enfermedades en mango, particularmente contra la antracnosis. Resultados de cuatro casos (exportadores / procesadores) mostraron la efectividad del tratamiento de 52–55 °C durante 2–7 min. Además, el cubrimiento con bolsas de arpillera de las frutas de mango antes de la cosecha seguidas del tratamiento HWT (52–55 °C) durante 10 min redujo la presencia de *C. gloeosporioides* en 83 %. Con HWT, las compañías tienen la garantía de reducir la incidencia de la antracnosis en 10 % en comparación con aquellas con incidencia de hasta 30 % sin utilizar la técnica (Aveno *et al.*, 2004).

En otro estudio para cultivares de papaya 'Sunrise Solo' y 'Tainung 1' inoculados con dos aislamientos de *C. gloeosporioides*, el diámetro de la lesión se redujo después del tratamiento con agua caliente de 20, 25 y 30 min a 48 ° C, y el total el control de los hongos se logró mediante la inmersión de la fruta durante 20 min a 50 °C (Martins *et al.*, 2004). Chávez-Sánchez *et al.* (2013) reportaron retraso en la aparición de los síntomas de la enfermedad por hasta 11 d en papayas tratadas a 55 °C durante 3, 6 y 9 min.

En el caso de los fungicidas de la clase metil bencimidazol carbamatos (MBC), el benomilo y el tiabendazol han mostrado ser altamente efectivos en concentraciones de 500–1000 µg mL⁻¹, respectivamente, aunque el uso de benomilo® ya no está permitido (Arauz, 2000). Otra ventaja del uso de fungicidas MBC en tratamientos postcosecha, es que también son efectivos para el control de la pudrición postcosecha del pedúnculo (Estrad *et al.*, 1996), causadas por diversas especies de la familia Botryosphaeraceae (Sandoval-Sánchez *et al.*, 2012)

La aplicación de boratos es otra alternativa que ha mostrado efectos positivos en el control postcosecha de antracnosis, ya que estimulan la acumulación de oxígeno reactivo en las esporas del hongo, resultando en daño mitocondrial y, por ende, en la inhibición de la germinación de esporas (Shi *et al.*, 2011).

Otras tecnologías emergentes que se han probado para el control efectivo de la antracnosis de las frutas perecedoras, es el uso de compuestos seguros (GRAS), desinfectantes, control biológico, inductores naturales, recubrimientos

comestibles y aceites esenciales. La creciente conciencia de los peligros para la salud y contaminación ambiental debida al uso indiscriminado de plaguicidas ha obligado a las agencias de protección ambiental de varios países desarrollados y en desarrollo a prohibir el uso de numerosos productos químicos que se aplicaban con frecuencia a las frutas y verduras desde 1991 (Rendall-Dunn, 1991). Además, la posibilidad del desarrollo de resistencia en patógenos a los fungicidas fue otro factor crítico en la restricción de los productos químicos disponibles.

Los aceites esenciales de plantas contienen diversidad de compuestos químicos, incluidos los terpenoides, que se sabe que están involucrados en los mecanismos de defensa de las plantas contra patógenos (Lee *et al.*, 2003). En estudios poscosecha en pruebas *in vitro* mostraron que *B. cinerea*, *Rhizopus stolonifer* y *Alternaria alternata* pueden ser controlados al 100% con aceite esencial de tomillo incorporado al medio de cultivo agar en concentraciones de 500 mg L⁻¹ (Plotto *et al.*, 2003).

El aceite esencial de limón mexicano (*Citrus aurantifolia* (Christm) Swing) es naturalmente antibacteriano, antiviral y de efecto fungicida, se ha observado que el crecimiento de hongo *Aspergillus flavus* puede ser controlado con 3000 mg kg⁻¹ de este aceite (Mishra *et al.*, 1994).

4.5 Uso potencial de extractos de *Sechium sp.* para el control de enfermedades poscosecha

Las plantas han tenido siempre especial interés atribuido a sus constituyentes químicos, principalmente los metabolitos secundarios (Bruneton, 2001). Estos compuestos se sintetizan en células especializadas, durante distintas etapas del desarrollo, se acumulan en pequeñas cantidades y presentan complejidad estructural que pueden determinar su actividad, y funcionan como defensa química contra diferentes organismos que afecten su estructura (Waksmundzka *et al.*, 2008).

Yenjit *et al.*, (2010) probaron la efectividad de tres triterpenos (fernenol (helecho-9 (11) -en-3 α -ol), arundoína (helecho-9 (11) -en-3 α -ol ME) y una mezcla de estigmasterol y β -sitosterol, y un ácido graso (ácido láurico) en el crecimiento micelial *in vitro* de *C. gloeosporioides*, con resultados de CL₅₀ de 36.7, 47.5, 56.7 y 111.5 mg L⁻¹, respectivamente. Además, el fernenol, arundoína y la mezcla de estigmasterol y β -sitosterol inhibieron la germinación de esporas y elongación del tubo germinal. La aplicación de estos compuestos sobre los frutos de mango sugirió que el fernenol, arundoína y la mezcla de estigmasterol y β -sitosterol tuvieron mayor efectividad que el benomilo para controlar antracnosis en postcosecha en concentraciones de 100 y 200 mg L⁻¹.

Bolívar *et al.* (2018) determinaron el efecto de la aplicación de extractos etanólicos (EE) de hojas de *Azadirachta indica* ('nim'); *Phyllanthus niruri* ('flor escondida'); *Calotropis procera* ('algodón de seda'); *Lippia origanoides* ('orégano silvestre'); *Gliricidia sepium* ('mata ratón') y *Heliotropium indicum* ('rabo de alacrán'), de Lara, Venezuela, en el control de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en frutos de mango. Frutos de mango fisiológicamente maduros fueron tratados con los extractos al 2.5 % y luego inoculados con el hongo, mostrando que los extractos de *L. origanoides* y *G. sepium* redujeron en 37 y 33 % la enfermedad.

Rangel-Guerrero *et al.* (2018) evaluaron el efecto *in vitro* de extractos de *Cucurbita foetidissima* procedentes de diferentes regiones en el crecimiento micelial de hongos como *Rhizoctonia*, *Phytophthora*, *Fusarium* y *Botrytis*. Todos los extractos inhibieron el crecimiento de las colonias (p<0.0001), con efecto diferencial en función de la procedencia del fruto. Frutos de Rincón de Romos, Ags. y de Villa de Ramos, SLP., inhibieron 100 % de *Rhizoctonia*; de Salinas, SLP., permitieron 13.6 % de crecimiento de *Botrytis*, e inhibieron el crecimiento total de *Rhizoctonia*. El extracto de los frutos procedentes de Loreto, Zacatecas inhibió a *Botrytis*, y *Rhizoctonia* (100 %). *Fusarium* spp., y *Phytophthora* spp., registraron crecimiento promedio de 46.7% y 42.4% la inhibición del crecimiento micelial se atribuye a la presencia de los triterpenos tetracíclicos presentes en los frutos.

Dentro de la familia Curcubitaceae, se ubica el género *Sechium* spp., comúnmente llamado “chayote” término moderno modificado de los vocablos náhuatl “huitz” y “ayotl” que significan calabaza espinosa. Es una especie vegetal neotropical endémica de México (Lira, 1999; Cadena, 2005), utilizada en la alimentación prehispánica (Cook, 1901), cuenta con la mayor diversidad biológica en México (Ortega-Paczka *et al.*, 1998), por tener diferentes especies y variedades, semidomesticadas y silvestres (Hernández, 1985; Rzedowski, 1991). Actualmente se acepta que dentro del género hay diez especies, de las cuales ocho son silvestres, (*S. compositum*, *S. chinantlense*, *S. hintonii*, *S. talamancense*, *S. panamense*, *S. pittieri*, *S. venosum*, y *S. vilosum*) y dos domesticadas (*S. edule* y *S. tacaco*) con distribución desde México hasta Panamá (Lira, 1999; Cadena-*l*ñíguez *et al.*, 2007). De la diversidad biológica anterior, los frutos de plantas silvestres sobresalen por su sabor amargo, debido a la composición que incluye, triterpenos (cucurbitacinas), flavonoides, fenoles, entre otros.

Sechium compositum (Donn. Sm.) C. Jeffrey es una especie que está siendo amenazada debido a la invasión de su hábitat; sin embargo, en los últimos años se han realizado investigaciones que prueban que sus frutos tienen potencial citotóxico.

Aguñiga *et al.* (2015) reportan que *S. compositum* registra en sus frutos 91.5% de agua y 8.5 % de peso seco; y al valuar el contenido de metabolitos secundarios se encontró que la mayor proporción correspondió a terpenos seguido de flavonoides, saponinas y taninos. Este genotipo tiene menor cantidad de agua en comparación con las especies domesticadas de *S. edule*, y puede ser consecuencia de la cantidad de metabolitos secundarios presentes atribuido a sus mecanismos de defensa ante el medio. Los genotipos silvestres sintetizan mayor cantidad de metabolitos secundarios (MS), mientras que, en los domesticados, se reduce la demanda de fitoquímicos quienes se tornan más vulnerables a los herbívoros, patógenos y competidores (Gols *et al.*, 2008; Gepts *et al.*, 2004).

Dentro de los terpenos se encuentran las cucurbitacinas que son triterpenos generalmente encontrados en la familia Cucurbitaceae, cuya principal característica es sabor amargo (Miró *et al.*, 1995).

Las cucurbitacinas son de interés biomédico, ya que se ha descrito su actividad citotóxica en células tumorales a bajas concentraciones (Setzer *et al.*, 2003), además de activar la ruta JaK/STAT en el proceso de apoptosis de células tumorales inhibiendo su desarrollo (Sun *et al.*, 2005; Thoennissen *et al.*, 2009).

Aguiñiga *et al.* (2015) reportaron que el extracto crudo etanólico de *Sechium compositum* presentó efecto antiproliferativo significativo en la línea celular mielomonocítica WEHI-3 a partir de 0.15 g mL⁻¹, mientras que los extractos a base de hexano, diclorometano y metanol fue de 0.6 g mL⁻¹. El extracto crudo presento actividad antiproliferativa similar a Ara-C® a partir de 1.2 g mL⁻¹ y el extracto de diclorometano tuvo actividad similar en dosis de 5 g mL⁻¹. En células mononucleadas de médula ósea de ratón el extracto crudo de *S. compositum* tuvo efecto significativo en dosis de 0.6 g mL⁻¹, el extracto de metanol en 1.2 g mL⁻¹, hexano y diclorometano fue hasta los 2.5 g mL⁻¹, solo el extracto crudo presento actividad antiproliferativa similar a Ara-C® en dosis de 5 g mL⁻¹, mientras que los extractos de hexano, diclorometano y metanol solo redujeron la proliferación cerca del 20 % a la misma dosis.

Con base en lo anterior, es posible que de forma semejante los extractos a base de *S. compositum* sean capaces de inhibir el crecimiento celular, principalmente por la presencia de cucurbitacinas, aunado a flavonoles, ácidos fenólicos y saponinas.

V. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Aislamiento y caracterización morfológica de *Botrytis*

El aislado de *Botrytis* se recolectó a partir de muestras de rosas "Polar Star" que presentaron signos y síntomas característicos de *Botrytis* en un invernadero de la Empresa Flores Selectas, ubicada en Tequexquahuac, Texcoco, México.

El aislamiento de *Botrytis* sp. se obtuvo mediante los procedimientos descritos por Valdés *et al.* (2017), con algunas modificaciones. Se tomaron muestras de pétalos de rosa con esporulación abundante. Con ayuda de un asa se raspó la superficie para liberar los conidios, y se agregaron en 90 mL de agua destilada estéril, esta solución se filtró con una gasa y se colocó en un matraz Erlenmeyer, y se homogenizó por 5 min. Posteriormente se realizaron diluciones decimales hasta 10^{-6} en condiciones asépticas. De cada dilución se tomó una alícuota de 0.30 ml para depositarse por triplicado en cajas Petri con el medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) (Difco®, Becton Dickinson, Francia) + ácido láctico (25 %). Cada alícuota se dispersó de forma homogénea, sobre la superficie del medio usando un asa de Digralsky. Los cultivos se mantuvieron en obscuridad aproximadamente 24 h. Posteriormente con la ayuda de un estereoscopio, las esporas con desarrollo del tubo germinativo, se transfirieron a cajas Petri con medio PDA, y permitir su libre crecimiento a temperatura ambiente.

A continuación, se determinó la tasa de crecimiento micelial del aislamiento, se tomaron discos miceliales (5 mm de diámetro) monoconidiales, obtenidos del margen de cultivos con crecimiento activo de 5 d, que se transfirieron asépticamente a medio de cultivo PDA (Difco® Becton Dickinson, Francia). Los cultivos se incubaron a temperatura ambiente en obscuridad continua. El diámetro del crecimiento micelial de la colonia se midió en forma de cruz y se registró cada 24 h, durante 4 d. Para estimar la tasa de crecimiento (k), se calculó con la función de crecimiento lineal $y = kx + c$ (donde y es el diámetro del crecimiento, x el tiempo y c el factor constante) el cual se expresó en milímetros por día (mm día^{-1}) (Zervakis *et al.*, 2001). La colonia de *Botrytis* se caracterizó visualmente por color

y formación de masa conidial a los 4 d de crecimiento. Esta etapa se repitió dos veces.

Para estudiar la morfología conidial, se realizaron montajes de esporas en ácido láctico, a partir de las colonias con crecimiento, y se examinaron en microscopio compuesto (Nikon Eclipse E400® EE.UU.). EL sistema de análisis de imágenes Motic Image Plus v. 3.0 (Motic Group Co®, China) se usó para determinar la forma y tamaño (largo y ancho) de 50 conidios del aislado. De la medida de los conidios se calculó la media y la desviación estándar.

5.2 Aislamiento y caracterización morfológica de *Colletotrichum*

Se utilizó un aislado de *C. gloeosporioides*, donado de la colección de hongos fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo. El cual se encontraba en conservación en discos miceliales en 15 % de glicerol a -80 °C.

Para reactivar el hongo se retiraron los discos (5 mm de diámetro) del glicerol y se secaron en papel absorbente estéril. Posteriormente, los discos se colocaron en cajas de Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA, Difco®, Becton Dickinson, Francia) a 2 % con 100 µg mL⁻¹ de estreptomina (Sigma®, EE.UU.), las cajas se incubaron a temperatura ambiente en oscuridad, y después de 72 h se transfirieron discos miceliales (5 mm de diámetro) del borde de los crecimientos fúngicos en nuevas cajas Petri con medio PDA y se incubaron a 25°C por 7 d.

5.3 Caracterización molecular de ambas especies de hongos

La identificación a nivel de especie de ambos hongos fue confirmada mediante la amplificación de la región de 5.8 S rDNA. El DNA genómico se extrajo usando el método descrito Camacho-Tapia *et al.* (2016) con algunas modificaciones. Para ello los hongos aislados se sembraron en PDA y mantuvieron a temperatura ambiente en oscuridad, cinco días después de la siembra se procedió a extraer el DNA; de cada aislado tomó una pequeña porción de micelio aéreo de la colonia, usando espátula de acero inoxidable estéril, el micelio se depositó en mortero estéril, posteriormente se le agregó nitrógeno líquido, se maceró y se transfirió a

un tubo de microcentrifuga de 1.5 mL que contenían 500 μ L de solución buffer (Tris 100mM, EDTA 10 mM, 2 % SDS, 0.2 mg mL⁻¹ de proteinasa K)(SIGMA®Chemicals, EE.UU.), se mezcló en vórtex (10 s) y después se colocó en microcentrifuga (Centrifuge 5810 R Eppendorf) a 13 000 g durante 10 min, y se incubó por una hora a 38 °C. A cada tubo se le añadió 70 μ L de NaCl 5 M, 30 μ L de CTAB 10% (CTAB; SIGMA®Chemicals, EE.UU.), y se mezcló por vórtex por 10 s, después se incubó a 65 °C durante una hora. Posteriormente, se añadieron 100 μ L de acetato de potasio 5M, se mezcló con vórtex por 10 s y se incubó a -20 °C durante 10 min, luego se agregaron 700 μ L de cloroformo-alcohol isoamilico (24:1v/v) se pasaron por vórtex por 10 s y nuevamente se centrifugó. Con micropipeta, el sobrenadante se transfirió a tubo nuevo de microcentrifuga de 1.5 mL y se agregaron 640 μ L de isopropanol y 60 μ L de acetato de sodio 3M. Los tubos se mezclaron por inversión de cuatro a cinco veces y se almacenaron a -20 °C durante 10 min, luego se centrifugó a 13000 g durante 10 min, para sedimentar el DNA y desechar el sobrenadante. Se agregó a cada tubo 500 μ L de etanol al 70 %, se centrifugó a 13 000 g por 5 min y el sobrenadante se desechó de nuevo. En papel absorbente se colocaron los tubos de forma invertida para escurrir el etanol, posteriormente cuando la pastilla estuvo seca se agregaron 100 μ L de agua estéril libre de DNAsa y RNAsa. La calidad y concentración del DNA se cuantificó mediante un espectrofotómetro Nanodrop Lite (Thermo Scientific ®, EE.UU.), finalmente el DNA se almacenó a -20°C para su uso posterior.

La PCR se realizó de acuerdo con los parámetros de ciclado e iniciadores especificados por White *et al.* (1990) utilizando los primers ITS 5 (GGA AGT AAA AGT CGT AAC AAG G) y 4 (TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC), posteriormente se preparó la mezcla de reacción a volumen final de 50 μ L, buffer de PCR 1x, 2.5 mM MgCl₂, 0.2 mM dNTP, 0.8 μ M de cada primer, 1U DNA polimerasa (Promega, EE.UU.) y 100 ng de DNA. La PCR se llevó a cabo en un termociclador C-1000 (Bio-Rad®, EE.UU.).

Para el caso de ITS se realizó desnaturalización inicial a 95 °C por 3 min, 35 ciclos de 95 °C por 30 s, 55 °C por 30 s, 72 °C por 1 min; y extensión final de 72 °C por 10 min. Los productos amplificados se verificaron por electroforesis en gel de agarosa al 1 % con buffer de corrida TAE 1X. Se usó de 7 µL del producto de PCR y 3 µL de buffer de carga, para llevar a electroforesis a 90 volts. El gel se analizó con luz ultravioleta con transiluminador M-26X usando el sistema de imágenes GelDoc-It™ 300 (UVP, EE.UU.).

Los fragmentos amplificados con los primers ITS 5/ITS 4, fueron purificados mediante el protocolo de DNA clean & concentrator™-5 (Zymo Research, EE. UU.). Dichos fragmentos de DNA purificados se mandaron a secuenciar con la empresa Macrogen® (Seúl, Korea). Las secuencias obtenidas fueron comparadas con la base de datos en NCBI con el BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>).

5.4 Obtención de jugo de chayote (*Sechium compositum*)

Frutos de *S. compositum* se cosecharon en febrero del 2018, los cuales se encontraban en madurez fisiológica. Los frutos se lavaron con agua corriente; se desinfectaron en solución de hipoclorito de sodio (1 %) por 3 min; se enjuagaron dos veces en agua destilada y se secaron con toallas absorbentes estériles, posteriormente los frutos se cortaron en trozos pequeños, se procesaron en una máquina de extracción de aceite prensado en frío (modelo OPM-500, JOOSHUN™, Guangdong China). El jugo extraído se centrifugo a 2150 g por 10 min. El sobrenadante resultante se almaceno a 4 °C, para la eliminación de bacterias se aplicó luz UV-C a dosis de ~4 kJ m⁻².

5.5 Identificación de compuestos del jugo por HPLC

El análisis de compuestos se realizó por HPLC, en cromatógrafo Infinity serie 1220 de Agilent Technologies (St. Clara, CA, EE. UU.), equipado con una columna Thermo Fisher Hypersyl™ ODS C18 (125 × 4 mm; tamaño de partícula de 5 µm).

Los flavonoides se analizaron a 30 °C en elución isocrática con fase móvil que comprende agua: acetonitrilo (65:35; v/v), con pH ajustado a 2.5 con ácido

trifluoroacético, suministrado al caudal de 1 mL min⁻¹. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 µL, la longitud de onda de detección fue de 235 nm y los compuestos de referencia estándar empleados fueron rutina, floretina, florizidina, miricetina, quercetina, naringenina y galangina.

Para compuestos fenólicos se utilizó la columna de Nucleosil (125 x 4 mm) de Macherey-Nagel con gradiente de (A) H₂O a pH 2.5 con TFA (ácido trifluoroacético) y (B) ACN (acetonitrilo). Las condiciones fueron: flujo 1 mL min⁻¹; 30 °C, volumen de inyección 20 µL, utilizando como estándares los ácidos: cafeico, gálico, clorogénico, vanilínico, *p*-hydroxibenzóico, *p*-cumárico, ferúlico y siríngico.

Las cucurbitacinas se analizaron a 25 °C utilizando una columna Symmetry Shield RP18 de Waters (Milford, MA, EE. UU.) (250 × 4.4 mm; tamaño de partícula de 5 µm). La elución isocrática se llevó a cabo con una fase móvil agua: metanol: acetonitrilo (50: 30: 20; v/v/v) suministrado al caudal de 1 mL min⁻¹. El volumen de inyección de la muestra fue de 20 µL, la longitud de onda de detección fue de 235 nm y los compuestos de referencia estándar empleados fueron las cucurbitacinas B, D, E, e I.

5.6 Control *in vitro* de *Botrytis cinerea*, con jugo de *S. compositum*

Doscientos mililitros de medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) se mezclaron antes de su solidificación con cada una de las concentraciones del jugo (Cuadro 1) y se vaciaron en cajas de Petri (9 cm de diámetro) estéril, para solidificación. Posteriormente en el centro de cada caja se colocó un disco de 5 mm de diámetro de PDA con micelio de la cepa de *B. cinerea* de 4 d de edad. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones. El testigo químico fue ciprodinil + fludioxonil (Switch®) (2 g L⁻¹), mientras que el testigo absoluto fue medio PDA. Las cajas de Petri se incubaron a 23 °C, y el diámetro ecuatorial del hongo se midió cada 24 h con vernier digital hasta que el testigo absoluto cubrió la caja Petri.

Cuadro 1. Concentraciones de jugo de frutos de *Sechium compositum* probado para la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea*.

Tratamiento	Especie vegetal	Concentración (%)
1		1
2		2.5
3		5
4	Jugo de frutos de <i>S. compositum</i>	7.5
5		10
6		15
7		20
8		25
9		30
10		40
11	Testigo absoluto (solo PDA)	0
12	Testigo químico (PDA + Ciprodinil + Fludioxonil (SWITCH®))	2 g L ⁻¹

5.7 Control *in vitro* de *C. gloeosporioides* con jugo de *S. compositum*

Doscientos mililitros de medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) se mezclaron antes de su solidificación con cada una de las concentraciones del extracto vegetal (Cuadro 2) y se vaciaron en cajas de Petri (9 cm de diámetro) estéril, para solidificación. Posteriormente en el centro de cada caja se colocó un disco de 5 mm de diámetro de PDA con micelio de la cepa de *C. gloeosporioides* de 8 d de edad. Cada tratamiento tuvo 10 repeticiones. El testigo químico fue tiabendazol (Tecto® 60) concentración de 1 g L⁻¹, mientras que el testigo absoluto fue solo el medio PDA. Las cajas de Petri se incubaron a 23 °C, el diámetro ecuatorial del hongo se midió cada 24 h con un vernier digital hasta que el hongo cubrió la caja Petri del testigo absoluto.

Cuadro 2. Jugo de frutos de *Sechium compositum* probado para la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *C. gloeosporioides*.

Tratamiento	Especie vegetal	Concentración (%)
1		2
2		4
3		7.5
4		15
5	Jugo de frutos de <i>S. compositum</i>	22.5
6		30
7		37.5
8		45
9		52.5
10	Testigo absoluto (solo PDA)	0
11	Testigo químico (PDA + tiabendazol (Tecto 60®))	1g L ⁻¹

5.8 Germinación de esporas

Para determinar el efecto del jugo en la germinación de esporas de ambas especies, se utilizaron caja Petri de diámetro de 6 cm a los que se le agregaron 4 mL de medio de cultivo PDA. Antes de que el PDA solidificara se mezcló con el jugo vegetal hasta lograr la homogenización de cada concentración. Posteriormente se colocaron 20 µL de suspensión de 1×10^6 esporas por mL (20,000 esporas) de cada hongo en sus respectivos tratamientos. Se evaluó la germinación a las 3, 6, 9, 12,15 y 24 h (los datos son adimensionales, ya que fueron obtenidos del análisis del área bajo la curva del progreso del porcentaje de germinación) empleando microscopio compuesto (Nikon Eclipse E400® EE.UU.). Una espora fue considerada germinada cuando el largo de su tubo germinativo alcanzó la mitad del diámetro de la espora.

5.9 Efecto antifúngico *in vivo* del jugo de *S. compositum* en *B. cinerea*

Los doce tratamientos, se prepararon en suspensiones de agua-agar (1 %). Para la inoculación, se cosecharon rosas de las variedades “Polar star” y “Proud” las cuales fueron cosechadas de un invernadero comercial local y se transportaron al laboratorio. Discos de 1 cm de diámetro fueron tomados del centro de los pétalos utilizando un sacabocados. Los discos de pétalos se enjuagaron suavemente con agua deionizada, se colocaron en agua-agar (1%) con o sin jugo de *S. compositum*, de tal manera que los pétalos de rosa se empaparan por ambos lados de la suspensión. Los pétalos se colocaron cuidadosamente en PDA que contenía concentraciones de jugo de *S. compositum*, y luego la suspensión de conidios (2 μ L, 10^6 conidios/ mL= 2000 conidios) se colocó en el centro de cada pétalo con el fin de determinar el efecto del jugo *S. compositum* sobre la infección del hongo. De esta manera se aseguró la distribución uniforme del jugo alrededor de los conidios. Se utilizó agua-agar y Switch[®] a la misma concentración de conidios en pétalos como control positivo y negativo, respectivamente. Posterior a la inoculación, las cajas de Petri se transfirieron inmediatamente a 23 °C. Después de 24, 48 y 72 h, los resultados de la infección se hicieron mediante registro fotográfico y diámetro de infección del hongo en el pétalo.

5.10 Análisis estadístico

Con el fin de corroborar que se cumplieran los supuestos estadísticos de los datos obtenidos, se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza. Posteriormente los análisis de varianza y pruebas de separación múltiple de medias (Tukey, $\alpha= 0.05$) así como el análisis de regresión lineal para determinar la concentración y dosis (*in vitro*) letal 50 (CL₅₀) se aplicó el Probit con Statical Analysis System, versión 9.1 para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

VI. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

6.1 Morfología y características de *Botrytis cinerea*

En medio de cultivo PDA, la colonia de *Botrytis* tuvo micelio denso, color de blanco a café y tasa de crecimiento micelial de 7.84 a 26.7 mm día⁻¹ (media= 22.5 mm día⁻¹) (Figura 1; Cuadro 3). El crecimiento de la colonia cultivada en PDA es similar a lo obtenido por Tanović *et al.* (2009) quienes tuvieron rangos de crecimiento de 7.3-26.7 mm día⁻¹ y media de 25 mm día⁻¹, Ferrada *et al.* (2016) obtuvieron tasas de crecimiento de 27.4± 1.1 mm día⁻¹ para *B. cinerea*.

Los conidios presentaron tamaño promedio de 8.83 -15.88 x 5.09-9.75 µm estos caracteres morfológicos son similares con los reportados por Saito *et al.* (2016) con 6.0-14 x 4.5-10.0 µm, y con Zhou *et al.*, (2014) con 5.6-15.7 x 4.2-11.2 µm y Walker *et al.*, (2011) con 8-13 x 5-6.5 µm para *B. cinerea*.

Cuadro 3. Características morfológicas de *Botrytis* sp.

Aislado	Colonia		Conidio (n=50)		
	Color	TC ^a (mm día ⁻¹)	Longitud (µm) media(min-max)	Ancho (µm) media(min-max)	Forma
<i>Botrytis</i>	café	22.5	11.18 (8.83-15.88)	7.91 (5.09-9.75)	Ovalado

TC^a= Tasa de crecimiento micelial (incubación 23 °C en oscuridad continua) en medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar).

Botrytis sp. presentó conidios de hialinos a marrón pálido, de forma elíptica a ovoide con superficie gruesa, variable en tamaño. Los caracteres morfológicos de las estructuras de reproducción asexual y de la colonia registrada en este trabajo sirvieron para distinguir las diferentes especies de *Botrytis* (Figura 1). Lo anterior coincidió con lo reportado por Ferrada *et al.* (2016) y Lorenzini *et al.* (2014), quienes indican que *B. cinerea* comprende especies distinguibles morfológicamente; sin embargo, se realizó el análisis molecular para identificar la especie de este complejo. Además, Beever *et al.* (2007) indican que los caracteres morfológicos de la especie de *Botrytis* varían diferentes condiciones de incubación

(medio de cultivo, luz, humedad relativa y temperatura) o por el continuo proceso de transferencia y obtención de subcultivo; por ejemplo, Staats *et al.* (2005) construyó una clasificación del género con base en los datos de secuencia de ADN, tomando en cuenta la reproducción sexual y tipo de huésped.

Roy, (2001) investigó que *B. cinerea* no puede ser un hongo de alta especificidad, debido a que observando diversas plantas hospedantes que ocupan hábitats similares y que crecen durante el mismo período del año ofrecen posibilidades de cambio del hospedante, por lo que el patógeno muestra flexibilidad en el uso de diferentes entornos para germinar y obtener nutrientes de la planta huésped (Williamson *et al.*, 2007).

La forma y tamaño de los conidios, así como los caracteres de las colonias, deben usarse con precaución, ya que estos son dependientes de las condiciones de crecimiento Zhou *et al.* (2014) trabajo con setenta y cinco aislamientos de *B. cinerea* y encontró que la temperatura óptima de crecimiento micelial fue de 15-20 °C y 25 °C para la germinación de conidios, mientras que Mirzaei *et al.* (2008) estudiaron la taxonomía de *Botrytis* concluyendo que las características unidas a la especificidad del huésped, y muestran influencia por las condiciones ambientales y culturales, las cuales pueden modificar caracteres taxonómicos, tales como dimensión y forma de los conidios. Jarvis, (1977) manipuló la temperatura y medio de cultivo obteniendo como resultados tamaños y formas conidiales diferentes, los cuales se mostraron como cambios morfológicos irreversibles en el hongo.

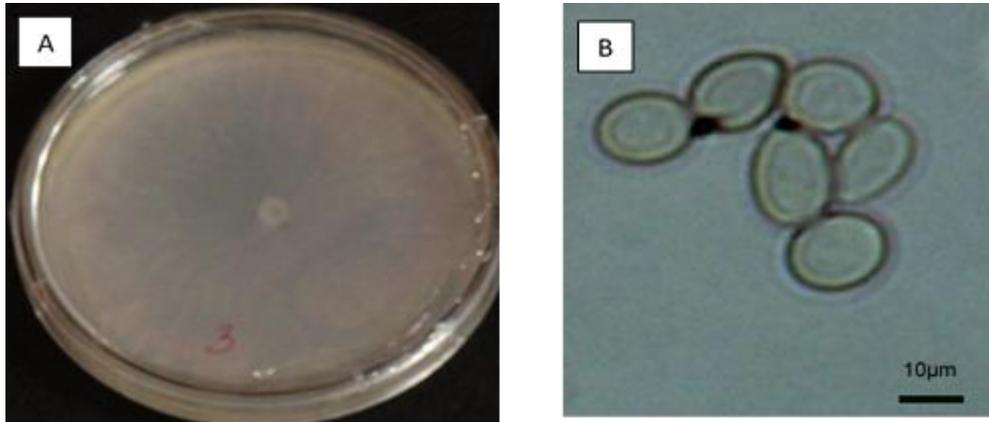


Figura 1. (A) Colonia de *B. cinerea* con cuatro días de crecimiento en medio de cultivo papa-dextrosa- agar (PDA), aisladas de tejidos de *Rosa* sp., con síntomas de moho gris. (B) Conidios de *B. cinerea* formados en medio de cultivo PDA después de 22 días de incubación a 23 °C en obscuridad continúa. Microscopio de luz de campo brillante 40 X.

A pesar de que existe amplia variación en el comportamiento del crecimiento de *Botrytis*, por ejemplo, en la formación de apresorios debido a cambios de temperatura y humedad relativa, en este trabajo las características del patógeno fueron similares a las reportadas por Ma *et al.* (2018) y Kamaruzzaman *et al.* (2018).

6.2 Morfología y caracteres de la colonia de *C. gloeosporioides*

Las características de la colonia del aislado de *C. gloeosporioides* fue proporcionado por la colección de hongos fitopatógenos del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Chapingo, como se muestra en el Cuadro 4.

Cuadro 4. Características morfológicas de *C. gloeosporioides*.

Aislado	Colonia		Conidio (n=50)		
	Color	TC ^a (mm día ⁻¹)	Longitud (µm) media(min-max)	Ancho (µm) media(min-max)	Forma
<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	Gris	11.25	12.71(9.07-16.24)	3.63(2.37-5.03)	Cilíndrica

TC^a= Tasa de crecimiento micelial (incubación 23 °C en oscuridad continua) en medio de cultivo PDA (papa-dextrosa-agar).

En medio de cultivo PDA, la colonia mostró crecimiento denso, blanco tornándose gris oscuro con tasa de crecimiento micelial de 8.45 a 11.76 mm día⁻¹ (media= 11.25 mm día⁻¹) (Figura 2). El crecimiento de la colonia es similar con lo reportado por Sharma *et al.* (2013) cuya colonia creció entre 5.1-13.0 mm día⁻¹ y con Vieira *et al.* (2014) quienes reportan entre 7.47- 12.97 mm día⁻¹.

El aislado presento conidios hialinos, unicelulares, cilíndricos, con los extremos redondeados y con el hilo incospícuo (Figura 2). Asimismo, el intervalo de medias promedio de los conidios del aislado fueron 9.7-16.24 x 2.37-5.03 µm. Estos caracteres morfológicos son similares con los reportados por Sharma *et al.* (2013) con 7.0-18.3 x 3.0-5.7 µm y Vieira *et al.* (2014) con 9.97- 16.44 x 4.14-6.33 µm.

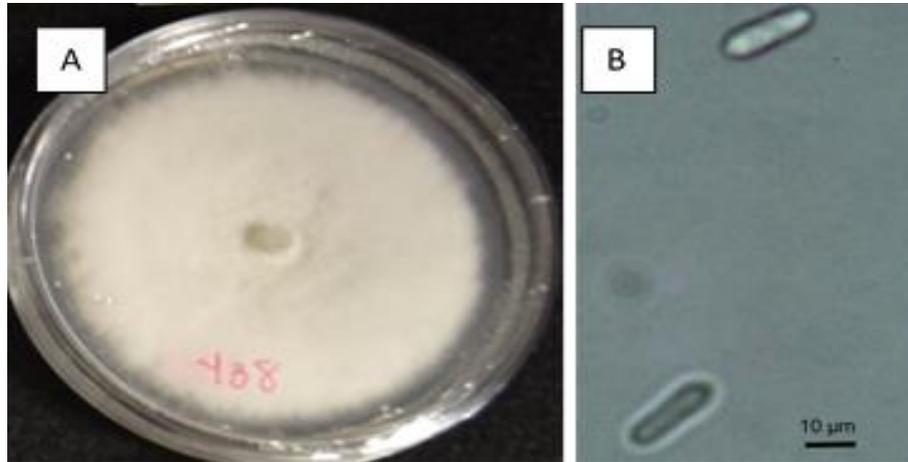


Figura 2. (A) Colonia de *C. gloeosporioides* con ocho días de crecimiento, aislados de tejidos de aguacate con síntomas de antracnosis. (B) Conidios de *C. gloeosporioides* formados en medio PDA después de 10 días de incubación a 23 °C en oscuridad continua. Microscopio de luz de campo brillante (40 X).

El crecimiento de las colonias es variable en PDA, aunque las características fueron similares a las reportadas por Téliz *et al.* (2007) quienes mencionan color blanco grisáceo a gris oscuro, al reverso de color blanco a gris oscureciéndose especialmente con la edad. El micelio aéreo fue liso y fieltro o en mechón asociado con conidióforos. Se ha reportado que los caracteres morfológicos de las colonias, solo son útiles para discriminar a nivel de complejos de *Colletotrichum*, pero no para determinar a nivel de especie dentro de estos (Weir *et al.*, 2012). Udayanga *et al.* (2013) indican que el complejo *C. gloeosporioides* comprende subespecies indistinguibles morfológicamente y es necesario el uso de análisis filogenéticos para detectar las diversas especies crípticas dentro de este complejo.

6.3 Análisis molecular de *Botrytis* sp. y *C. gloeosporioides*

De los hongos caracterizados morfológicamente como *Botrytis* y *Colletotrichum*, se obtuvieron secuencias de la región 5.8 S del RNA ribosomal, con un tamaño de 600 pb (Número de acceso: MK764899) y 597 pb (Número de acceso: MK764900) respectivamente. Al analizarlos con la herramienta BLASTn del NCBI, se encontró 100% de similitud con *Botrytis cinerea* de Morelia, Michoacan (Numero de acceso: MH458885) y 99.82 % para *Colletotrichum gloeosporioides* de Alemania (Numero

de acceso: AJ301907) respectivamente; lo cual soporta la caracterización morfológica.

6.4 Compuestos del jugo de frutos de *S. compositum*

Los frutos de *S. compositum* tienen 87.17 % de agua y 12.83 % de materia seca, con rendimiento de jugo menor al 80 %, previamente centrifugado, a fin de eliminar las saponinas y otros residuos que impedían la obtención de jugo claro (Cuadro 5).

Cuadro 5. Contenido medio de compuestos fenólicos, flavonoides y cucurbitacinas en jugo de frutos de *S. compositum* sin tratamiento y con **tratamiento UV-C**.

Compuestos fenólicos (mg kg ⁻¹)		Flavonoides (mg kg ⁻¹)		Cucurbitacinas (mg kg ⁻¹)	
Ac. gálico	115.72	Rutina	62.70	Cucurbitacina D	2.50
	115.40		54.93		19.49
Ac. clorogénico	452.68	florizina	85.45	Cucurbitacina I	861.69
	451.66		132.64		847.58
Ac. siríngico	12.72	mirecetina	145.82	Cucurbitacina B	0.94
	12.60		163.51		0.34
Ac. vainílico	19.33	quercitina	15.37	Cucurbitacina E	7.62
	18.51		19.02		7.42
Ac. <i>p</i> -hidroxibenzóico	36.01	naringenina	137.61		
	34.77		172.66		
Ac. caféico	80.45	floretina	25.44		
	78.65		30.61		
Ac. ferúlico	0.0	galangina	4.08		
	0.0		4.45		
Ac. <i>p</i> -cumárico	19.38	Total	476.47		
	19.23	flavonoides	577.82		

En el cuadro 5, las cucurbitacinas son el grupo más importante en la composición del jugo, estos compuestos son triterpenos tetracíclicos, altamente oxigenados que mayormente se presentan como glucósidos. Son sustancias tóxicas debido a su sabor amargo, que se dividen en 12 grupos, desde cucurbitacina A hasta cucurbitacina T (Soto-Hernández *et al.*, 2009) (Figura 3). Las cucurbitacinas más importantes son la E, B, D, e I. Las cucurbitacinas E y D resultan de la acetilación de la I y D, una característica que aumenta hidrofobicidad y citotoxicidad (Shi *et*

al., 2006; Wu *et al.*, 2004). Las cucurbitacinas E, e I difieren respectivamente, de la B y D por la presencia del doble enlace entre C1 y C2 que aumentan tanto la hidrofobicidad y toxicidad (Bartalis *et al.*, 2005).

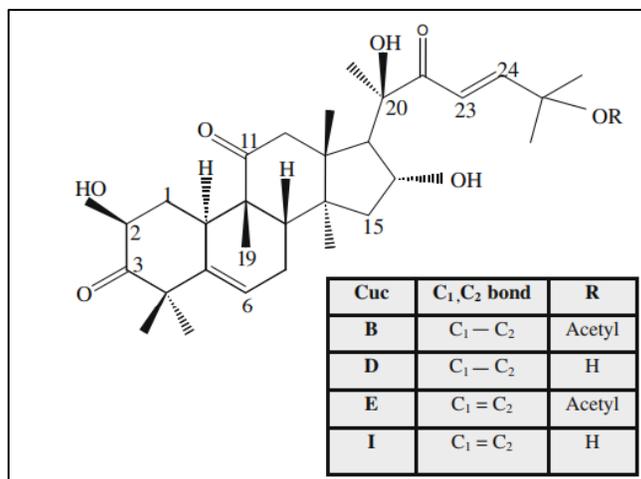


Figura 3. Estructura química de las cucurbitacinas B, D, E, e I.

Las concentraciones de cucurbitacinas descritas para *S. edule var. nigrum spinosum* fueron la D, I y B (0.127, 0.013 y 1.008 mg g⁻¹ de extracto respectivamente (Aguñiga-Sánchez, 2015), mientras que para el tipo de chayote *S. edule var. nigrum minor cv. Perla Negra®* las concentraciones de cucurbitacinas fueron de 0.00137, 0.00935, 0.0098 y 0.0040 mg g⁻¹ para la D, I, B y E respectivamente (Salazar-Aguilar *et al.*, 2017). Se puede observar que para *S. compositum*, el contenido de cucurbitacina I es sobresaliente, mientras que en la concentración de cucurbitacina D, B y E son menores. Debido a su toxicidad se ha atribuido a las cucurbitacinas de los tipos B, D, e I del genero *Sechium* actividad citotóxica y antitumoral (Setzer *et al.*, 2003; Cadena-Iñiguez *et al.*, 2011; Aguiñiga-Sánchez *et al.*, 2015).

Aguñiga-Sánchez *et al.* (2015), reportaron para frutos de chayote de *S. edule var. nigrum spinosum* la presencia de flavonoides como: florizidina, naringenina, fletina y apigenina en concentraciones de 0.005, 1.556, 0.018 y 0.290 mg g⁻¹, mientras que en el híbrido de chayote H-387®, se identificó rutina, florizidina, mirecetina, quercetina, naringenina, fletina, galangina y apigenina con concentraciones de 1.273, 0.0168, 0.889, 0.005, 3.304, 4.616, 21.940 y 0.362 mg

g⁻¹ de extracto, respectivamente. Otro cultivar importante de *S. edule*, Perla Negra®, registró contenidos de rutina, miricetina, quercetina, naringenina, floretina, galangina y apigenina con concentraciones de 0.00034, 0.00185, 0.00025, 0.00226, 0.00472, 0.00043 y 0.00018 mg g⁻¹ (Salazar-Aguilar *et al.*, 2017).

Al compararlos con el jugo de *S. compositum*, se observó que tiene mayor diversidad y concentración de flavonoides en los frutos, esto es relevante debido a que los flavonoides presentan actividad antioxidante y antibacteriana por la acción de la apigenina, galangina, flavona y gluconidos de flavonol, isoflavonas, flavanonas y chalconas, que poseen actividad antibacteriana, la cual se atribuye a interacciones moleculares que inducen la inactivación de proteínas microbianas, como las adhesinas o proteínas de transporte de membrana, alterando la permeabilidad e interfiriendo con el crecimiento celular (Cardona *et al.*, 2013; Kumar *et al.*, 2013). En cuanto la actividad antioxidante los mecanismos pueden incluir la supresión de la formación de ROS (por inhibición de enzimas o por quelación de elementos traza involucrados en la generación de radicales libres), barrido de ROS y regulación positiva o protección de las defensas antioxidante (Mishra *et al.*, 1994; Halliwell *et al.*, 1998).

La acción de los flavonoides involucra la mayoría de los mecanismos mencionados anteriormente, la quercetina en particular es conocida por sus propiedades quelantes y de estabilización del hierro, además de la quercitina y naringenina, reoportadas como antioxidantes altamente efectivos en atrapar especies reactivas al oxígeno (ERO) (Van-Kan *et al.*, 1997).

Con relación a los compuestos fenólicos, se ha reportado que los frutos de chayote *S. edule var. nigrum spinosum* se identificaron al ácido gálico, clorogénico, vainíllico, *p*-hidroxibenzoico, caféico y *p*-cumarínico (0.072, 0.823, 0.032, 0.020, 0.091 y 0.032 mg g⁻¹ de extracto, respectivamente), mientras que para el híbrido H-387 descritas con la presencia de ácido gálico, clorogénico, siringico, vainíllico, *p*-hidroxibenzoico, cafeico, ferúlico y *p*-cumarínico por Aguiñiga-Sánchez *et al.* (2015), evidencian que *S. compositum* tiene mayor

concentración de ácidos fenólicos, para quienes se ha descrito actividad antioxidante (Muñoz-Jáuregui *et al.*, 2007). Los compuestos fenólicos tienen actividad antifúngica, al ser de bajo peso molecular, pueden difundirse a través de la membrana del microorganismo, y penetrar en la célula, interfiriendo en las rutas metabólicas para inhibir la biosíntesis de ergosterol, glucano, quitina, proteínas y glucosaminas en hongos (Ansari *et al.*, 2013).

6.5 Efectividad del jugo de frutos de *S. compositum* sobre el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*

Se observó efecto inhibitorio *in vitro* de *B. cinerea* con el jugo de *S. compositum*. A las 24 h después de la inoculación del patógeno en el medio PDA no hubo crecimiento de las colonias en todas las concentraciones de jugo evaluadas, con excepción del tratamiento testigo; sin embargo, a las 48 h, en concentraciones bajas de jugo (1.0, 2.5 y 5.0 %) el hongo presentó crecimiento (Figuras 4 y 5). El medio con 5% de jugo tuvo control del 94.87 %, a 2.5 % de jugo la inhibición fue del 90% y a 1% se logró inhibición del 83.15 %, mientras que el testigo químico Switch® (ciprodinil + fludioxonil) inhibió 86 %, 4 d después de inoculación. El análisis estadístico mostró que el tratamiento con 1 % de jugo y químico no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, las cajas con concentraciones mayores (7.5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40 %), no presentaron crecimiento del hongo durante la evaluación.

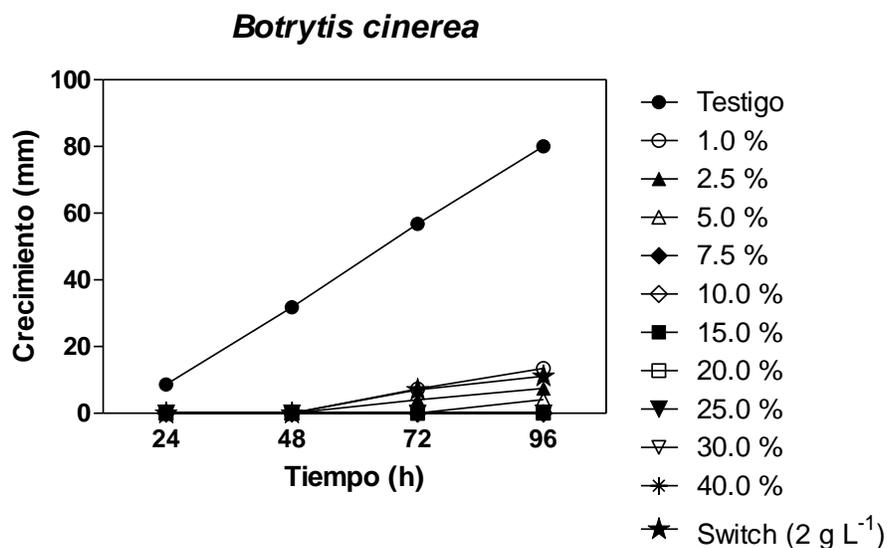


Figura 4. Crecimiento micelial de *B. cinerea* en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) con diferentes concentraciones de jugo de frutos de *S. compositum* y fungicida químico Swicht® (ciprodinil + fludioxonil).

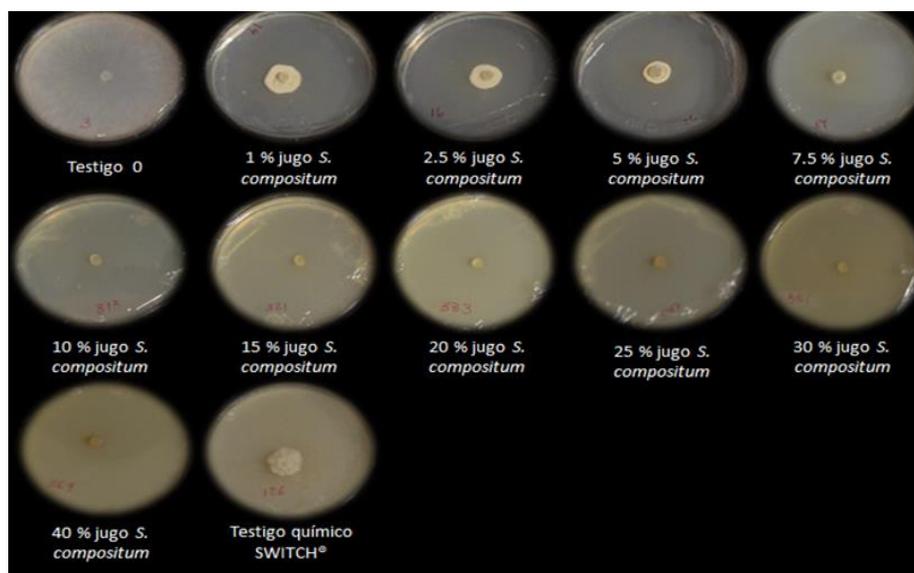


Figura 5. Crecimiento micelial de las colonias de *B. cinerea* en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) a diferentes concentraciones de jugo de frutos de *S. compositum* y con fungicida químico Swicht® (ciprodinil + fludioxonil) 4 días después de inoculación.

Es interesante notar que el crecimiento del hongo en las concentraciones bajas de jugo se presentó solo en la porción de PDA que se colocó en el medio con el jugo, y cuyo crecimiento fue ascendente, con consistencia esponjosa, y poco crecimiento lateral, como si tratase de evitar el contacto con el medio, diferente al testigo absoluto, cuyo crecimiento se presentó en toda la superficie del medio, con la formación de micelio; mientras que en aquellas cajas con jugo de chayote a bajas concentraciones el micelio creció de forma compacta con esporulación adelantada, como respuesta a la toxicidad del medio, atribuyéndose el efecto a la presencia de cucurbitacinas, siendo las del tipo E, e I las de mayor concentración en el jugo de frutos de *S. compositum*.

De acuerdo con Metcalf *et al.* (1982), frutos de *Cucurbita foetidissima* HBK, contienen alta concentración de cucurbitacinas E, e I en fruto fresco, con 360 mg kg⁻¹ y 1590 mg kg⁻¹ respectivamente, Rangel-Guerrero *et al.* 2018 evaluaron el efecto inhibitorio de extractos de frutos de *C. foetidissima* de diferentes procedencias geograficas, en el crecimiento *in vitro* de *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*, los resultados mostraron mayor efecto inhibitorio de los extractos en *R. solani* (94.3 – 100 %), y *Botrytis* sp. (42 - 100 %), sin efecto inhibitorio significativo en *Fusarium* sp. y *P. capsici*. El efecto inhibitorio se puede atribuir a que *C. foetidissima* contiene además de cucurbitacinas, flavonoides y compuestos fenólicos. La variación en los resultados, se atribuyó a la procedencia de los frutos y el efecto que ejerce el ambiente en la síntesis de compuestos del metabolismo secundario.

Bar-Nun *et al.* (1990) aplicaron cucurbitacina I (0.01 %) a frutos de pepino (*Cucumis lattu*s) y hojas de repollo (*Brassica oleracea*) previo a la inoculación con *B. cinerea*, registrando que ésta previno la infección del tejido, observando que el crecimiento del hongo estuvo restringido al sitio de la infección lo que sugiere la capacidad de la cucurbitacina I para inhibir la acción de la lacasa producida por *B. cinerea*, y proteger al tejido vegetal. Además, Bar-Nun *et al.* (1989) evaluaron que las cucurbitacinas I, y D inhibieron la formación de lacasa extracelular en *B. cinerea* que implica mecanismos de ataque de este patógeno para invadir al

huésped. El patógeno ataca a través de la producción de enzimas de desintoxicación, como la lacasa, protegiendo a *Botrytis* de las secreciones del huésped, pero cuando la lacasa no está activa, la capacidad patógena de *Botrytis* se reduce (Staples *et al.*, 1995).

Switch® es el fungicida químico a base de ciprodinil (sistémico) y fludioxonil (no sistémico). El cyprodinil es absorbido por los tejidos de la planta y transportado por el xilema via acropétala, inhibiendo la penetración y crecimiento micelial del hongo tanto dentro del tejido como en la superficie foliar; por su parte el fludioxonil inhibe también el crecimiento micelial del hongo en la superficie de la hoja con modo de acción diferente. Los estudios bioquímicos indican que ciprodinil afecta la síntesis de metionina y la secreción de enzimas hidrolíticas de las células de los hongos, mientras que el fludioxonil inhibe una proteína kinasa involucrada potencialmente en la ruta de transducción de la señal de osmo sensibilidad en los hongos (Syngenta, 2019). Sin embargo, al igual que la cepa que creció en medio con altas concentraciones de jugo de *S. compositum*, el fungicida químico mostró efecto fungistático, ya que, al tomar micelio de ambos medios, y colocarlo en medio de PDA, el crecimiento fue normal.

Cuadro 6. Porcentaje de inhibición (96 h de inoculación) y germinación (5 h de inoculación) *in vitro* de *B. cinerea* en medio con diferentes concentraciones de jugo de *S. compositum*.

Parámetros	Concentración	Inhibición	Germinación
		%	
Jugo de <i>S. compositum</i>	1	83.153 ^d	0 ^c
	2.5	90.690 ^c	0 ^c
	5	94.878 ^b	0 ^c
	7.5	100 ^a	0 ^c
	10	100 ^a	0 ^c
	15	100 ^a	0 ^c
	20	100 ^a	0 ^c
	25	100 ^a	0 ^c
	30	100 ^a	0 ^c
	40	100 ^a	0 ^c
Testigo absoluto (solo PDA)	0	0 ^e	100 ^a
Testigo químico (PDA + Ciprodinil + Fludioxonil (SWITCH [®]))	2 g L ⁻¹	86.058 ^d	32.333 ^b
<i>p</i> -valor		<0.0001	<0.0001
<i>R</i> ²		0.994523	0.999560
DL ₅₀		0.30710	

*DMS: Diferencia mínima significativa; letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$). DL₅₀: Dosis letal 50

Los resultados de la prueba de germinación mostraron que, en las cajas del testigo absoluto, se inició la germinación de conidios a las tres horas y a la 5^a hora el 100 % de los conidios habían germinado. A las 48 h, solo en las concentraciones de 1.0, 2.5 y 5.0%, presentaron germinación de conidios, con valores de 53.0, 32.0 y 18.0%, respectivamente.

Las cajas con concentraciones mayores de jugo (7.5 a 40%), no presentaron germinación durante el tiempo de evaluación. En contraste, las cajas con fungicida químico Switch[®] (ciprodinil + fludioxonil) presentaron germinación de conidios a las

cuatro horas de inicio del experimento, hasta que a las 24 h alcanzaron 100 % de esporas germinadas. Cotoras *et al.* (2004) evaluaron el efecto de dos diterpenoides (ácido 3 β -hidroxi kaurenico y ácido kaurenico) ($40 \mu\text{g mL}^{-1}$) en la germinación de *B. cinerea* registrando que estos compuestos retrasaron la germinación de conidios (Figura 6).

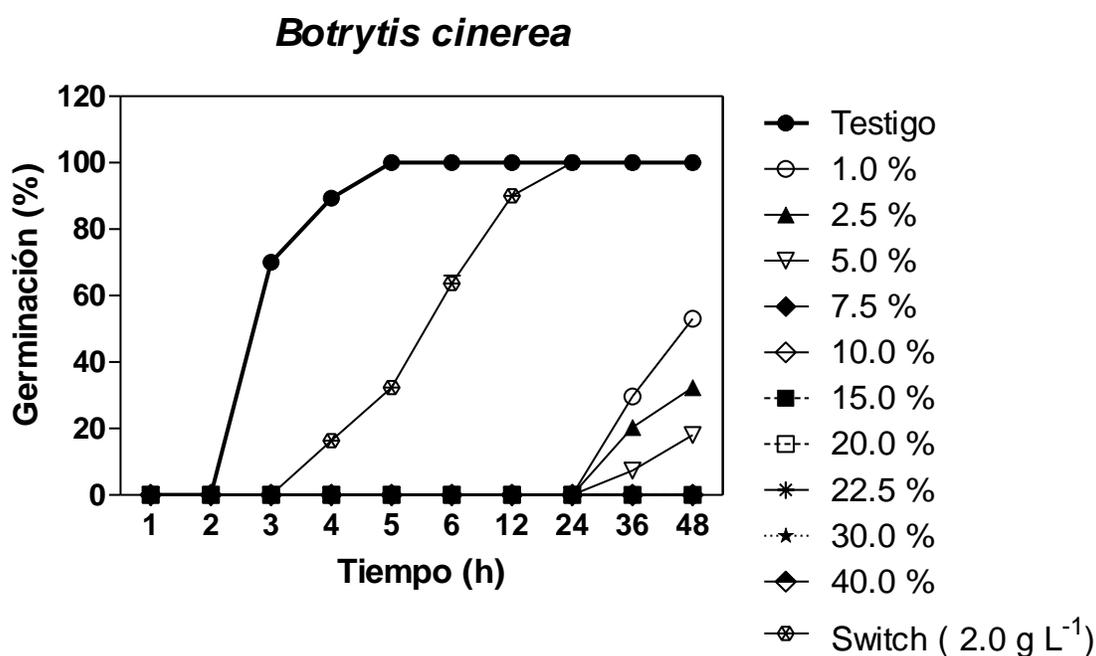


Figura 6. Porcentaje de germinación de conidios de *B. cinerea* en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) en presencia de jugo de frutos de *S. compositum* a diferentes concentraciones y testigo químico Switch® (ciprodinil + fludioxonil).

Se ha mencionado que las plantas al ser atacadas por los patógenos biosintetizan compuestos de defensa que inhiben la producción de cutinasas y lacasas de los hongos. En *Monilinia fructicola*, la producción de cutinasa se inhibió con la presencia de ácidos fenólicos (ácido clorogénico y caféico). El ácido caféico con concentraciones de 1 mM ha mostrado que reduce la producción de cutinasa en medio líquido de *B. cinerea* (Bostock *et al.*, 1999). Además, Gonen *et al.* (1996) encontraron que la cantidad de mRNA codificada para lacasa, se reprime drásticamente en *B. cinerea* por la presencia de cucurbitacinas D. Por lo anterior y considerando que el jugo de frutos de *S. compositum* es rico en compuestos

fenólicos, flavonoides y cucurbitacinas, explica el efecto inhibitorio en la germinación de conidios de *B. cinerea*.

6.6 Efectividad del jugo de frutos de *S. compositum* en el crecimiento *in vivo* de *B. cinerea*

Los pétalos de rosa del cv. Proud fueron inoculados con 2 μ L de *B. cinerea* (10^6) y después de 3 d se observó un cambio en el color del pétalo tornándose más oscuro con relación al testigo absoluto. El crecimiento de *B. cinerea* a las 24 h se manifestó como oxidación en el área donde fue colocado el inóculo, a las 48 h el diámetro de la infección aumentó invadiendo mayor superficie del pétalo. Los cambios más drásticos se presentaron a las 72 h donde en el testigo absoluto, 30 % y 40 % de jugo, mostraron daño por oxidación en todo el pétalo. Mientras que con 20 y 25 % de jugo tuvieron 40 % de daño, pero se manifestó con apariencia seca en el área de la infección evitando que se expandiera al resto del pétalo. Las concentraciones de 1.0 a 15.0 % tuvieron daño entre 50 % y 60 % del pétalo, en estos tratamientos el área infectada presentó degradación del tejido. Mientras que, el testigo químico presentó 85 % de daño en el pétalo, tenía coloración café oscura en el área invadida por el hongo y apariencia seca (Figura 7).



Figura 7. Apariencia de pétalos de Rosas “Proud” 72 h después de inoculación con *B. cinerea*, co-cultivadas en diferentes concentraciones de jugo de *S. compositum* mezclado con PDA.

Con relación al efecto de la inoculación de *B. cinerea* en pétalos de rosa cv. Polar star, se observó que al contacto con el jugo de *S. compositum*, los pétalos se tornaron oscuros (Figura 8). Después de las 24 h se observó coloración café oscura en el área donde fue colocado el inoculo, presentando más de 30% de daño, a las 48 h los diámetros de la infección aumentaron invadiendo mayor superficie.

Los cambios más notables se observaron a las 72 h, las concentraciones más altas (30 y 40%) y más bajas (1 a 10 %) de jugo de *S. compositum* presentaron daño (pudrición) en los discos de pétalo de 50 a 100%. Los tratamientos de 15, 20 y 25% de jugo presentaron daños aproximadamente del 45 %, con deshidratación en el área infectada evitando que ésta se expandiera al resto del pétalo. El tratamiento químico mostró de igual forma apariencia seca en el pétalo, pero mayor oxidación.

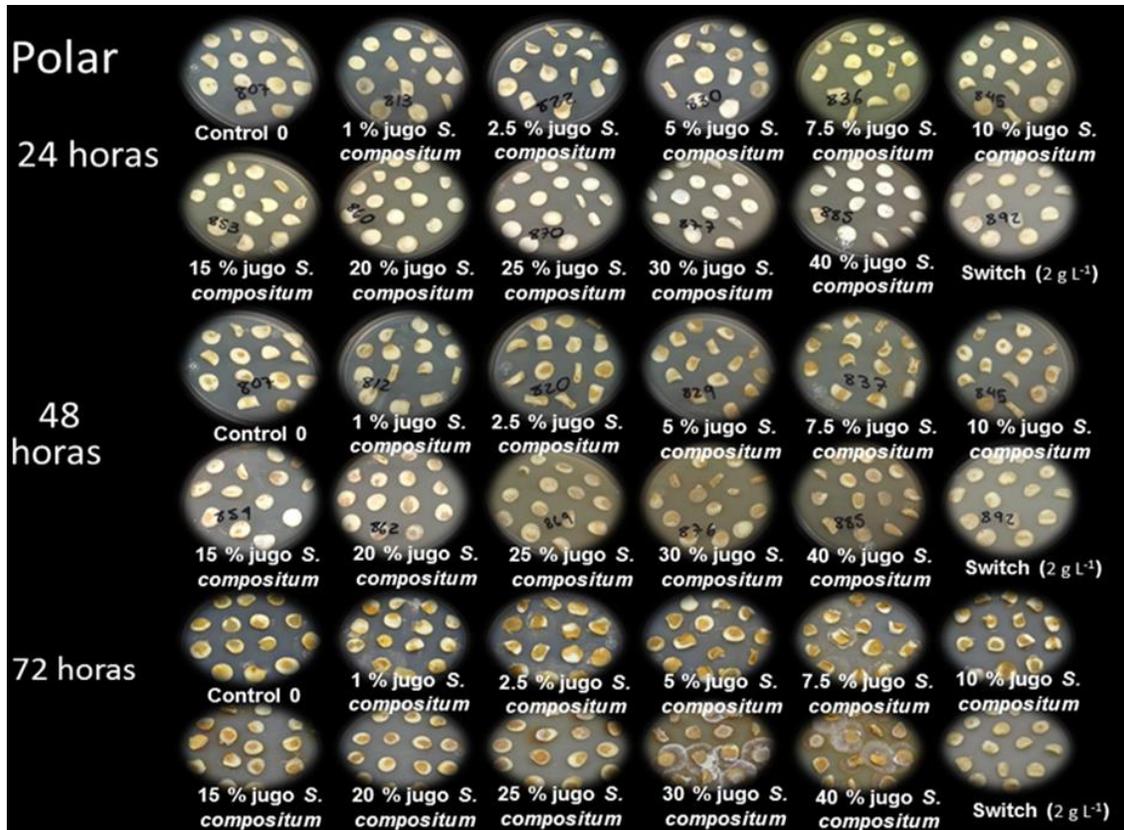


Figura 8. Apariencia de pétalos de Rosas “Polar star”, 72 h después de inoculación con *B. cinerea*, co-cultivadas en diferentes concentraciones de jugo de *S. compositum* mezclado con PDA.

Cuadro 7. Daño en pétalo de rosa inoculada con *B. cinerea*, con la presencia de diferentes concentraciones de jugo de *S. compositum* a las 72 h.

Variedad de rosa	Concentración jugo de <i>S. compositum</i> (%)	Daño en el pétalo (%)
PROUD	0	100 ^a
	1	57.86 ^c
	2.5	51.43 ^{dc}
	5	60.71 ^c
	7.5	51.43 ^{dc}
	10	50.71 ^{dc}
	15	53.57 ^{dc}
	20	41.43 ^d
	25	42.14 ^d
	30	85.00 ^b
	40	90.00 ^{ab}
	SWITCH®(Ciprodinil + Fludioxonil)	85.71 ^{ab}
POLAR	0	100 ^a
	1	59.29 ^{def}
	2.5	71.43 ^{bc}
	5	64.29 ^{cde}
	7.5	68.57 ^{bcd}
	10	54.29 ^{efg}
	15	48.57 ^{fgh}
	20	45.00 ^h
	25	42.14 ^h
	30	99.29 ^a
	40	98.57 ^a
	SWITCH®(Ciprodinil + Fludioxonil)	79.29 ^b

*DMS: Diferencia mínima significativa; letras diferentes en la misma columna indican diferencia estadísticamente significativa ($P \leq 0.05$).

6.7 Efectividad del jugo de frutos de *S. compositum* en el crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides*

El crecimiento de la cepa de *C. gloeosporioides in vitro*, se inhibió con la presencia del jugo. A las primeras 24 h las cajas con 2 y 4 % de jugo presentaron crecimiento de forma ascendente hasta cubrir totalmente la porción de medio de cultivo inoculado creciendo en forma cilíndrica y abultada, como si tratase de evitar el contacto con la superficie del medio, logrando inhibición de 41 y 50 % respectivamente al final de la evaluación (8 d después de la inoculación). Por el contrario, el crecimiento del hongo en el medio testigo fue diferente ya que solo había micelio, mientras que en los medios con 2 y 4 % de jugo, la coloración del micelio fue grisácea lo que indica cierta esporulación, y crecimiento acelerado del hongo, resultado del rechazo de este hacia el medio. Los tratamientos con 7.5-52.5 % de jugo, después de 24 h, tuvieron crecimiento ascendente, en la porción del medio que contenía el hongo (Figuras 9 y 10). En los días posteriores, para las concentraciones de 7.5 a 37.5% el hongo se limitó a crecer en el medio del inoculo, presentando coloración grisácea del micelio, cuando el medio base del inoculo fue cubierto por completo, empezó a descender hacia la superficie del medio que contenía la caja de tal manera que lo rompió, tratando de evitar el contacto con este. En dichos tratamientos se logró inhibir más de 70 %, el mismo porcentaje de inhibición se logró en el medio con 45 y 52.5 % de jugo (Cuadro 6).

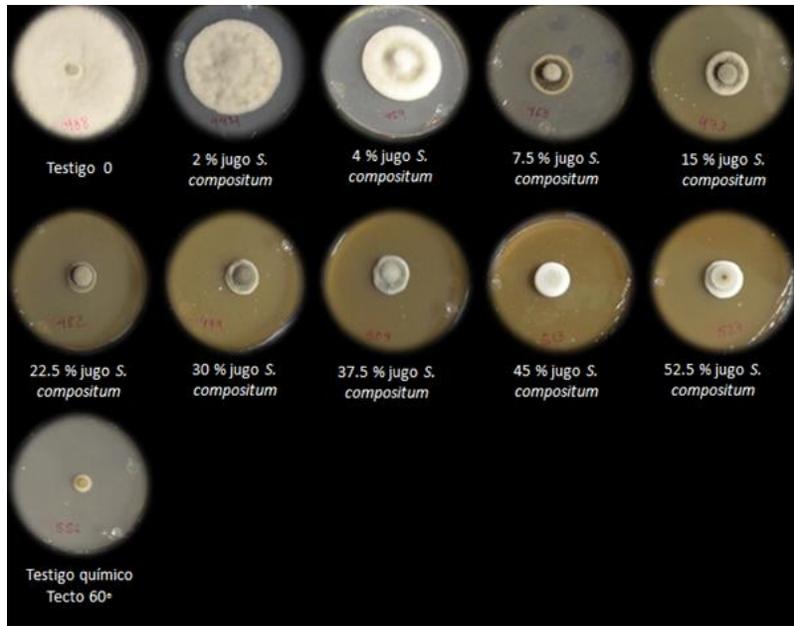


Figura 9. Crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* con ocho días de crecimiento en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA).

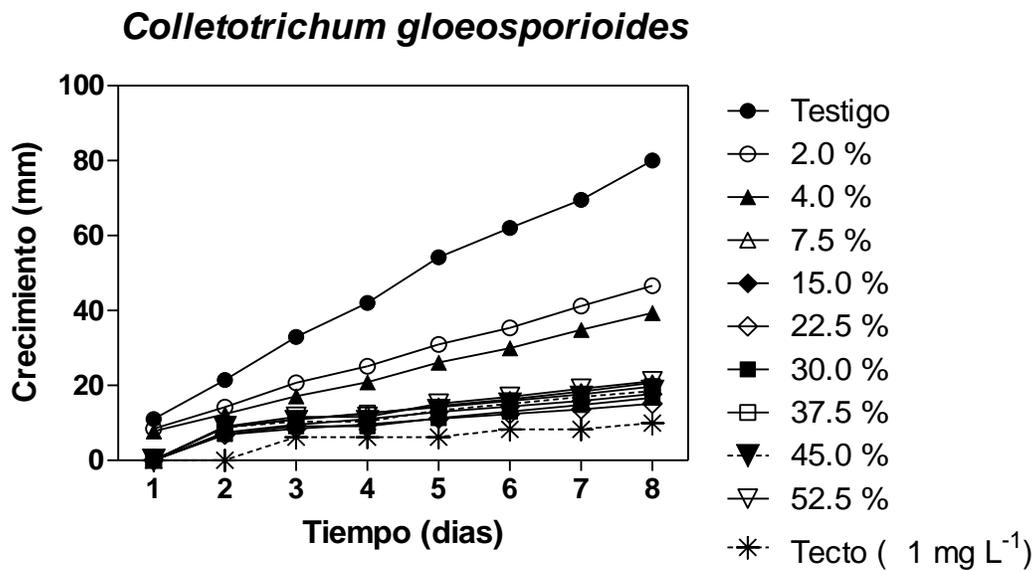


Figura 10. Curvas de crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA).

Song *et al.* (2011) evaluaron raíces de *Astilbe myriantha* Diels que mostró > 68% de inhibición a 100 mg mL⁻¹ después de 72 h, contra *C. gloeosporioides*, el fraccionamiento del extracto etanólico mostró que de 7 triterpenos el ácido 3b, 6b, 24-trihidroxiurs-12-en-27-oico, tuvo actividad inhibitoria de mayor espectro, al probarse contra *Rizopus solani*, *Fusarium oxysporum* f. sp. Niveum, *F. oxysporum* f. sp. Cubens, *C. gloeosporioides*, *Penicillium citrinum*, *C. lagenarium* y *P. digitatum* resultaron con una DL₅₀ de 13.9 a 34 µg mL⁻¹. Dentro de los triterpenos aquellos que poseen grupos hidroxilo en C-6 y C-24 y grupo funcional carboxílico C-27 poseen cierta actividad contra hongos patógenos.

Matias *et al.* (2018) evaluaron el potencial fungicida del extracto vegetal de *Richardia brasiliensis* y sus fracciones en donde obtuvieron una mezcla de triterpenos que contenía el ácido oleanolico. Este triterpeno presenta actividad fungicida ya que tiene un esqueleto lipofílico básico, que facilita la ruptura de la pared celular y el paso de los constituyentes presentes en el extracto, y como resultado obtuvieron que las fracciones puras proporcionaron reducción del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*, con 160 µg 100 mL⁻¹; y para *Lasiodiplodia theobromae*, una fracción pura del extracto etanólico registro efecto inhibitorio a 80 µg 100 mL⁻¹.

Dooh *et al.* (2014), probaron las propiedades antifungicas de cinco extractos de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum contra cinco cepas de *C. gloeosporioides* en diferentes concentraciones (6.25, 12.5 y 25 µL mL⁻¹) sobre yuca (*Manihot esculenta* Crantz), mostrando inhibición de entre 11.9 % y 93. %, atribuyendo el efecto a la presencia de cumarinas, fenoles, alcaloides, terpenos, esteroides y flavonoides de los extractos acuosos.

La lacasa (*p*-difenol: oxidorreductasa de oxígeno; EC 1.10.3.2), es una enzima extracelular producida por algunos hongos, que contiene cobre y cataliza la oxidación de sustratos fenólicos. Guetsky *et al.* (2005) reportaron que en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides*, la lacasa regula el nivel de epicatequina (compuesto antifúngico), y junto con la reducción de dienos, permiten

la activación de la infección quiescente del hongo durante el proceso de maduración en frutos de aguacate. El papel de la lacasa incluye la desintoxicación de fitoalexinas y otros compuestos fenólicos de plantas, además de proteger al hongo contra compuestos oxidativos que genera el huésped (Breuil *et al.*, 1999).

Las cucurbitacinas son compuestos que han probado reprimir la producción de lacasa tanto intracelular como extracelular en *B. cinerea* infectado en pepino (*Cucumis pepo* L.), además de que se ha registrado que alteran la movilidad electroforética de la lacasa extracelular (Bar-Nun *et al.*, 1990; Viterbo *et al.*, 1994).

Las plantas son ricas en diversas sustancias con potencial fungitoxico que, en comparación con los fungicidas sintéticos, son prácticamente inocuos para el ambiente. Según Agrios (1997), los compuestos fenólicos, flavonoides y triterpenos inhiben las enzimas hidrolíticas de los hongos y desarrollan la resistencia de los tejidos de las plantas jóvenes al ataque de los fitopatógenos. Zuanazzi *et al.* (2004); y Cushnie *et al.* (2005) indican que estos compuestos pueden causar cambios metabólicos en patógenos fúngicos, actuando en la inhibición de la síntesis de ácido nucleico, permeabilidad de la membrana y metabolismo energético.

El jugo de frutos de *S. compositum* utilizado en este trabajo presento actividad fungistática, lo cual pudo estar determinado por la presencia de diferentes metabolitos secundarios. En el análisis fitoquímico del jugo se detectó la presencia de cucurbitacinas principalmente. Este trabajo pone de manifiesto que al menos para *C. gloeosporioides*, el efecto del jugo fue fungistático, sin embargo, no hay reportes de actividad fungicida de estos compuestos, por lo que es necesario evaluar el efecto por separado de las moléculas presentes, lo cual serviría para definir que molécula es la que ejerce efecto en el hongo.

En la prueba de germinación de esporas, el testigo inició a las 3 h y alcanzó 100 % a las 5 h, mientras que el medio con 2 y 4% de jugo, la germinación empezó a las 4 h y creció exponencialmente hasta las 24 h, donde alcanzó 100 %. Mientras que los tratamientos con 7.5 a 37.5% de jugo empezó a las 6 h, los de 45 y 52.5% de jugo, empezó a las 12 h, pero a las 24 h todos los tratamientos alcanzaron 100%.

El testigo químico Tiabendazol (Tecto 60[®]) inició la germinación a las 12 h, y a las 24 h alcanzó 67 % (Figura 11).

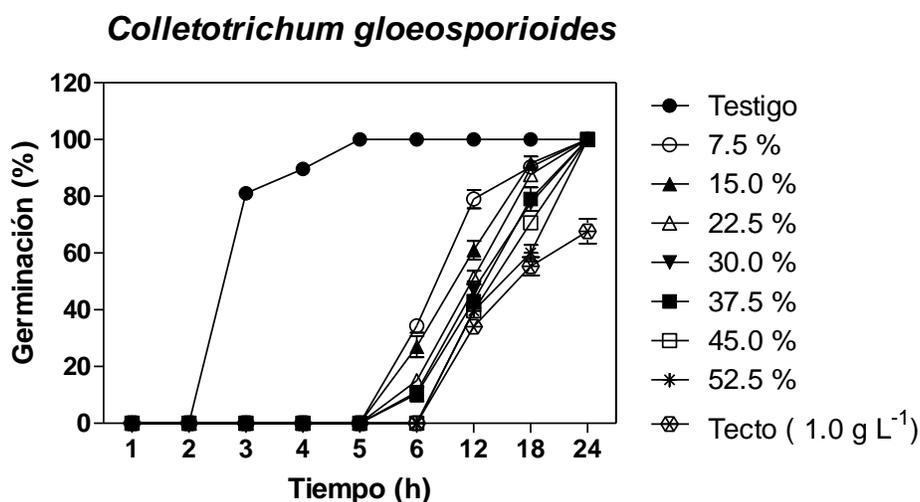


Figura 11. Porcentaje de germinación de conidios de *C. gloeosporioides* en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) en presencia de jugo de frutos de *S. compositum* a diferentes concentraciones y testigo químico Tecto[®] (tiabendazol).

Achraf *et al.* (2012) evaluaron la efectividad del extracto acuoso de *Asphodelus tenuifolius* y *Zygophyllum album* L., en la inhibición de la germinación de *Penicillium expansum* logrando 95.48 % y 93.82 %. El estudio fitoquímico mostró que ambas plantas son ricas en taninos y mostraron la presencia de saponinas, flavonoides, esteroides, esteroides insaturados y terpenos, mientras que los cardenólidos y alcaloides se encontraron solo en *Z. album*.

De la misma forma Dooh *et al.* (2014) reportaron que el extracto de *Thevetia peruviana* (Pers.) K. Schum en diferentes concentraciones (6.25, 12.5 y 25 $\mu\text{L mL}^{-1}$) inhibió 100% la germinación de *C. gloeosporioides* atribuido a diversidad en la composición del extracto (cumarinas, fenoles, alcaloides, terpenos, esteroides y flavonoides).

Prapassom *et al.* (2012) evaluaron la Inhibición de la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* con los extractos metanólicos de hojas de *Piper sarmentosum* y con cloroformo de *Mentha cordifolia* al 1.25%; además del extracto de acetona

de *Piper betle* de 10 µg mL⁻¹ inhibió la germinación de esporas de *C. gloeosporioides* en 72.91% (Johnny *et al.*, 2011). Las características fitoquímicas mostraron que los compuestos bioactivos en *Mentha* sp. son sitosterol y β-sitosteril-β-dglucósido, y en *Piper* sp. son lignanos, esteroides, neolignanos, alcaloides, propenilfenoles, terpenos, piperólidos, calconas, flavanonas, flavonas y amidas que contienen restos de isobutilo, pirrolidina, dihidropiridina y piperidina (Johann *et al.*, 2007; Villaseñor *et al.*, 2002).

Este estudio muestra que el jugo de *S. compositum* tiene fuertes actividades fungiestáticas contra *C. gloeosporioides*. Esto puede sugerir su potencial para futura formulación en productos para el control de antracnosis. Estudios más extensos de sus características fitoquímicas y eficacia *in vivo* queda por determinar.

Cuadro 8. Porcentaje de inhibición (192 h de inoculación) y germinación (5 h de inoculación) *in vitro* de *C. gloeosporioides* en medio con diferentes concentraciones de jugo de *S. compositum*.

Parámetros	Concentración	Inhibición	Germinación
		%	
Jugo de <i>S. compositum</i>	2	41.67 ^h	65 ^b
	4	50.7969 ^g	50 ^c
	7.5	74.1619 ^{ef}	0 ^d
	15	77.9081 ^{cd}	0 ^d
	22.5	81.1094 ^b	0 ^d
	30	79.1038 ^{cb}	0 ^d
	37.5	75.4 ^{def}	0 ^d
	45	76.8763 ^{cde}	0 ^d
	52.5	73.5619 ^f	0 ^d
Testigo absoluto (solo PDA)	0	0	100 ^a
Testigo químico (PDA + Tecto 60® (Tiabendazol))	1 g L ⁻¹	87.5463 ^a	
DL ₅₀		2.27270	
<i>p</i> -valor		<0.0001	<0.0001
R ²		0.994055	0.999468

*DMS: Diferencia media significativa; Valores que comparten la misma letra no hay diferencia estadísticamente significativa (Fisher, P ≤ 0.05). DL₅₀: Dosis letal 50.

VII. CONCLUSIONES

El jugo de frutos de *Sechium compositum* mostró actividad inhibitoria en el desarrollo de *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*, con mayor efectividad para *B. cinerea*. Lo anterior se atribuyó a la capacidad de las cucurbitacinas contenidas en el jugo, de inhibir la producción de lacasa extracelular en *B. cinerea* que implica mecanismos de ataque de este patógeno para invadir al huésped.

El control de *C. gloeosporioides* aunque fue en menor porcentaje, si ejerce control, atribuido a que los compuestos fitoquímicos de *S. compositum* facilitan la ruptura de la pared celular del hongo, reduciendo su crecimiento micelial; sin embargo, el extracto aceleró su esporulación. Este es el primer trabajo de investigación que reporta el comportamiento de *B. cinerea* y *C. gloeosporioides* en presencia de jugo de chayote en el medio de cultivo, que resultó provocar efecto fungistático. Lo anterior sugiere realizar trabajos futuros combinando jugo de frutos de chayote con otros compuestos de actividad fungicida.

VIII. LITERATURA CITADA

Achraf B. M. 2012. Phytochemical and *in vitro* antifungal effect of some plants extract of *Asphodelus tenuifolius cavan* and *Zygophyllum album* L. on fungi development. European Journal of Scientific Research 80: 311-321.

Adame J. A. 2000. Plantas curativas del Noreste Mexicano. Ediciones Castillo. México. 15 pp.

Agrios, G. N. (1997). How plants defend themselves against pathogens. Plant pathology. 93-114.

Aguñiga-Sánchez I., M. Soto-Hernández, J. Cadena-Iñiguez, L. D. M. Ruíz-Posadas, J. D. Cadena-Zamudio, A. K. González-Ugarte, B. Weiss, and E. Santiago-Osorioe. 2015. Fruit extract from a *Sechium edule* hybrid induce apoptosis in leukaemic cell lines but not in normal cells. Nutrition and Cancer 67: 250-257.

Ali U., J. H. Syed, R. N. Malik, A. Katsoyiannis, J. Li, G. Zhang, and K. C. Jones. 2014. Organochlorine pesticides (OCPs) in South Asian region: a review. Science of the Total Environment 476: 705-717.

Ansari M. A., A. Anurag, Z. Fatima, and S. Hameed. 2013. Natural phenolic compounds: a potential antifungal agent. Microbiology 1189-1195.

Arauz L. F. 2000. Mango anthracnose: Economic impact and current options for integrated management. Plant Disease 84: 600-611.

Aveno J., and M. Orden. 2004. Hot water treatment of mango: a study of four export corporations in the Philippines. Current Applied Science and Technology 4: 53-60.

Awang Y., M. Ghani, K. Sijam, and R. Mohamad. 2011. Effect of calcium chloride on anthracnose disease and postharvest quality of red-flesh dragon fruit (*Hylocereus polyrhizus*). *African Journal of Microbiology Research* 5: 5250-5259.

Banerjee S., S. Mudliar, R. Sen, B. Giri, D. Satpute, T. Chakrabarti, and R. Pandey. 2010. Commercializing lignocellulosic bioethanol: technology bottlenecks and possible remedies. *Biofuels, Bioproducts and Boirefining: Innovation for a Sustainable Economy* 4: 77-93.

Barkai-Golan R., R. Kahan, R. Padova, and R. Ben-Arie 1977. Combined treatments of heat or chemicals with radiation to control decay in stored fruits. In *Biological Science. Proc. Workshop on The Use of Ionizing Radiation in Agriculture*. Wageningen, EUR. pp.157-169.

Bar-Nun N. and A. M. Mayer. 1989. Cucurbitacins-repressors of induction of laccase formation. *Phytochemistry* 28: 1369-1371.

Bar-Nun N. and A. M. Mayer. 1990. Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 29: 787-791.

Bartalis J., and F. T. Halaweish. 2005. Relationship between cucurbitacins reversed-phase high-performance liquid chromatography hydrophobicity index and basal cytotoxicity on HepG2 cells. *Journal of Chromatography* 818: 159-166.

Bavaresco L., D. Petegolli, E. Canto, M. Fregoni, G. Chiusa, and M. Trevisan, 1997. Elicitation and accumulation of stilbene phytoalexins in grapevine berries infected by *Botrytis cinerea*. *Vitis-Geilweilerhof* 36: 77-84.

Beever R. E., and P. L. Weeds. 2007. Taxonomy and genetic variation of *Botrytis* and *Botryotinia*. In *Botrytis: Biology, pathology and control*. Springer Dordrecht 29-52 pp.

Benito E. P., M. Arranz, y A. Eslava. 2000. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología* 17:43-46.

Beno-Moualem D., and D. Prusky. 2000. Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology* 90: 553-559.

Bolívar K., M. E. Sanabria, D. Rodríguez, M. P. de Camacaro, D. Ulacio, L. J. Cumana, and O. Crescente. 2018. Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo in vitro del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y de la antracnosis en frutos de mango. Potential fungicidal effect of plant extracts on in vitro development of *Colletotrichum gloeosporioides* and on anthracnose of mango. *UDO Agrícola* 9: 175-182.

Bollen G., and G. Scholten. 1971. Acquired resistance to benomyl and some other systemic fungicides in a strain of *Botrytis cinerea* in cyclamen. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 77: 83-90.

Bostock R. M., S. M. Wilcox, G. Wang, and J. E. Adaskaveg. 1999. Suppression of *Monilinia fructicola* cutinase production by peach fruit surface phenolic acids. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 54: 37-50.

Breuil A. C., P. Jeandet, M. Adrian, F. Chopin, N. Pirio, P. Meunier, and R. Bessis. 1999. Characterization of a pterostilbene dehydrodimer produced by laccase of *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 89: 298-302.

Brummell D. A., and M. Harpster. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. *Plant molecular biology* 47: 311-339.

Bruneton J. 2001. Farmacognosia, fitoquímica, plantas medicinales. Segunda edición Acribia. Zaragoza, España. 1099 pp.

Cadena, J. 2005. Caracterización morfoestructural, fisiológica, química y genética de diferentes tipos de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw). Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados, México.

Cadena-Iñiguez J., L. Arévalo-Galarza, C. Avendaño-Arrazate, M. Soto-Hernández, L. Ruiz-Posadas, E. Santiago-Osorio, M. Acosta-Ramos, V. M. Cisneros-Solano, J. F. Aguirre-Medinam, and Ochoa-Martínez, D. 2007. Production genetics postharvest management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Fresh produce 1: 41-53.

Cadena-Iñiguez J., M. Soto-Hernández, L. Arévalo-Galarza, C. Avendaño-Arrazate J. Aguirre-Medina, y L. Ruiz-Posadas. 2011. Caracterización bioquímica de variedades domesticas de chayote (*Sechium edule* (Jacq.) Sw.) comparadas con parientes silvestres. Revista Chapingo serie horticultura 7: 45-55.

Camacho-Tapia M., R. I. Rojas-Martínez, Á. Rebollar-Alviter, S. Aranda-Ocampo and J. Suárez-Espinosa. 2016. Biological, ecological, epidemiological and management aspects of *Candidatus liberibacter*. Revista Chapingo Serie Horticultura, 22: 7-16.

Cardona F., C. Andrés-Lacueva, S. Tulipani, F. J Tinahones and M. I. Queipo-Ortuño. 2013. Benefits of polyphenols on gut microbiota and implications in human health. The Journal of nutritional biochemistry. 24: 1415-1422.

Chardonnet C., C. Sams, R. Trigiano, and W. Conway. 2000. Variability of three Isolates of *Botrytis cinerea* affects the inhibitory effects of calcium on this fungus. Phytopathology 90: 769-774.

Chau C. F., and A. M. Álvarez. 1983. A histological study of anthracnose in *Carica papaya*. Phytopatology 73: 113-116.

Chávez-Sánchez I., A. Carrillo-López, M. Vega-García and E. Yahia. 2013. The effect of antifungal hot-water treatments on papaya postharvest quality and activity of pectinmethylesterase and polygalacturonase. Journal of food science and technology 50: 101-107.

Clark C. A., and J. W. Lorbeer. 1976. Comparative histopathology of *Botrytis squamosa* and *B. cinerea* on onion leaves. Phytopathology 66: 1279-1289.

Coates L. M., G. I. Johnson, and A. W. Cooke. 1993a. Postharvest disease control in mangoes using high humidity hot air and fungicide treatments. *Annals of Applied Biology* 123: 441-448.

Coates L. M., I. F. Muirhead, J. A. G Irwin, and D. H. Gowanlock. 1993b. Initial infection processes by *Colletotrichum gloeosporioides* on avocado fruit. *Mycological Research* 97:1363-1370.

Cole L., F. M. Dewey and C. R. Hawes. 1996. Infection mechanisms of *Botrytis* species: pre-penetration and pre-infection processes of dry and wet conidia. *Mycological Research* 100: 277-286.

Coley-Smith J. R. and K. Verhoeff. 1980. The biology of *Botrytis*. Seventh Edition. Published by Academic Press Inc., New York: 318 pp.

Colmenares A. J., J. Aleu, R. Duran-Patron, I. G. Collado, and R. Hernandez-Galan. 2002. The putative role of botrydial and related metabolites in the infection mechanism of *Botrytis cinerea*. *Journal of chemical ecology* 28:997-1005.

Comménil P., L. Belingheri, M. Sancholle, and B. Dehorter. 1995. Purification and properties of an extracellular lipase from the fungus *Botrytis cinerea*. *Lipids*. 30: 351-356.

Comménil P., L. Belingheri, and B. Dehorter. 1998. Antilipase antibodies prevent infection of tomato leaves by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 52: 1-14.

Cook O. F. 1901. The chayote: A tropical vegetable. US Dept. of Agriculture, Division of Botany 28: 1-31.

Cotoras M., C. Folch and L. Mendoza. 2004. Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 β -hydroxy-kaurenoic acid. *Journal of agricultural and food chemistry* 52: 2821-2826.

Cushnie T. T. and A. J. Lamb. 2005. Antimicrobial activity of flavonoids. *International Journal of Antimicrobial Agents* 26: 343-356.

Dulik D. 1993. Botcinolide: a biologically active natural product from *Botrytis cinerea*. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 57: 1980-1982.

Daferera D. J., B. N. Ziogas and M. G. Polissiou. 2003. The effectiveness of plant essential oils on the growth of *Botrytis cinerea*, *Fusarium* sp. and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Crop protection* 22:39-44.

De Rodríguez D. J., R. R. García, F. H. Castillo, C. A. González, A. S. Galindo, J. V. Quintanilla and L. M. Zuccolotto. 2011. *In vitro* antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products* 34:960-966.

Dean R., J. Van-kan, Z. Pretorius, K. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P.D. Spanu, J. J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis and G. D. Foster. 2012. The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13:414-430.

Dickman M. B., S. S. Patil and P. E. Kolattukudy. 1982. Purification, characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. on *Carica papaya* L. *Physiological Plant Pathology* 20:333-347.

Dickman M. B. 1983. Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Dis.* 67:748-750.

Dickman M. B., Y. S. Ha, Z. Yang, B. Adams and C. Huang. 2003. A protein kinase from *Colletotrichum trifolii* is induced by plant cutin and is required for appressorium formation. *Molecular plant-microbe interactions* 16:411-421.

Dodd J. C., A. B. Estrada, J. Matcham, P. Jeffries and M. J. Jeger. 1991. The effect of climatic factors on *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of mango anthracnose, in the Philippines. *Plant Pathology* 40:568-575.

Donmez M. F., A. Esitken, H. Yildiz and S. Ercisli. 2011. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria. *J. Anim. Plant Sci* 21:758-763.

Dooh J. P. N., Z. Ambang, A. T. Ewola, A. Heu, P. Kosma, E. J. M. Yalen and R. T. Goghomu. 2014. Screening and the effect of extracts of *Thevetia peruviana* on the development of *Colletotrichum gloeosporioides*, causal agent of cassava anthracnose. *E3 Journal of Agricultural Research and Development* 4:054-065.

Doss R. P. 1999. Composition and enzymatic activity of the extracellular matrix secreted by germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol* 65:404-408.

Doss R. P., S. W. Potter, G. A. Chastagner and J. K. Christian. 1993. Adhesion of nongerminated *Botrytis cinerea* conidia to several substrata. *Appl. Environ. Microbiol* 59:1786-1791.

Doss R. P., S. W. Potter, A. H. Soeldner, J. K. Christian and L. E. Fukunaga. 1995. Adhesion of germlings of *Botrytis cinerea*. *Appl. Environ. Microbiol* 61:260-265.

Drori N., H. Kramer-Haimovich, J. Rollins, A. Dinoor, Y. Okon, O. Pines and D. Prusky. 2003. External pH and nitrogen source affect secretion of pectate lyase by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Appl. Environ. Microbiol* 69:3258-3262.

Elad Y., B. Williamson, P. Tudzynski and N. (Eds.) Delen. 2004. *Botrytis: biology, pathology and control*. Springer Science & Business Media. 393 pp.

Elad Y. and K. Evenses. 1995. Physiological aspects of resistance to *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 85:637-643.

Elad Y., B. Williamson, P. Tudzynski and N. Delen. 2007. *Botrytis*: Biology, pathology and control. Academic Publisher. 403 pp.

Estrada A., P. Jeffries and J. Dodd. 1996. Field evaluation of a predictive model to control anthracnose disease of mango in the Philippines. *Plant Pathology* 45:294-301.

FAO 2016. Technologies and practices for small agricultural producers (TECA). (Consultado en marzo de 2018). Link:<http://teca.fao.org/read/8629>.

Faretra F., E. Antonacci and S. Pollastro. 1988. Sexual behaviour and mating system of *Botryotinia fuckeliana*, teleomorph of *Botrytis cinerea*. *Microbiology* 134:2543-2550.

Ferrada E. E., B. A Latorre, J. P. Zoffoli and A. Castillo. 2016. Identification and characterization of *Botrytis blossom* blight of Japanese plums caused by *Botrytis cinerea* and *B. prunorum* sp. nov. in Chile. *Phytopathology*, 106:155-165.

Fitzell R. D. and C. M. Peak. 1984. The epidemiology of anthracnose disease of mango: inoculum sources, spore production and dispersal. *Annals of Applied Biology* 104:53-59.

Freeman S., T. Katan and E. Shabi. 1995. Characterization of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity tests. *Applied and Environmental Microbiology* 62:1014-1020.

Fry S. C. 1995. Polysaccharide-modifying enzymes in the plant cell wall. *Annual Review of Plant Biology* 46:497-520.

Gepts P. 2004. Crop domestication as a long-term selection experiment. *Plant Breeding Reviews* 24:1-44.

Gil-ad N. L., N. Bar-Nun and A. M. Mayer. 2001. The possible function of the glucan sheath of *Botrytis cinerea*: effects on the distribution of enzyme activities. FEMS Microbiology Letters 199:109-113.

Gols R., R. Wagenaar, T. Bukovinszky, N. M. V. Dam, M. Dicke, J. M. Bullock and J. A. Harvey. 2008. Genetic variation in defense chemistry in wild cabbages affects herbivores and their endoparasitoids. Ecology 89:1616-1626.

Gonen L., A. Viterbo, F. Cantone, R. C. Staples and A. M. Mayer. 1996. Effect of cucurbitacins on mRNA coding for laccase in *Botrytis cinerea*. Phytochemistry 42: 321-324.

Govrin E. M. and A. Levine. 2000. The hypersensitive response facilitates plant infection by the necrotrophic pathogen *Botrytis cinerea*. Current Biology 10:751-757.

Halliwell B. and J. M. C. Gutteridge. 1998. Free radicals in biology and chemistry. Oxford University Press, USA. 823 pp.

Hazen K. C. and B. W. Hazen. 1992. Hydrophobic surface protein masking by the opportunistic fungal pathogen *Candida albicans*. Infection and Immunity 60:1499-1508.

Hébert C., M. T. Charles, L. Gauthier, C. Willemot, S. Khanizadeh and J. Cousineau. 2000, July. Strawberry proanthocyanidins: biochemical markers for *Botrytis cinerea* resistance and shelf-life predictability. In IV International Strawberry Symposium 567: 659-662.

Harborne J. B. 1998. Phytochemical Methods: A Guide to modern techniques of Plant Analysis. Chapman & Hall, London. 302 pp.

Janisiewicz W. J. and L. Korsten. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. Annual Review of Phytopathology 40:411-441.

Jarvis W. R. 1977. Botryotinia and Botrytis species: taxonomy, physiology and pathogenicity-A guide to the literature. Monogr 15, Harrow, Ontario, Canada.: Can. 204 pp.

Jeandet P. S., M. Sbaghi and R. Bessis. 1992. The use of phytoalexin induction and of *in vitro* methods as a tool for screening grapevines for resistance to *Botrytis cinerea*. Wageningen Pudoc. 1:109-112.

Jeffries P., J. C. Dodd, M. J. Jeger and R. A. Plumbley. 1990. The biology and control of *Colletotrichum* species on tropical fruit crops. Plant pathology 39:343-366.

Johann S., M. G. Pizzolatti, C. L. Donnici and M. A. D. Resende. 2007. Antifungal properties of plants used in Brazilian traditional medicine against clinically relevant fungal pathogens. Brazilian Journal of Microbiology 38:632-637.

Johnny L., U. K. Yusuf and R. Nulit. 2011. Antifungal activity of selected plant leaves crude extracts against a pepper anthracnose fungus, *Colletotrichum capsici* (Sydow) butler and bisby (Ascomycota: *Phyllachorales*). African Journal of Biotechnology 10:4157-4165.

Johnston D. J. and B. Williamson. 1992. Purification and characterization of four polygalacturonases from *Botrytis cinerea*. Mycological Research 96:343-349.

Joshi M. M. and R. S. Singh. 1969. A *Botrytis* gray mold of gram. Indian Phytophathology 22:125-128.

Kamaruzzaman M., A. A. Bhuiyan and M. O. Faruque. 2018. Isolation and Molecular Characterization of a Wild Type *B. cinerea* from Infected Bottle Gourd (*Lagenaria sicerari*) in China. Journal of Advances in Microbiology. 7:1-10.

Kamle M., P. Kumar, V. K. Gupta, A. K. Tiwari, A. K. Misra and B. K. Pandey. 2013. Identification and phylogenetic correlation among *Colletotrichum*

gloeosporioides pathogen of anthracnose for mango. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology* 2:285-287.

Karabulut O. A., F. M. Gabler, M. Mansour and J. L. Smilanick. 2004. Postharvest ethanol and hot water treatments of table grapes to control gray mold. *Postharvest Biology and Technology* 34:169-177.

Katan T. 1982. Resistance to 3, 5-dichlorophenyl-N-cyclic imide ('dicarboximide') fungicides in the grey mould pathogen *Botrytis cinerea* on protected crops. *Plant Pathology* 31:133-142.

Kim Y. K., D. Li and P. E. Kolattukudy. 1998. Induction of Ca²⁺-calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. *Journal of Bacteriology* 180: 5144-5150.

Kim Y. K., Z. M. Liu, D. Li and P. E. Kolattukudy. 2000. Two Novel Genes Induced by Hard-Surface Contact of *Colletotrichum gloeosporioides* Conidia. *Journal of Bacteriology* 182: 4688-4695.

Kumar N., G. Sharma, B. S. Weir, K. D. Hyde and B. D. Shenoy. 2013. The ApMat marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. *Fungal Diversity*. 61:117-138.

Laha S. K. and J. S. Grewal. 1983. Botrytis blight of chickpea and its perpetuation through seed (*Cicer arietinum*). *Indian Phytopathology* 36:630-634.

Langcake P. 1981. Disease resistance of *Vitis* spp. and the production of the stress metabolites resveratrol, ϵ -viniferin, α -viniferin and pterostilbene. *Physiological Plant Pathology* 18:213-226.

Latorre B. A., E. Agosin, R. San Martín and G. S. Vasquez. 1997. Effectiveness of conidia of *Trichoderma harzianum* produced by liquid fermentation against *Botrytis* bunch rot of table grape in Chile. *Crop Protection*, 16: 209-214.

Latunde-Dada, A. O. 2001. Colletotrichum: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology* 2:187-198.

Lee J. Y., H. J. Park, C. Y. Lee and W. Y. Choi. 2003. Extending shelf-life of minimally processed apples with edible coatings and antibrowning agents. *LWT-Food Science and Technology* 36:323-329.

Lenné J. D. 1992. Colletotrichum: Biology, pathology and control. British Society for Plant Pathology. U. K. 134-165 pp.

Lira R., J. Castrejon, S. Zamudio and C. Rojas-Zenteno. 1999. Propuesta de ubicación taxonómica para los chayotes silvestres (*Sechium edule*, Cucurbitaceae) de México. *Acta Botánica Mexicana* 49: 47-61.

Lorenzini M., and G. Zapparoli. 2014. An isolate morphologically and phylogenetically distinct from *Botrytis cinerea* obtained from withered grapes possibly represents a new species of *Botrytis*. *Plant pathology* 63: 1326-1335.

Ma S., Y. Hu, S. Liu, J. Sun, M. Irfan, L. J. Chen and L. Zhang. 2018. Isolation, Identification and the biological characterization of *Botrytis cinerea*. *International Journal of Agriculture and Biology* 20: 1033-1040.

Mansfield J. 1980. Mechanisms of resistance to Botrytis. Academic Press, London. 181-218 pp.

Martins D. M., L. E. Blum, M. C. Sena, J. B. Dutra, L. F. Freitas, L. F. Lopes, O. K. Yamanishi, and A. C. Dianese. 2004. Effect of hot water treatment on the control of papaya (*Carica papaya* L.) postharvest diseases. In III International Symposium on Tropical and Subtropical Fruits 864: 181-185.

Matias R. C. 2018. Chemical constituents and antifungal potential of the *Richardia brasiliensis* (Gomes) ethanolic extract. *Tropical and Subtropical Agroecosystems* 21: 457-465.

McGuire R. G. 1991. Concomitant decay reductions when mangoes are treated with heat to control infestations of Caribbean fruit flies. *Plant disease* 75: 946-959.

Mena-Nevarez G., G. Valencia-Del Toro, A. B. Pintilde, R. Villanueva-Arce, E. Durán-Páramo, and F. Robles-Martínez. 2012. Degradation capacity of fungi (*Colletotrichum* sp., *Penicillium* sp. and *Rhizopus* sp.) on mangoes and oranges. *African Journal of Agricultural Research* 7: 4564-4574.

Metcalf R. L., A. M. Rhodes, R. A. Metcalf, J. Ferguson, E. R. Metcalf and P. Y. Lu. 1982. Cucurbitacin contents and diabroticite (Coleoptera: Chrysomelidae) feeding upon *Cucurbita* spp. *Environmental Entomology* 11: 931-937.

Miró M. 1995. Curcubitacins and their pharmacological effects. *Phytother Research*. 9: 931-937.

Mirzaei S., E. M. Goltapeh, M. Shams-Bakhsh, and N. Safaie. 2008. Identification of *Botrytis* spp. on plants grown in Iran. *Journal of Phytopathology* 156: 21-28.

Mishra A. K. and N. K. Dubey. 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Applied and Environmental Microbiology* 60: 1101-1105.

Morrissey J. P. and A. E. Osbourn. 1999. Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiology and Molecular Biology Reviews* 63: 708-724.

Movahedi S., and J. B. Heale. 1990a. Purification and characterization of an aspartic proteinase secreted by *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers in culture and in infected carrots. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 289-302.

Movahedi S., and J. Heale. 1990b. The roles of aspartic proteinase and endopectin lyase enzymes in the primary stages of infection and pathogenesis of various host tissues by different isolates of *Botrytis cinerea* Pers ex. Pers. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 36: 303-324.

Muñoz-Jáuregui A. M., D. F. Ramos-Escudero, U. C. Alvarado-Ortiz, y B. Castañeda-Castañeda. 2007. Evaluación de la capacidad antioxidante y contenido de compuestos fenólicos en recursos vegetales promisorios. *Revista de la Sociedad Química del Perú* 73: 142-149.

Ortega-Paczka R., M. A. Martínez-Alfaro, and G. Rincón-Enríquez. 1998. Principales cultivos de México y sus regiones mundiales de mayor diversidad. XVII Congreso de fitotecnia. Memoria de la Sociedad Mexicana de Fitogenética. México. 93 pp.

Pande S., G. Singh, J. Rao, M. Bakr, P. Chaurasia, S. Joshi, C. Johansen, S. D. Singh, J. Kumar, M. M. Rahman, and C. L. Gowda. 2001. Integrated management of botrytis gray mold of chickpea. *Information Bulletin. International Crops Research Institute for the Semi-Arid Tropics*. 61: 1-21.

Paull R., and O. Duarte 2011. *Tropical Fruits. Second Edition Vol. 1*. London. 393 pp.

Pezet R., V. Pont, and K. Hoang-Van. 1991. Evidence for oxidative detoxification of pterostilbene and resveratrol by a laccase-like stilbene oxidase produced by *Botrytis cinerea*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 39: 441-450.

Ploetz R., and S. Freeman. 2009. Foliar, floral, and soilborne diseases. In: *The Mango*. CABI Publishing. London. 232-289 pp.

Ploetz R. C. 2003. *Diseases of tropical fruit crops*. CABI Publishing. London. 544 pp.

Plotto A., R. Roberts, and D. Roberts. 2003. Evaluation of plant essential oils as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicum esculentum*). *Acta Horticulturae* 1: 737-745.

Podila G. K., L. M. Rogers, and P. E. Kolattukudy. 1993. Chemical signals from avocado surface wax trigger germination and appressorium formation in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Physiology* 103: 267-272.

Prusky D. J. L. McEvoy, B. Leverentz, and W. S. Conway. 2001. Local modulation of host pH by *Colletotrichum* species as a mechanism to increase virulence. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 14: 1105-1113.

Prusky D., I. Kobiler, I. Miyara, and N. Alkan. 2009. Fruit diseases. In: *The Mango: Botany, production and uses*. CABI Publishing. London. 210-230 pp.

Rangel-Guerrero J. M., S. Flores-Benítez, J. Cadena-Iñiguez, F. J. Morales-Flores and L. I. Trejo-Téllez. 2018. Extractos de frutos de *Cucurbita foetidissima* (Kunth) inhiben el crecimiento de fitopatógenos de interés agrícola. *Agroproductividad* 11: 107-115.

Reavill M. J. 1954. Effect of certain chloronitrobenzenes on germination, growth and sporulation of some fungi. *Annals of Applied Biology* 41: 448-460.

Rebollar-Alviter, A. 2011. Manejo del mildiú y el moho gris de la zarzamora en Michoacán. Folleto Técnico 3535. Chapingo, Texcoco, Estado de México. 34 pp.

Rebordinos L., J. M. Cantoral, M. V. Prieto, J. R. Hanson, and I. G. Collado. 1996. The phytotoxic activity of some metabolites of *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 42: 383-387.

Redgwell R., M. Fischer, E. Kendal, and E. MacRae. 1997. Galactose loss and fruit ripening: high-molecular-weight arabinogalactans in the pectic polysaccharides of fruit cell walls. *Planta* 203: 174-181.

Reignault P., M. Mercier, G. Bompeix, and M. Boccara. 1994. Pectin methylesterase from *Botrytis cinerea*: physiological, biochemical and immunochemical studies. *Microbiology* 140: 3249-3255.

- Rendall-Dunn A.J. 1991. General news. *Postharvest News Info* 1991: 2-3.
- Rodríguez-López, E. S., J. M. González-Prieto, and N. Mayek-Pérez. 2009. La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología* 27: 53-63.
- Rodríguez R. J., J. F. White, A. E. Arnold, and A. R. A. Redman. 2009. Fungal endophytes: diversity and functional roles. *New Phytologist* 182: 314-330.
- Ross G. S., T. Wegrzyn, E. A. MacRae, and R. J. Redgwell. 1994. Activity against cell wall polysaccharides and characterization of a related cDNA clone. *Plant Physiology* 106: 521-528.
- Roy B. A. 2001. Patterns of association between crucifers and their flower-mimic pathogens: host jumps are more common than coevolution or cospeciation. *Evolution* 55: 41-53.
- Ruiz P. 2001. Histopatología de frutos de mango (*Mangifera indica* L.) cv. Haden infectados por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. Tesis de Maestría. Colegio de Posgraduados, Texcoco, Estado de México, México 78 pp.
- Rzedowski J. 1991. Diversidad y orígenes de la flora fanerogámica de México. *Acta Botánica Mexicana* 14: 3-21.
- Saito S., D. Margosan, T. J. Michailides, and C. L. Xiao. 2016. *Botrytis californica*, a new cryptic species in the *B. cinerea* species complex causing gray mold in blueberries and table grapes. *Mycologia* 108: 330-343.
- Salazar-Aguilar S., L. Ruiz-Posadas, J. Cadena-Iñiguez, M. Soto-Hernández, E. Santiago-Osorio, I. Aguiñiga-Sánchez, A. R. Rivera-Martínez, and J. Aguirre-Medina. 2017. *Sechium edule* (Jacq.) Swartz, a new cultivar with antiproliferative potential in a human cervical cancer HeLa cell line. *Nutrients* 9: 798-813.

Salinas, J. 1992. Function of cutinolytic enzymes in the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. Tesis Doctoral. Universidad de Utrech, Holanda.

Salinas J., and K. Verhoeff. 1995. Microscopical studies on the infection of gerbera flowers by *Botrytis cinerea*. European Journal of Plant Pathology 101: 377-386.

Sandoval-Sánchez M., D. Nieto-Ángel, J. Sandoval-Islas, D. Téliz-Ortiz, M. Orozco-Santos, V. Silva-Rojas. 2013. Fungi associated to stem-end rot and dieback of mango (*Mangifera indica* L.). Agrociencia 47: 61-63.

Sarkar N., S. Ghosh, S. Bannerjee, and K. Aikat. 2012. Bioethanol production from agricultural wastes: An overview. Renewable Energy 37: 19-27.

Sasaki I., and H. Nagayama. 1994. B-glucosidase from *Botrytis cinerea*: its relation to the pathogenicity of the fungus. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry 58: 616-620.

Sbaghi M., P. Jeandet, R. Bessis, and P. Leroux. 1996. Degradation of stilbene-type phytoalexins in relation to the pathogenicity of *Botrytis cinerea* to grapevines. Plant Pathology 45: 139-144.

Setzer W. N. and M. C. Setzer. 2003. Plant-derived triterpenoids as potential antineoplastic agents. Mini reviews in Medicinal Chemistry 3:540-556.

Sharma G., N. Kumar, B. S. Weir, K. D. Hyde, and B. D. Shenoy. 2013. The ApMat marker can resolve *Colletotrichum* species: a case study with *Mangifera indica*. Fungal Diversity 61:117-138.

Sharma M., and S. Kulshrestha. 2015. *Colletotrichum gloeosporioides*: an anthracnose causing pathogen of fruits and vegetables. Biosciences Biotechnology Research Asia 12:1233-1246.

Sharma R. R., D. Singh and R. Singh. 2009. Biological control of postharvest diseases of fruits and vegetables by microbial antagonists: A review. *Biological control* 50: 205-221.

Shi X., B. Franko, C. Frantz, H. M. Amin and R. Lai. 2006. JSI-124 (cucurbitacin I) inhibits Janus kinase-3/signal transducer and activator of transcription-3 signalling, downregulates nucleophosmin-anaplastic lymphoma kinase (ALK), and induces apoptosis in ALK-positive anaplastic large cell lymphoma cells. *British journal of haematology* 135: 26-32.

Shi X. Q., B. Q. Li, G. Z. Qin, and S. P. Tian. 2011. Antifungal activity and possible mode of action of borate against *Colletotrichum gloeosporioides* on mango. *Plant disease* 95: 63-69.

Sibi G., K. Kaushik, K. Dhananjaya, K. R. Ravikumar, and H. Mallesha. 2013. Antibacterial activity of *Sechium edule* (Jacq.) Swartz against Gram negative food borne bacteria. *Adv. Appl. Sci. Res.* 4: 259-61.

Song Q. Y., W. Y. Qi, Z. M. Li, J. Zhao, J. J. Chen, and K. Gao. 2011. Antifungal activities of triterpenoids from the roots of *Astilbe myriantha* Diels. *Food Chemistry* 128: 495-499.

Soto-Hernández M., M. Monroy-Vázquez, J. Cadena-Iñiguez, E. Santiago-Osorio, L. Ruiz-Posadas y H. Rosas-Acevedo. 2009. Estudio biodirigido de un extracto alcohólico de frutos de *Sechium edule* (Jacq.) Swartz. *Agrociencia* 34: 777-790.

Staats M., P. van Baarlen, and J. A. van Kan. 2005. Molecular phylogeny of the plant pathogenic genus *Botrytis* and the evolution of host specificity. *Molecular Biology and Evolution* 22: 333-346.

Staples R. C., and A. M. Mayer. 1995. Putative virulence factors of *Botrytis cinerea* acting as a wound pathogen. *FEMS Microbiology Letters* 134: 1-7.

Sun J., M. A. Blaskovich, R. Jove, S. K. Livingston, D. Coppola, and S. M. Sebti. 2005. Cucurbitacin Q: a selective STAT3 activation inhibitor with potent antitumor activity. *Oncogene* 24: 3236-3245.

Syngenta. 2019 Catálogo de productos agroquímicos. Consultado el 12/03/2019 en: <https://www.syngenta.com.mx/>.

Talhinhas P., S. Sreenivasaprasad, J. Neves-Martins, and H. Oliveira. 2005. Molecular and phenotypic analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Appl. Environ. Microbiol.* 71: 2987-2998.

Tanović B., G. Delibašić, J. Milivojević, and M. Nikolić. 2009. Characterization of *Botrytis cinerea* isolates from small fruits and grapevine in Serbia. *Archives of Biological Sciences* 61: 419-429.

Téliz D., y A. Mora. 2007. El Aguacate y su Manejo Integrado. Segunda edición. Grupo Mundi-Prensa. México. 321 pp.

Thoennissen N. H., G. B. Iwanski, N. B. Doan, R. Okamoto, P. Lin, S. Abbassi, J. H. Song, D. Yin, M. Toh, W.D. Xie, J.W. Said and H.P. Koeffler. 2009. Cucurbitacin B induces apoptosis by inhibition of the JAK/STAT pathway and potentiates antiproliferative effects of gemcitabine on pancreatic cancer cells. *Cancer research* 69: 5876-5884.

Udayanga D., D. S. Manamgoda, X. Liu, E. Chukeatirote, and K. D. Hyde. 2013. What are the common anthracnose pathogens of tropical fruits?. *Fungal Diversity* 61: 165-179.

Valdés L. A., D. Calero-Consuegra, M. E. Carballo, M. Capote, I. González y J. M. Alvarez. 2017. Caracterización morfológica, cultural y patogénica de aislados de *colletotrichum* sp. Produciendo antracnosis en mango (*Mangifera indica* L.). La granja. *Revista de Ciencias de la Vida* 26:38-51

Van-Kan J. A. 2006. Licensed to kill: the lifestyle of a necrotrophic plant pathogen. *Trends in plant science* 11: 247-253.

Van-Kan J. A. L., J. W. Van't Klooster, C. A. M. Wagemakers, D. C. T. Dees and C. J. B. Van der Vlugt-Bergmans. 1997. Cutinase A of *Botrytis cinerea* is expressed, but not essential, during penetration of gerbera and tomato. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10:30-38.

Verhoeff K. 1974. Latent infections by fungi. *Annual Review of Phytopathology* 12: 99-110.

Vieira W. A., S. J. Michereff, M. A. de Morais, K. D. Hyde, and M. P. Câmara. 2014. Endophytic species of *Colletotrichum* associated with mango in northeastern Brazil. *Fungal diversity* 67: 181-202.

Villanueva-Arce R., E. Cárdenas-Soriano, A. M. Hernández-Anguiano, A. Mora-Aguilera, and D. Téliz-Ortíz. 2004. Patogénesis de la antracnosis (*Colletotrichum fragariae*) en frutos de chirimoya. *Agrociencia* 40: 773-782.

Villaseñor I. M., J. Angelada, A. P. Canlas, and D. Echegoyen. 2002. Bioactivity studies on β -sitosterol and its glucoside. *Phytotherapy Research: An International Journal Devoted to Pharmacological and Toxicological Evaluation of Natural Product Derivatives* 16: 417-421.

Viterbo A., R. C. Staples, B. Yagen, and A. M. Mayer. 1994. Selective mode of action of cucurbitacin in the inhibition of laccase formation in *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 35: 1137-1142.

Vlugt-Bergmans Van der C. J. B., C. A. M. Wagemakers, and J. A. L. Van Kan. 1997. Cloning and expression of the cutinase A gene of *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 10: 21-29.

Wajid K. M., and R. K. Singh. 1974. Anthracnose of arhar incited by *Colletotrichum truncatum*. *Indian Phytopathology* 27: 622-624.

Waksmundzka H. M., J. Sherna, and T. Kowalska. 2008. Thin Layer Chromatography in Phytochemistry. Edit. CRC Press, Taylor and Francis Group. New York. 874 pp.

Walker A. S., A. Gautier, J. Confais, D. Martinho, M. Viaud, P. Le Pêcheur, J. Dupont and E. Fournier. 2011. *Botrytis pseudocinerea*, a new cryptic species causing gray mold in French vineyards in sympatry with *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* 101:1433-1445.

Weir B. S., P. R. Johnston, and U. Damm. 2012. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in mycology* 73: 115-180.

Wharton P. S., and J. Diéguez-Uribeondo. 2004. The biology of *Colletotrichum acutatum*. *In Anales del Jardín Botánico de Madrid* 61: 3-22.

White T. J., T. Bruns, S. J. W. T. Lee, and J. L. Taylor. 1990. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR protocols: a guide to methods and applications* 18:315-322.

Williamson B., G. H. Duncan, J. G. Harrison, L. A. Harding, Y. Elad, and G. Zimand. 1995. Effect of humidity on infection of rose petals by dry-inoculated conidia of *Botrytis cinerea*. *Mycological Research* 99: 1303-1310.

Williamson B., B. Tudzynski, P. Tudzynski, and J. A. Van-Kan. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8: 561-580.

Wills R., B. McGlasson, D. Graham, D. Joyce, and J. W. Rushing. 1999. Postharvest: An introduction to the physiology and handling of fruit, vegetables and ornamentals. *Journal of Vegetable Crop Production* 4: 83-84.

Wolf T. K., A. B. A. M. Baudoin, and N. Martinez-Ochoa. 1997. Effect of floral debris removal from fruit clusters on botrytis bunch rot of Chardonnay grapes. *Vitis* 16: 27-33.

Wu P. L., F. W. Lin, T. S. Wu, C. S. Kuoh, K. H. Lee and S. J. Lee. 2004. Cytotoxic and anti-HIV principles from the rhizomes of *Begonia nantoensis*. Chemical and Pharmaceutical Bulletin 52:345-349.

Xiao C. L., S. J. MacKenzie, and D. E. Legard. 2004. Genetic and pathogenic analyses of *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from strawberry and noncultivated hosts. Phytopathology 94: 446-453.

Yakoby N., D. Beno-Moualem, N. T. Keen, A. Dinooor, O. Pines, and D. Prusky. 2001. *Colletotrichum gloeosporioides* pelB is an important virulence factor in avocado fruit-fungus interaction. Molecular Plant-Microbe Interactions 14: 988-995.

Yakoby N., D. Beno-Moualem, I. Kobiler, and D. Prusky. 2002. The analysis of fruit protection mechanisms provided by reduced-pathogenicity mutants of *Colletotrichum gloeosporioides* obtained by restriction enzyme mediated integration. Phytopathology 92: 1196-1201.

Yenjit P., M. Issarakraisila, W. Intana, and K. Chantrapromma. 2010. Fungicidal activity of compounds extracted from the pericarp of *Areca catechu* against *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* and in mango fruit. Postharvest Biology and Technology 55: 129-132.

Zervakis G., A. Philippoussis, S. Ioannidou, and P. Diamantopoulou. 2001. Mycelium growth kinetics and optimal temperature conditions for the cultivation of edible mushroom species on lignocellulosic substrates. Folia Microbiologica 46: 231-234.

Zhou Y. J., J. Zhang, X. D. Wang, L. Yang, D. H. Jiang, G. Q. Li, T. Hsiang, and W. Y. Zhuang. 2014. Morphological and phylogenetic identification of *Botrytis sinoviticola*, a novel cryptic species causing gray mold disease of table grapes (*Vitis vinifera*) in China. Mycologia 106: 43-56.

Zuanazzi J., and J. A. Montanha. 2004. Flavonóides. In: Farmacognosia: da planta ao medicamento. Simões, C.M.O., Guerra, M.P. (Orgs.) Fifth Ed., Porto Alegre/Florianópolis. UFSC. 1096 p.