



**Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo**  
**Instituto de Ciencias Agropecuarias**  
**Maestría en Ciencia de los Alimentos**



**“Efecto de extractos de *Allium sativum* y *Verbesina persicifolia* en el desarrollo de *Collectotrichum gloesporioides* aislados de Mango (*Mangífera indica* L.) y de Jitomate (*Solanum lycopersicum*)”**

**TESIS**

**QUE PARA OBTENER EL TITULO DE:**

**MAESTRA EN CIENCIAS DE LOS ALIMENTOS**

**PRESENTA**

**Berenice Hernández Gayosso**

**DIRECTOR:**

**Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa**

**Tulancingo de Bravo, Hidalgo; 2018.**



# UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE HIDALGO

Instituto de Ciencias Agropecuarias

School of Forestry and Environmental Studies

## COORDINACIÓN DE INVESTIGACION Y POSGRADO DEL ICAg

Acta de la reunión del Comité de Tesis de Maestría en Ciencia de los Alimentos  
Apertura:

La reunión ordinaria para evaluar los avances de la tesis intitulada: "Efecto de extractos de *Allium sativum* y *Verbena peruviana* en el desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* aislados de Mango (*Mangifera indica* L.) y de Jilcomate (*Solenum lycopersicum*)", que desarrolla el estudiante Berenice Hernández Gayosso

Asistentes:

Dr. Javier Castro Rosas

Dra. Esmeralda Rangel Vargas

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

Dra. Reyna Nallely Falcón Cortés

Observaciones:

### A. Revisión de Trabajo de Tesis

El comité revisó con atención el trabajo de tesis en curso propuesto por la estudiante, comunicando a la estudiante, Berenice Hernández Gayosso, oportunamente las correcciones, adiciones y/o modificaciones que debería considerar para mejorar su trabajo y poder continuar con el proceso de obtención de grado. El estudiante atendió de forma conveniente las sugerencias del comité.

### B. Acuerdos

En esta fecha, se comunicó atentamente que el comité conformado por los profesores firmantes, otorgamos nuestra autorización para que el estudiante imprima su trabajo final de tesis, y continúe con los trámites necesarios para la obtención del grado de maestría respectivo.

ATENTAMENTE

"AMOR, ORDEN Y PROGRESO"

Tulancingo de Bravo, Hidalgo a 3 de diciembre de 2018

Dr. Javier Castro Rosas

Dra. Esmeralda Rangel Vargas

Dr. Carlos Alberto Gómez Aldapa

Dra. Reyna Nallely Falcón Cortés



\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Dr. Javier Castro y al Dr. Carlos Aldapa, por su apoyo, su orientación, su paciencia y su asesoría durante este trabajo.

Agradezco a CONACYT por el apoyo brindado para la realización de este proyecto de investigación.

## **DEDICATORIAS**

*A Dios que siempre ha estado presente en mi vida. A mis hijos, por ser mi motivación y la fuente de mi esfuerzo. A mis padres y a mi esposo, por su apoyo incondicional, durante este proyecto de estudio.*

## INDICE

INTRODUCCIÓN .....	12
2. ANTECEDENTES .....	14
2.1 Generalidades del jitomate ( <i>Solanum lycopersicum</i> ).....	14
2.1.1. Producción .....	5
2.1.2. Enfermedades del jitomate causadas por hongos.....	15
2.1.2.1. Alternariosis.....	6
2.1.2.2. Moho gris .....	6
2.1.2.3. Antracnosis .....	6
2.2. Generalidades del mango ( <i>Mangifera indica</i> ) .....	16
2.2.1. Producción .....	8
2.2.2. Enfermedades del mango causadas por hongos .....	17
2.1.2.1. Antracnosis .....	8
2.1.2.1. Mancha negra.....	8
2.1.2.1. Malformación .....	8
2.3. <i>Collectotricum gloesporioides</i> como fitopatógeno. ....	9
2.3.1. Proceso de infección. ....	9
2.3.2. Sintomatología .....	19
2.4. Control de enfermedades fitopatógenas.....	10
2.5. Uso de extractos vegetales con actividad antifúngica .....	11
2.5.1. <i>Allium sativum</i> (ajo).....	11
2.5.2. <i>Verbesina persicifolia</i> (hierba del toro).....	14
2.6. Metabolismo secundario de plantas .....	15
2.7. Métodos de extracción de metabolitos secundarios .....	15
2.8. Métodos cromatograficos de metabolitos secundarios.....	15
2.8.1. Cromatografía en columna.....	196
2.8.2. Cromatografía en capa fina.....	196
3. Justificación .....	267
4. Objetivos .....	27
4.1 Objetivo general .....	27
4.2 Objetivos específicos .....	278
5. Materiales y métodos .....	28

5.1 Materiales .....	289
5.1.1 Material biológico.....	28
5.1.2 Cepas fúngicas .....	289
5.1.3 Medios de cultivo.....	28
5.1.4 Reactivos y disolventes.....	28
5.1.5 Equipos.....	28
5.2 Métodos.....	28
5.2.1 Obtención de las cepas fúngicas.....	29
5.2.2 Microcultivo en portaobjetos .....	29
5.2.3 Identificación morfológica.....	29
5.2.4 Prueba de patogenicidad .....	291
5.2.5 Extracto de <i>Verbesina persicifolia</i> (Hierba del toro).....	30
5.2.6 Extracto de <i>Allium sativum</i> (Ajo).....	30
5.2.7 Efecto de los extractos vegetales sobre el crecimiento de <i>C. gloesporioides</i> .....	30
5.2.8 Obtención de las fracciones cromatográficas a partir de los extractos con mayor actividad antifúngica mediante cromatografía en columna.....	31
5.2.9 Obtención de colecciones a partir de cromatografía en placa fina.....	334
5.2.10 Porcentaje de inhibición de <i>A. sativum</i> y <i>V. persicifolia</i> sobre <i>C. gloesporioides</i> en medios de cultivo. ....	345
5.2.11 Porcentaje de inhibición de <i>A. sativum</i> y <i>V. persicifolia</i> sobre <i>C. gloesporioides</i> en fruto de mango y jitomate. ....	345
5.2.12 Severidad de infección de <i>C. gloesporioides</i> sobre jitomate y mango tratados con las colecciones de <i>A. sativum</i> . y <i>V. persicifolia</i> de mayor porcentaje inhibitorio. ....	356
6. Análisis estadístico .....	367
5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	37
5.1 Obtención de las cepas fúngicas.....	37
5.1.1 Prueba de patogenicidad .....	389
5.2 Obtención de extractos .....	30
5.3 Control <i>in vitro</i> de <i>C. gloesporioides</i> con extractos vegetales.....	401
5.4 Obtención de las fracciones cromatográficas a partir de los extractos con mayor actividad antifúngica mediante cromatografía en columna.....	456
5.5 Porcentaje de inhibición de colecciones cromatográficas de <i>A. sativum</i> y <i>V. persicifolia</i> sobre <i>C. gloesporioides</i> en medios de cultivo.....	489

<b>5.6 Porcentaje de inhibición de <i>A. sativum</i> y <i>V. persicifolia</i> sobre <i>C. gloesporioides</i> en frutos de mango y de jitomate.....</b>	<b>534</b>
<b>5.7 Severidad de infección de <i>C. gloesporioides</i> sobre jitomate y mango tratados con las colecciones de <i>A. sativum</i>. y <i>V. persicifolia</i> de mayor porcentaje inhibitorio.....</b>	<b>536</b>
<b>CONCLUSIONES.....</b>	<b>57</b>
<b>PERSPECTIVAS Y RECOMENDACIONES.....</b>	<b>589</b>
<b>REFERENCIAS.....</b>	<b>50</b>

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1.</b> Clasificación taxonómica del jitomate.....	5
<b>Tabla 2.</b> Clasificación taxonómica del mango.....	7
<b>Tabla 3.</b> Clasificación taxonómica de <i>C. gloesporioides</i> .....	9
<b>Tabla 4.</b> Clasificación taxonómica del ajo.....	21
<b>Tabla 5.</b> Clasificación taxonómica de Hierba del toro.....	23
<b>Tabla 6.</b> Mezclas de disolventes utilizadas en cromatografía en columna. ....	23
<b>Tabla 7.</b> Escala para evaluar la severidad de antracnosis en frutos, según porcentaje de superficie afectada. ....	35
<b>Tabla 8.</b> Especies de plantas utilizadas para la obtención de los extractos de estudio. ....	39
<b>Tabla 9.</b> Fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo de <i>A. sativum</i> .....	46
<b>Tabla 10.</b> Colecciones obtenidas a partir de cromatografía en placa fina de extracto de acetato de etilo de <i>A. Sativum</i> .....	46
<b>Tabla 11.</b> Fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo de <i>V. Persicifolia</i> . ....	47
<b>Tabla 12.</b> Colecciones obtenidas a partir de cromatografía en placa fina de extracto de <i>V. Persicifolia</i> .....	39
<b>Tabla 13.</b> Efecto inhibitorio de la colección 4 de <i>V. persicifolia</i> y de la colección 5 de <i>A. sativum</i> sobre el crecimiento micelial de <i>C. gloesporioides</i> aislado de mango, a los 6 y 15 días de inoculación.....	53
<b>Tabla 14.</b> Efecto inhibitorio de la colección 4 de <i>V. persicifolia</i> y de colección 5 de <i>A. sativum</i> sobre el crecimiento micelial de <i>C. gloesporioides</i> aislado de jitomate, a los días 6 y 15 de inoculación. ....	54

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Cromatografía en columna .....	33
<b>Figura 2.</b> Cromatografía en capa fina .....	33
<b>Figura 3.</b> Síntomas típicos de antracnosis causados por <i>Collectotricum gloesporioides</i> ....	28
<b>Figura 4.</b> Patogenicidad de cepas de <i>C. gloesporioides</i> inoculados en mango y jitomate: a y e) 4 días después de inoculación; b y f) 8 días después de inoculación; c y g) 12 días después de inoculación; d y h) 16 días después de inoculación. ....	39
<b>Figura 5.</b> Cinética de crecimiento micelial radial de <i>C. gloesporioides</i> aislado de jitomate tratado con extractos de <i>V. persicifolia</i> .....	41
<b>Figura 6.</b> Cinética de crecimiento micelial radial de <i>C. gloesporioides</i> aislado de mango tratado con extractos de <i>V. persicifolia</i> .....	42
<b>Figura 7.</b> Cinética de crecimiento micelial radial de <i>C. gloesporioides</i> aislado de jitomate tratado con extractos de <i>A. sativum</i> . ....	43
<b>Figura 8.</b> Cinética de crecimiento micelial radial de <i>C. gloesporioides</i> aislado de mango tratado con extractos de <i>A. sativum</i> . ....	44
<b>Figura 9.</b> Cinética de crecimiento micelial radial de <i>C. gloesporioides</i> aislado de mango tratado con colecciones del extracto de acetato de etilo de <i>A. sativum</i> . ....	49
<b>Figura 10.</b> Cinética de crecimiento micelial radial de <i>C. gloesporioides</i> aislado de jitomate tratado con colecciones del extracto de acetato de etilo de <i>A. sativum</i> . ....	50
<b>Figura 11.</b> Cinética de crecimiento micelial radial de <i>C. gloesporioides</i> aislado de mango tratado con colecciones del extracto de acetato de etilo de <i>V. persicifolia</i> .....	51
<b>Figura 12.</b> Cinética de crecimiento micelial radial de <i>C. gloesporioides</i> aislado de jitomate tratado con colecciones del extracto de acetato de etilo de <i>V. persicifolia</i> .....	51
<b>Figura 13.</b> Severidad de infección de <i>C. gloesporioides</i> en mango y jitomate a los 21 días de almacenamiento. a) Mango tratado con <i>V. persicifolia</i> ; b) Mango tratado con <i>A. sativum</i> ; c) Mango sin tratamiento (testigo); d) Jitomate tratado con <i>V. persicifolia</i> ; e) Jitomate tratado con <i>A. sativum</i> ; f) Jitomate sin tratamiento (testigo). ....	47

## RESUMEN

Tanto el mango, como el jitomate, ocupan un lugar importante en el comercio internacional, pues son ingredientes indispensables en la dieta humana, sin embargo, también son susceptibles al deterioro postcosecha. Dentro de las enfermedades fungosas se encuentra la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, en mango la antracnosis se caracteriza por la formación de manchas oscuras, mientras que en jitomate, aparecen lesiones hundidas de color negro y con micelio blanco. El objetivo de este trabajo, fue determinar el efecto de extractos de *Allium sativum* y *Verbesina persicifolia*, en el desarrollo de cepas de *Collectotrichum gloeosporioides* aisladas de mango y jitomate. Para esto, se aislaron cepas a partir de frutos con síntomas típicos de antracnosis, las cuales se purificaron y seleccionaron para su identificación en base a criterios taxonómicos de características morfológicas (Carácteres de colonia y morfología conidial) y se realizaron pruebas de patogenicidad a las cepas aisladas. Adicionalmente, se obtuvieron los extractos de las plantas de *Allium sativum* y *Verbesina persicifolia* utilizando cinco solventes (metanol, etanol, acetona, acetato de etilo y agua), se evaluó el efecto inhibitorio de los extractos y colecciones cromatográficas de los extractos, las pruebas se realizaron en agar papa dextrosa (PDA) y en frutos de mango y de jitomate sanos, en todas las pruebas se empleó un testigo sin tratamiento. Los extractos de acetato de etilo, tuvieron efecto inhibitorio sobre cepas aisladas de *C. gloeosporioides*, en la cepa aislada del mango el extracto de acetato de etilo de *V. persicifolia* inhibió en un 75%, y el extracto de acetato de etilo de *A. sativum* inhibió en un 98%. Para jitomate los extractos de acetato de etilo de *V. persicifolia* y de *A. sativum*, también inhibieron el crecimiento del hongo en un 79% y 98%, respectivamente. La colección 5 de *A. sativum* y la 4 de *V. persicifolia*, mostraron el mayor efecto inhibitorio sobre el crecimiento de los hongos, inhibieron el crecimiento de la cepa aislada del jitomate en un 51% y 85%, respectivamente, para la cepa aislada de mango, la inhibición fue de 53% y 91%, respectivamente. Los mejores tratamientos fueron los que involucraron la colección 5 de *A. sativum* y la 4 de *V. persicifolia*, ya que inhibieron el crecimiento de las cepas aisladas de mango, en un 99.4% y 64%, respectivamente, de la misma manera inhibieron el desarrollo del hongo aislado de jitomate (84.2% y 53% respectivamente). En los frutos inoculados superficialmente sin herida, las mismas colecciones retardaron la penetración y el desarrollo del hongo.

Aunque los extractos de *A. sativum* y *V. persicifolia*, no presentaron efecto fungicida, si mostraron efecto fungistático, pues inhibieron el desarrollo del hongo, minimizando la extensión de la enfermedad, más de 50%, estos resultados indican el potencial de los extractos para el manejo de antracnosis en mango y jitomate durante la postcosecha.

## INTRODUCCIÓN

Las frutas y las verduras, son ingredientes indispensables para lograr una dieta humana equilibrada, ya que proporcionan nutrientes importantes. México, tiene un lugar importante en el comercio internacional de hortalizas y frutas, ocupa el quinto lugar mundial como exportador de frutas y hortalizas, dentro de los principales productos de exportación, se encuentran el mango y el jitomate (SIAP, 2013; inforural, 2017).

El mango es un fruto reconocido como uno de los más finos, con mayor distribución en el mundo y es de gran importancia comercial pues su producción ha ido en aumento a partir de 2015 consolidando a México como el quinto lugar mundial en producción de este fruto (SIAP, 2017).

El jitomate es uno de los cultivos hortícolas más importantes producidos en el mundo, pues presenta una alta aceptación por los consumidores y forma parte importante de la gastronomía mundial, en México, durante 2016, la producción supero lo alcanzado en 2015 (SIAP, 2017).

Tanto el mango como el jitomate son susceptibles al deterioro poscosecha, antes de ser consumidos o procesados. Las causas pueden ser cambios fisiológicos como la senescencia y la maduración, por daño químico, daños físicomecánicos causados por magulladuras, compresión, o impacto, y la descomposición por microorganismos. Los patógenos más importantes causantes de grandes pérdidas normalmente son bacterias y hongos, algunas fuentes estiman que dichas pérdidas son del orden del 5 al 25% en países desarrollados y del 20 al 50%, en países en desarrollo (FHIA, 2007).

Dentro de las enfermedades fúngicas, se encuentra la Antracnosis, causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, la cual se hace evidente por la aparición de manchas oscuras, hundidas que contienen esporas. El control de la antracnosis se realiza principalmente, con la aplicación precosecha de fungicidas. Sin embargo se han reportado varios problemas relacionados con el uso de fungicidas sintéticos, incluyendo la acumulación de residuos químicos dañinos, en los frutos, en el agua y en el suelo, así como también la inducción de resistencia en los patógenos (Avilán *et al.*, 1996).

Teniendo conocimiento de esta problemática se han buscado alternativas a partir de plantas medicinales que el hombre ha utilizado desde su existencia y que pueden ser fuente de compuestos fungicidas o fungistáticos amigables con el medio ambiente.

Por lo tanto el objetivo del presente trabajo fue evaluar el efecto antifúngico de los extractos de *A. Sativum* y *V. Persicifolia* sobre cepas de *C. gloesporioides* aislados de mango y de jitomate.

## 2. ANTECEDENTES

### 2.1 Generalidades del jitomate (*Solanum lycopersicum*)

El jitomate (*Solanum lycopersicum*), cuyo nombre procede del náhuatl *xictli*, (ombligo) y (*tomatl*) tomate, es una planta de la familia Solanáceas (Tabla 1), originario de la región sur central de Perú y es cultivado, tanto en ambientes secos, como húmedos (Notario y Sosa, 2012).

**Tabla 1.** Clasificación taxonómica del jitomate.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Trachobiota (plantas vasculares)
<b>Subdivisión</b>	Spermatophyta (plantas con semilla)
<b>División</b>	Magnoliophyta (plantas con flores)
<b>Clase</b>	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
<b>Subclase</b>	Asteride
<b>Orden</b>	Solanales
<b>Familia</b>	Solanáceas
<b>Genero</b>	<i>Solanum</i>
<b>Especia</b>	<i>Lycopersicum L.</i>

USDA (2017).

#### 2.1.1. Producción

De acuerdo con estadísticas de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA), el estimado de la producción de jitomate “Hecho en México” aumentó en 35 por ciento, entre 2013 y 2016.

El jitomate es un cultivo que se desarrolla en todas las entidades del país; las cinco principales con aportaciones del 52 por ciento del volumen nacional son Sinaloa, San Luis Potosí, Baja California, Zacatecas y Michoacán.

El jitomate se encuentra disponible durante todo el año, con una mayor producción (del 33.7 por ciento del volumen anual) durante los meses de febrero, marzo y noviembre. Es exportado principalmente a Estados Unidos, Canadá y Japón (SAGARPA, 2016). Sin embargo la producción del jitomate se ve amenazada año tras año por el ataque de diversas enfermedades de origen biótico, que causan pérdidas hasta en un 100 %. Entre los principales patógenos que llegan a disminuir el rendimiento del tomate se encuentran las inducidas por hongos (Inifap, 2011, Martínez, 2016).

## **2.1.2. Enfermedades del jitomate causadas por hongos**

### **2.1.2.1. Alternariosis**

Dentro de las enfermedades del jitomate, desarrolladas en post cosecha, destaca la enfermedad “Alternariosis” causada por el hongo *Aternaría alternata* (Rozas *et al.*, 2006).

Las partes afectadas son tanto hojas, como tallos, frutos y pecíolos, ya en el fruto las características de las lesiones son pardo-oscuros, ligeramente deprimidas y recubiertas de numerosas esporas del hongo. Las fuentes por las que se dispersa son solanáceas silvestres y cultivadas, semillas infectadas y restos de plantas enfermas, los conidios se pueden dispersar por las salpicaduras de agua, lluvia o el viento, la esporulación se ve favorecida por noches húmedas seguidas de días soleados y con temperaturas entre 3 y 35 °C (Infoagro, 2017).

### **2.1.2.2. Moho gris**

Causada por el hongo *Botrytis cinerea*, afecta flores, tallos y frutos recién formados, verdes y próximos a cosechar. En los frutos, produce lesiones blandas y acuosas, presentándose esporulación grisácea o café oscuro, abundante, se presenta en la unión del pedúnculo con el fruto. El hongo se disemina fácilmente, por el viento y por la lluvia, su desarrollo se ve favorecida por humedades relativas altas, y temperaturas entre 15 y 22° C (FAO, 2017).

### **2.1.2.3. Antracnosis**

Causada por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, produce lesiones hundidas y redondas, de color negro en el centro con micelio blanco en los bordes que afectan al fruto.

Las lesiones se ven favorecidas por una humedad relativa alta y temperaturas entre 15 y 20 ° C, el hongo se dispersa por el viento (FAO, 2017).

## 2.2. Generalidades del mango (*Mangifera indica*)

El mango (*Mangifera indica*), pertenece al género *Mangifera*, de la familia de las *Anacardiaceae* (Tabla 2), es de los más populares de las frutas tropicales (Shah *et al.*, 2010), su agradable sabor, aroma, color llamativo y valor nutricional lo hacen favorito del hombre desde épocas remotas (Páez., 2003).

Es originario del continente asiático, entre la zona geográfica del noroeste de la india y el norte de Burma, muy cerca del Himalaya. La distribución de su cultivo se extendió en primera instancia por el suroeste asiático y más tarde al archipiélago Malayo; así, los portugueses, lo llevaron primero al continente africano y posteriormente a las costas de Brasil, y de ahí se distribuyó al resto de América (Infoagro, 2017).

**Tabla 2.** Clasificación taxonómica del mango.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Trachobiota (plantas vasculares)
<b>Subdivisión</b>	Spermatophyta (plantas con semilla)
<b>División</b>	Magnoliophyta (plantas con flores)
<b>Clase</b>	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
<b>Subclase</b>	Rosidae
<b>Orden</b>	Sapindales
<b>Familia</b>	Anacardiaceae
<b>Genero</b>	<i>Mangifera L</i>
<b>Especia</b>	<i>Mangifera indica L.</i>

USDA (2012).

## **2.2.1 Producción**

México ocupa el quinto lugar mundial en la producción del mango, según con estadísticas del Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP), entre enero y octubre de 2016, la producción de este cultivo superó lo que se obtuvo durante todo el 2015. Los principales estados productores son Guerrero, seguido por Sinaloa, Nayarit, Chiapas, Oaxaca y Michoacán. Estas seis entidades aportan más del 80 por ciento del total generado en el periodo de referencia. Asimismo, los meses de mayor producción van de abril a agosto, cuando se cultiva cerca del 80 por ciento de la producción nacional. Sin embargo, por malos manejos poscosecha se desperdicia alrededor del 60%, lo cual está asociado principalmente a la podredumbre ocasionada por enfermedades causadas por hongos (Allende *et al.*, 2001).

## **2.2.2. Enfermedades del mango causadas por hongos**

### **2.2.2.1. Antracnosis**

Es de las enfermedades más difundidas y destructivas del follaje del mango, afecta tanto hojas, flores y frutos, es causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, que puede infectar tanto a frutos jóvenes como a maduros, ocasionando lesiones en forma de manchas oscuras, que se producen durante la recolección, continuando su desarrollo durante el almacenaje y maduración (Infoagro, 2017; Perera y Méndez, 2007).

### **2.2.2.2. Mancha negra**

Es una enfermedad de poscosecha, afecta al follaje, flores y frutos, es producida por *alternaría alternata*, las lesiones aparecen en forma de manchas negras circulares, que se agrandan, llegando a cubrir la mitad del fruto, conforme avanza, las manchas penetran en la pulpa que se oscurece y ablanda (Infoagro, 2017).

### **2.2.2.3. Malformación**

Otra de las enfermedades del mango, causada por *Fusarium subglutinans*, afecta a plantas, y flores, produciendo flores estériles (Infoagro, 2017).

### 2.3. *Collectotricum gloesporioides* como fitopatógeno.

*Colletotrichum gloesporioides* es un Deuteromycota, que pertenece a la clase de los Coelomicetos y al orden Melanconiales, de acuerdo a la Tabla 3 (Páez, 2003), *C. gloesporioides*, tiene una distribución, principalmente tropical y subtropical, aunque hay algunas especies de alto perfil, que afectan los cultivos de clima templado (Cannon *et al.*, 2012), ha sido reportado como uno de los patógenos más importantes en todo el mundo (Phoulivong *et al.*, 2010), ya que produce la antracnosis y es causante de grandes pérdidas económicas en cultivos de diversos frutos como la papaya, aguacate, café, mango, uva, guanábana, tomate, fresa y algunas variedades de cítricos (Cifuentes y García, 2006). Su efecto limita la producción ocasionando pérdidas de frutos durante la cosecha y la postcosecha (Juárez *et al.*, 2010), cuya estimación en mango es de 30-60% del total de producción (Carrillo *et al.*, 2005).

**Tabla 3.** Clasificación taxonómica de *C. gloesporioides*.

<b>Reino</b>	Mycetae o fungi
<b>División</b>	Eumycota
<b>Subdivisión</b>	Deuteromycotyia
<b>Clase</b>	Coelomycetes
<b>Orden</b>	Melanconiales
<b>Genero</b>	<i>Colletotrichum</i>
<b>Especia</b>	<i>C. gloesporioides</i>

(Agrios, 1995).

#### 2.3.1. Proceso de infección.

Las condiciones de humedad relativa (superior al 95 %) y temperaturas entre 20 y 30°C, son factores esenciales en la dispersión y desarrollo del hongo; sin embargo, también puede ocurrir en un rango amplio de condiciones ambientales (Estrada, *et al.*, 2000; Kamle, *et al.*, 2013).

Para el proceso de infección de las especies de *Colletotrichum* no se necesita la presencia de una herida, únicamente el contacto del hongo con el fruto. Comienza a partir de un conidio, proveniente de la dispersión del viento o la lluvia, este se adhiere en la superficie y germina, entonces el hongo produce *cutinasa*, una enzima esencial para la penetración en el tejido verde del fruto, después de unas horas el tubo germinativo se alarga, hinchándose la punta para formar así el Apresorio, cuya función clave es mantener al hongo unido al fruto (Coates y Gowanlok., 1993; Zhou *et al.*, 2017; Rodríguez *et al.*, 2013). El crecimiento fúngico se mantiene en estado de reposo prolongado, una vez que el fruto madura y tiene las condiciones de temperatura, de humedad, y de nutrimentos adecuados, numerosas enzimas degradan los carbohidratos presentes en el fruto, transformándolos en azúcares simples, que son necesarios para el desarrollo del hongo, ahí es donde produce los síntomas de la infección necrotrófica del fruto (Alkan *et al.*, 2015; Dickman y Álvarez, 1983).

### **2.3.2. Sintomatología**

Los síntomas típicos de la infección por *Colletotrichum* se denominan ‘antracnosis’, inician con un exudado gomoso sobre el área donde se manifestara la lesión (Rodríguez, *et al.*, 2013; Cabrera, 2015).

Las lesiones se pueden formar en cualquier parte del fruto, son ligeramente hundidas en los bordes, el centro se encuentra ligeramente elevado, son de color café en su totalidad u oscuro en el centro de la lesión (Duran y Mora, 1987).

Arauz (2000) indicó que en ocasiones dichas lesiones coalescen hasta abarcar extensas áreas de las frutas, característicamente en un patrón de manchas de lágrimas, que se extiende desde el basal hacia el extremo distal de la fruta. Estas abrasiones generalmente se limitan a la cáscara, pero en etapas avanzadas de infección, el hongo puede penetrar la pulpa produciendo acérvulos, y abundantes masas de conidios.

### **2.4. Control de enfermedades fitopatógenas**

El enfoque principal, para control de las enfermedades fitopatológicas, antracnosis, se lleva a cabo, mediante la aplicación programada de diversos fungicidas, durante la fase productiva (Avilán *et al.*, 1996) o en frutos ya cosechados (Arias y Carrizales, 2007). Estos tratamientos, se usan para controlar las infecciones establecidas en los tejidos epidérmicos del producto o

para protegerlo contra las infecciones que pueden ocurrir durante la manipulación y el almacenamiento (Hoa, 2008)

Sin embargo, su uso está cada vez más restringido, debido a la preocupación del público sobre los residuos tóxicos, además, el uso masivo e indiscriminado de estos productos, ha incrementado la población de patógenos resistentes en los cultivos, ocasionando un aumento significativo en los costos de producción y problemas de contaminación ambiental (Bernal *et al.*, 2005; Kefialew y Ayalew, 2008), el control de la antracnosis también se puede lograr mediante el tratamiento de frutas en agua caliente, solo o en combinación con productos químicos, el control preciso de la temperatura y el tiempo son críticos, ya que la fruta puede dañarse fácilmente por la sobreexposición al calor (Arauz, 2000).

El control con agua caliente se ha practicado ampliamente, pues a altas temperaturas, se ocasiona la desnaturalización de enzimas y de proteínas del patógeno, sin embargo, es un método apropiado solo para frutas, donde la temperatura del agua no causa decoloración y escaldadura de la cáscara de la misma, cambio de sabor o ablandamiento de la pulpa: Su eficacia depende, además del tiempo de exposición, de la etapa de madurez, del tamaño, del peso y de las condiciones de cultivo (Jaccobi *et al.*, 2001).

En los últimos años se han explorado nuevas tecnologías para un control efectivo de antracnosis en frutas, entre estos, el uso de compuestos reconocido como seguro (GRAS), desinfectantes, control biológico, inductores naturales, recubrimientos comestibles y los aceites esenciales (Yasmeen y Asgar, 2014).

## **2.5. Uso de extractos vegetales con actividad antifúngica**

Antes de que el hombre jugara un rol en el cuidado de las plantas, estas han sido capaces de protegerse, produciendo para este fin una gran variedad de metabolitos secundarios relacionados con mecanismos de defensa, (Hernández y Bautista, 2007). Tanto los extractos vegetales, como aceites esenciales de cada planta, pueden llegar a tener hasta más de sesenta componentes, presentes en forma individual o como mezcla de compuestos, entre ellos varios con propiedades antifúngicas que en determinadas concentraciones pueden afectar a los patógenos (Ramírez *et al.*, 2016).

Estos extractos, proporcionan una serie de productos derivados (flavonoides, fenoles, terpenos, aceites esenciales, alcaloides, lectinas y polipéptidos), que han mostrado un efecto antimicrobiano contra diversas enfermedades fúngicas de frutos (Hernández y Bautista, 2007).

Recientemente, el uso de una serie de compuestos antifúngicos, incluyendo ácido oxálico, ácido salicílico, extractos de plantas, calcio y borato, ha demostrado ser una estrategia prometedor para controlar enfermedades poscosecha de frutos climatéricos (Xu *et al.*, 2017).

### 2.5.1. *Allium sativum* (ajo)

El ajo (*Allium sativum*) pertenece a la familia de las Liliáceas, del género *Allium* (Tabla 4) que contiene más de 300 especies de plantas, entre las cuales se encuentra *Allium sativum* L. Es originario del Asia Central y se puede encontrar en casi todo el mundo, sobre todo en climas templados y cálidos, posee un bulbo sólido, formado por bulbillos limitados por dos caras planas y una convexa, puntiagudos en ambos extremos. Su tallo es erguido y cilíndrico. Sus hojas son lizas, estrechas, aquilladas y sus flores blanquizcas o rojizas (CONABIO 2017).

**Tabla 4.** Clasificación taxonómica del ajo.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Trachobiota (plantas vasculares)
<b>Subdivisión</b>	Spermatophyta (plantas con semilla)
<b>División</b>	Magnoliophyta (plantas con flores)
<b>Clase</b>	Liliopsida (dicotiledóneas)
<b>Subclase</b>	Liliidae
<b>Orden</b>	Liliales
<b>Familia</b>	Liliaceae
<b>Genero</b>	<i>Allium</i> L
<b>Especia</b>	<i>Allium sativum</i> L

USDA (2012).

A *Allium sativum*, se le atribuyen propiedades antisépticas, antibacterianas, antifúngicas e hipocolesteromiantes, es rico en alicina (dialiltiosulfonato o disulfuro de dialilo), un compuesto antimicrobiano, biológicamente activo, que no está presente en el ajo crudo, se forma rápidamente por la acción de la enzima, allinase (alicina-liasa, E.C.4.4.1.4) sobre sulfóxido de S-alil-L-cisteína (alliin), cuando el ajo es triturado (Moctezuma *et al.*, 2016; Gándara *et al.*, 2014; Li y Zhihui, 2009), además de otros metabolitos secundarios antimicrobianos, que presentan actividad, tales como fenoles, terpenoides, alcaloides, ácidos orgánicos y polipéptidos.

La alicina es menos estable en el ajo triturado o en una solución acuosa homogeneizada que en estado puro, en agua, lo que indica que el ajo contiene algunas sustancias que disminuyen la estabilidad de la alicina. La vida media de la alicina, en Ajo machacado, es de 2.4 días a 23.8 °C, mientras que el de alicina pura en agua, es de 30-40 días (Kyung, 2012).

El ajo ha tenido diferentes aplicaciones en la medicina herbaria y en los últimos años, en la industria farmacéutica, para el tratamiento de diferentes enfermedades, ya que se ha reportado la acción antimicrobiana y antimicótica, contra diversas bacterias, algunos virus y hongos, principalmente dermatofitos y levaduras patógenas para el hombre (Bokaeian y Bameri, 2013; Moctezuma *et al.*, 2016).

Por otro lado, se han hecho diversos estudios con extractos de ajo, tal como lo realizó Cabrera-Escarcega (2015), donde evaluó bulbos de ajo y hojas de Jamaica, en dicha evaluación concluyó que ambas plantas, causaron un efecto de inhibición en el crecimiento y esporulación, sin embargo, el ajo presentó mayor efecto contra *C. gloesporioides*.

Baños *et al.* (2004), al estudiar el efecto del ajo y del eucalipto, sobre *C. gloesporioides*, en mango, concluyeron que ambas plantas presentaron actividad antifúngica en Papaya, redujeron la severidad de la enfermedad en 45.06 y 41.73%, respectivamente. Obteniéndose frutos con mayor vida de anaquel, semejantes a los tratados con fungicida Imazalil.

Respecto a los componentes Gándara *et al.* (2014), en su estudio con extractos de ajo, sobre *B. cinerea*, observaron que la alicina y sus derivados, presentaron efecto inhibitorio sobre la germinación de conidios de *B. cinerea* y desarrollo de moho gris en uvas.

### 2.5.2. *Verbesina persicifolia* (hierba del toro)

*Verbesina persicifolia* de la familia de las Asteraceae (Tabla 5), cuyos nombres comunes son, Hierba del toro, Huichín, Huitzin, de acuerdo a CONABIO (2017), es un arbusto con hojas ligeramente alargadas, que miden hasta 14 cm de largo, sus flores crecen en grupos, formando cabezuelas, que se esparcen en la planta. Su origen es desconocido, habita en clima cálido y semicálido.

En México se distribuye principalmente en Nuevo León, San Luis Potosí, Puebla, Tlaxcala, Tabasco y Veracruz, popularmente, en la medicina mexicana, se le conoce como huichín o tlamacas, dependiendo de la región donde se encuentre (Biblioteca digital de plantas medicinales, 2009).

**Tabla 5.** Clasificación taxonómica de Hierba del toro.

<b>Reino</b>	Plantae
<b>Subreino</b>	Tracheobionta (plantas vasculares)
<b>Subdivisión</b>	Spermatophyta (plantas con semilla)
<b>División</b>	Magnoliophyta (plantas con flores)
<b>Clase</b>	Magnoliopsida (dicotiledóneas)
<b>Subclase</b>	Asteridae
<b>Orden</b>	Asterales
<b>Familia</b>	Asteraceae
<b>Genero</b>	<i>Verbesina L</i>
<b>Especia</b>	<i>Verbesina persicifolia</i>

USDA (2012).

De acuerdo a estudios etnobotánicos, esta planta, se encuentra dentro de las especies que se han utilizado de manera tradicional, con fines medicinales, se ha reportado que su extracto

acuoso, obtenido de flor y hoja, han presentado actividad hipoglicémica y bactericida (Domínguez *et al.*, 2015).

De acuerdo a la fitoquímica de este arbusto se han identificado compuestos del género *Verbesina*, tales como terpenoides, triterpenoides, flavonoides, saponinas y aceites esenciales, isoprenoides como los sesquiterpenos, monoterpenos, sin embargo no se ha investigado la actividad biológica de estos compuestos (López, 2015).

Varias especies del género *Verbesina* han sido evaluadas por diferentes propiedades. El extracto acuoso de *Verbesina encelioides* ha mostrado actividad antibacteriana y nematocida (López, 2015).

## **2.6. Metabolitos secundarios de plantas**

Los metabolitos secundarios son compuestos derivados del metabolismo primario (Shilpa *et al.*, 2010). Los metabolitos secundarios, son compuestos de bajo peso molecular, que no presentan una función definida en el crecimiento y en la reproducción de las plantas, pero cumplen roles importantes en el reino vegetal, como es la participación en los procesos de adaptación de las plantas a su ambiente. La síntesis activa de metabolitos secundarios se induce cuando las plantas son expuestas a condiciones adversas, tales como: el consumo por herbívoros (artrópodos y vertebrados), el ataque por microorganismos: virus, bacterias y hongos, la competencia por el espacio de suelo, la luz y los nutrientes, entre las diferentes especies de plantas y por la exposición a estrés abiótico. A lo largo de la historia, han sido utilizados como una fuente inagotable de compuestos químicos y sustancias activas complejas, que desde años han sido explotadas por el hombre (Torres, 2004; Sepulveda *et al.*, 2003).

## **2.7. Métodos de extracción de metabolitos secundarios**

En la actualidad, los métodos de extracción de metabolitos secundarios, a partir de plantas con actividad biológica, se basan en la polaridad, la solubilidad en agua y en la alteración de la solubilidad en base de sales y del pH. Los métodos de extracción, se deben elegir, basándose en el conocimiento de varias propiedades físicoquímicas del compuesto de interés. Estos incluyen coeficientes de partición en agua o disolventes orgánicos, la polaridad relativa en la molécula, la estabilidad de la molécula en luz u oscuridad, así como la temperatura para

el proceso de extracción. Si el compuesto de interés, es altamente soluble en agua, se emplea este líquido en frío o caliente, si el compuesto es altamente soluble en un disolvente orgánico en particular, lo empleamos para obtener el extracto (Cseke *et al.*, 2006).

## **2.8. Métodos cromatográficos en la separación de metabolitos secundarios**

De acuerdo a la Unión Internacional de Química Pura y Aplicada (IUPAC), la cromatografía, es un método físico de separación, en el cual, los componentes para ser separados, se distribuyen entre dos fases, una de ellas es estacionaria y otra móvil, la cual, se mueve en una dirección definida (McNair, 1998).

### **2.8.1. Cromatografía en columna**

En la cromatografía en columna, se utiliza un tubo cilíndrico angosto, en el interior se mantiene la fase estacionaria y a través de ella, se hace pasar, la fase móvil, ya sea con presión o por gravedad, de esta manera, la fase móvil, acarrea una mezcla, en la que se encuentra el analito (Skoog, 2000).

### **2.8.1. Cromatografía en capa fina**

En la cromatografía en capa fina, la muestra se aplica en forma de pequeñas gotas de solución en el borde de un soporte plano, ya sea de lámina de vidrio, plástico o aluminio, los cuales están recubiertos por una capa delgada de sílice o aluminio. Estas placas se sumergen en un disolvente que actúa como fase móvil o eluyente, el cual sube por la placa por capilaridad. Este movimiento consigue la separación por gravedad, al igual que la cromatografía en columna (Fox y Whitesell, 2000).

### 3. Justificación

Tanto las frutas como las hortalizas, son productos susceptibles a padecer diversas enfermedades por ataque de hongos, después de la cosecha y durante el almacenamiento, las enfermedades ocasionan severos daños, que afectan la calidad de los frutos, lo cual, puede provocar grandes pérdidas en el momento de su comercialización.

Comúnmente, el control de enfermedades postcosecha, se logra con el uso de fungicidas, sin embargo, su uso ha originado que la mayoría de los patógenos desarrollen resistencia, por lo que su efectividad disminuye o se anula con el paso del tiempo, además de la presencia de residuos tóxicos, que pueden afectar la salud de los seres vivos, incluyendo a los humanos y el medio ambiente.

Estos motivos han incrementado la necesidad de reducir los riesgos asociados con dichos compuestos químicos, incrementándose el interés por el uso y la aplicación de extractos vegetales, para el control de fitopatógenos, pues no afectan el medio ambiente, ya que sus residuos se degradan fácilmente y permiten mantener la calidad de los productos.

Se ha reportado que varias especies de plantas, que producen metabolitos secundarios, actúan como fungicidas naturales para el control de las enfermedades postcosecha, sus extractos vegetales pueden tener componentes individuales o mezclas de compuestos que pueden afectar a los patógenos.

Por tanto, en la presente investigación, se propone evaluar el efecto de los extractos vegetales de *Verbesina persicifolia* y *Allium sativum*, extraídos con diferentes disolventes, en el control del hongo *C. gloesporioides*, mediante una técnica *in vitro*, con el propósito de proponer su uso para el control de hongos en frutos.

## **4. Objetivos**

### **4.1 Objetivo general**

Determinar el efecto de los extractos de *Allium sativum* y *Verbesina persicifolia* en el desarrollo de *Collectotrichum gloesporioides* en mango y jitomate.

### **4.2 Objetivos específicos**

1. Obtener las cepas de *Collectotrichum gloesporioides* nativas de mango y de jitomate en medio de cultivo PDA.
2. Obtener los extractos de las plantas *Verbesina persicifolia* y *Allium sativum* con diferentes solventes (metanol, acetona, acetato de etilo, etanol y agua) y determinar su efecto contra *C. gloesporioides* en medios de cultivo.
3. Fraccionar por cromatografía en columna los extractos con mayor actividad antifúngica y obtener colecciones a partir de cromatografía en placa fina para determinar su efecto contra *C. gloesporioides* en medios de cultivo.
4. Determinar el efecto de las colecciones de *A. sativum* y *V. persicifolia* en jitomate y en mango.

## **5. Materiales y métodos**

### **5.1 Materiales**

#### **5.1.1 Material biológico**

La evaluación del efecto antifúngico, se realizó con extractos obtenidos a partir de dos especies de plantas, una de ellas conocida con el nombre de *Verbesina persicifolia* (planta del toro), procedente del estado de Veracruz y *Allium sativum* (ajo), procedente de la central de abastos de la ciudad de Pachuca Hidalgo.

Para la obtención de cepas fúngicas se utilizó mango de la variedad Ataulfo y jitomate saladette, adquiridos en la central de abastos de la ciudad de Pachuca, Hidalgo.

#### **5.1.2 Cepas fúngicas**

Las cepas de *Colletotrichum gloeosporioides*, utilizadas para este estudio, se obtuvieron a partir de aislamientos de frutos de mango y de jitomate, afectados por Antracnosis.

#### **5.1.3 Medios de cultivo**

Agar papa dextrosa (PDA) marca Dixon.

#### **5.1.4 Reactivos y disolventes**

Agua destilada, acetato de etilo (J, T. Baker, USA), acetona (J, T. Baker, USA), metanol (J, T. Baker, USA), etanol (J, T. Baker, USA), hexano (J, T. Baker, USA), y tween 80.

#### **5.1.5 Equipos**

Autoclave eléctrica (Yamato, SM 200, Japón), balanza analítica (OHAUS, USA), bomba de vacío (BUCHI, Vacuum pump V.), incubadora bacteriológica (Lab-line, Ambi Hi Low Chamber, USA), parrilla eléctrica (Cimarec, USA), refrigerador (Vendo, México), evaporador rotatorio (BUCHI, rotavapor R-215, Suiza), lámpara de luz ultravioleta (Entela U.V., U. S. A. ).

## **5.2 Métodos**

### **5.2.1 Obtención de las cepas fúngicas**

El aislamiento y purificación de *C. gloeosporioides*, se llevó a cabo por siembra directa de micelio, de cada uno de los frutos infectados, en medios de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA), siguiendo el procedimiento descrito por Gómez (2002) y Pardo-De la Hoz (2016), con modificaciones. Se limpió con hipoclorito de sodio, el contorno del área, con las características de la infección y se realizó un raspado, con asa estéril, después se inoculó en medio PDA y se incubó a  $28\pm 2$  °C, por 5 días, hasta observar el desarrollo en las cajas. Para obtener cultivos puros se transfirió una pequeña porción de la colonia, con un asa micológica y se sembró por agotamiento en una caja Petri con PDA. Se llevó a incubar a  $28\pm 2$  °C hasta que se observó la germinación de una espora, inmediatamente se resembró en PDA, hasta obtener el desarrollo del hongo.

### **5.2.2 Microcultivo en portaobjetos**

En el fondo de una placa Petri se colocaron dos pequeños palillos de vidrio que sirvieron de soporte para el portaobjetos. Sobre el portaobjetos se colocó un pequeño cuadro de agar PDA, en los cuatro sitios del cuadro de agar se inoculó una pequeña porción de la colonia del hongo. Para mantener la humedad se pipeteó una pequeña cantidad de agua en el fondo de la placa, se incubó a 37° C por tres días. Al tener un crecimiento visible se separó el bloque de agar del portaobjetos, y se fijó con calor para posteriormente colocar una gota de azul de lactofenol, y se observó en el microscopio óptico empleando un aumento de 100x con uso de aceite de inmersión.

### **5.2.3 Identificación morfológica**

Para la evaluación de estas variables morfológicas, se realizaron observaciones macroscópica y microscópica a cada aislamiento, en medios de cultivo PDA. A nivel colonial, se determinó el color de las masas conidiales, aspecto del micelio, la presencia o ausencia de acérvulos o setas. Para la observación microscópica, a partir del microcultivo, se tuvo en cuenta la forma de los conidios, la disposición de las hifas y de los septos de estas. Estas variables morfológicas, fueron evaluadas, teniendo como referencia lo establecido en estudios previos (Than *et al.*, 2008).

#### **5.2.4 Prueba de patogenicidad**

Para probar la patogenicidad de los hongos, se procedió de la siguiente manera: frutos de mango y de jitomate, sanos, se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1%, se provocaron heridas sobre la superficie del fruto con una navaja estéril, en estas, se depositó una asada de micelio de una cepa monospórica, se hicieron tres repeticiones para cada una de las cepas obtenidas de ambos frutos. Los frutos inoculados, se colocaron en una caja, cubierta con bolsa de polietileno, para inducir una condición de cámara húmeda y desarrollar la enfermedad. Se midió el diámetro de las lesiones a los 4, 8, 12 y 16 días, después de la inoculación.

#### **5.2.5 Extracto de *Verbesina persicifolia* (Hierba del toro)**

Para la obtención de los extractos crudos, se empleó la metodología de Cruz *et al.*, (2012), el material vegetal seco, se colocaron 10 g del material vegetal, en diferentes matraces de vidrio, en condiciones asépticas, se les agregaron diferentes solventes (metanol, etanol, acetato de etilo, acetona y agua destilada), en una proporción 1:10 y se dejaron en maceración, durante siete días, manteniéndolos tapados y en la oscuridad, con agitación diaria. Posteriormente, el material vegetal se retiró del solvente y se filtró a vacío. El solvente se retiró del extracto en rotavaporador a 40 °C a 80-90 rpm.

#### **5.2.6 Extracto de *Allium sativum* (Ajo)**

Para la obtención de los extractos crudos, se empleó la metodología con modificaciones de Cruz *et al.* (2012), el material vegetal se puso a secar en una estufa, a 40 °C durante 24 h, se utilizaron bulbos enteros y bulbos triturados en mortero, se colocaron 30 g de ajo en diferentes matraces de vidrio, en condiciones asépticas, se les agregaron diferentes solventes (metanol, etanol, acetato de etilo, acetona y agua destilada), en una proporción 1:10 y se dejaron en maceración, durante siete días, manteniéndolos tapados y en la oscuridad, con agitación diaria. Posteriormente el material vegetal se retiró del solvente y se filtró a vacío. El solvente se retiró del extracto en rotavaporador a 40 °C a 80-90 rpm.

#### **5.2.7 Efecto de los extractos vegetales sobre el crecimiento de *C. gloesporioides***

A partir de cultivo monospórico, se sembró el hongo en cajas Petri, con medio de cultivo PDA y cloranfenicol al 1%. Con un asa micológica se tomó una parte del micelio y se sembró

en el centro de la caja, después de la siembra se colocaron 10 µL del extracto mezclado con Tween 80 al 20 % en una proporción 1:10, sobre cada punción (modificado de Cruz *et al.*, 2012), las cajas se mantuvieron en una incubadora a 25°C por cinco días, cada extracto se consideró como un tratamiento, con tres repeticiones, incluyendo al testigo, que consistió en cajas inoculadas con los hongos sin extracto, se midió el crecimiento micelial radial, de acuerdo a la metodología descrita por Guerrero *et al.*, (2007) con un vernier digital, se midió el diámetro ecuatorial del hongo, cada 24 horas durante 5 días.

El resultado se interpretó como porcentaje de inhibición y se determinó mediante la siguiente formula (Tequida *et al.*, 2002), en base al diámetro de las colonias y al testigo, restándole el porcentaje de crecimiento del testigo por día, considerándolo como el 100% del crecimiento del hongo.

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{\text{Diámetro del crecimiento del hongo en el extracto}}{\text{Diámetro del control negativo}} * 100$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ de crecimiento}$$

Se seleccionaron los extractos que presentaron mayor efecto antifúngico para futuras evaluaciones.

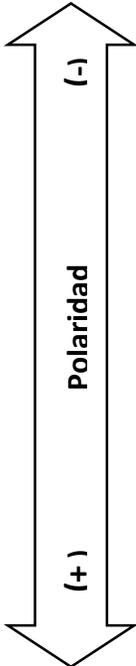
### **5.2.8 Obtención de las fracciones cromatográficas a partir de los extractos con mayor actividad antifúngica mediante cromatografía en columna.**

Una vez que se ha obtenido el extracto seco (libre de solventes), este se mezcló con sílice (con el fin de hacer manejable el extracto y eliminar el excedente de humedad), este se agregó a la columna empaquetada (Figura 1).

Se sujetó la columna con dos pinzas y se aseguró de tal manera que estuviera recta. Se colocó algodón en el fondo, con ayuda de una varilla, para evitar que se desprendiera el gel de sílice, cuando se abría llave. Se mezcló el gel sílice con hexano aproximadamente 8:1 g. Esta cantidad se mezcló con hexano hasta obtener una pasta fluida, se vertió la pasta en la columna, la cantidad de hexano agregada, debió ser la suficiente, para evitar que la sílice se secase o ingresara aire a la pasta, posteriormente se agregó poco a poco el extracto, se le agregó una pequeña capa de sulfato de sodio (como secante), encima de este, se le puso una

capa de algodón para amortiguar la caída del solvente al ser agregado y así evitar la dispersión del sulfato de calcio y del extracto, después de este procedimiento, se llenó la columna con el disolvente (hexano) y se abrió la llave para comenzar a bajar fracciones con las diferentes mezclas de solventes (Tabla 6), recuperándolas en cantidades de 100 mL cada una, que posteriormente se evaporaron con ayuda del rota vapor a 40 °C a 80-90 rpm y estas fueron colocadas en viales, considerando cada una de estas como fracción (Cruz *et al.*, 2012).

**Tabla 6.** Mezclas de disolventes utilizadas en cromatografía en columna.

	<b>Disolvente</b>	<b>Concentración</b>
	Hexano	100%
	Hexano-Acetato	90-10%
	Hexano-Acetato	80-20%
	Hexano-Acetato	70-30%
	Hexano-Acetato	60-40%
	Hexano-Acetato	50-50%
	Hexano-Acetato	40-60%
	Hexano-Acetato	30-70%
	Hexano-Acetato	20-80%
	Hexano-Acetato	10-90%
	Acetato	100%
	Acetato-Metanol	90-10%
	Acetato-Metanol	80-20%
	Acetato-Metanol	70-30%
	Acetato-Metanol	60-40%
	Acetato-Metanol	50-50%
	Acetato-Metanol	40-60%
	Acetato-Metanol	30-70%
	Acetato-Metanol	20-80%
	Acetato-Metanol	10-90%
Metanol	100%	

### 5.2.9 Obtención de colecciones a partir de cromatografía en placa fina.

Una vez obtenidas las fracciones, con todas las polaridades seleccionadas, se procedió a hacer colecciones de las mismas, con el fin de agrupar compuestos iguales o similares en una misma mezcla, esto se hizo por medio de cromatografía en capa fina (Figura 2), se utilizaron placas de sílica gel, usando como fase móvil, las mezclas de solventes utilizadas en la cromatografía en columna (Tabla 6), para revelar las cromatoplasmas se utilizó luz ultravioleta (Cruz *et al.*, 2012).

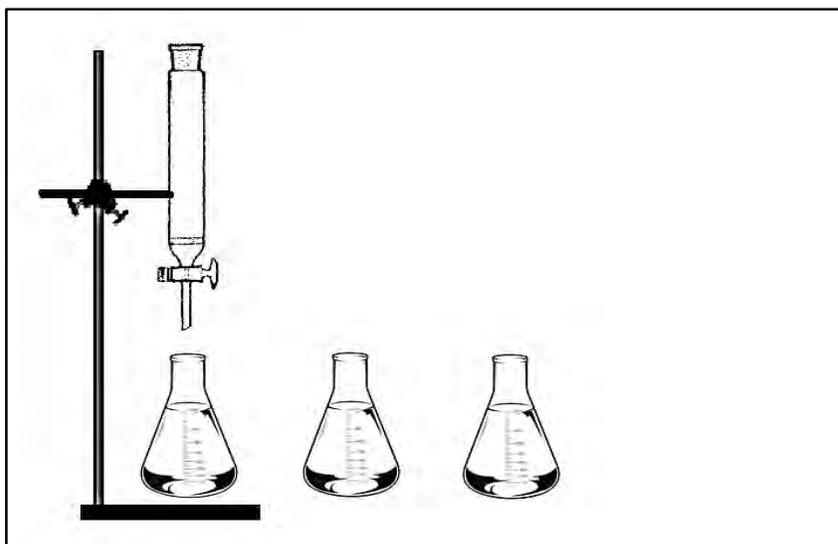


Figura 1. Cromatografía en columna

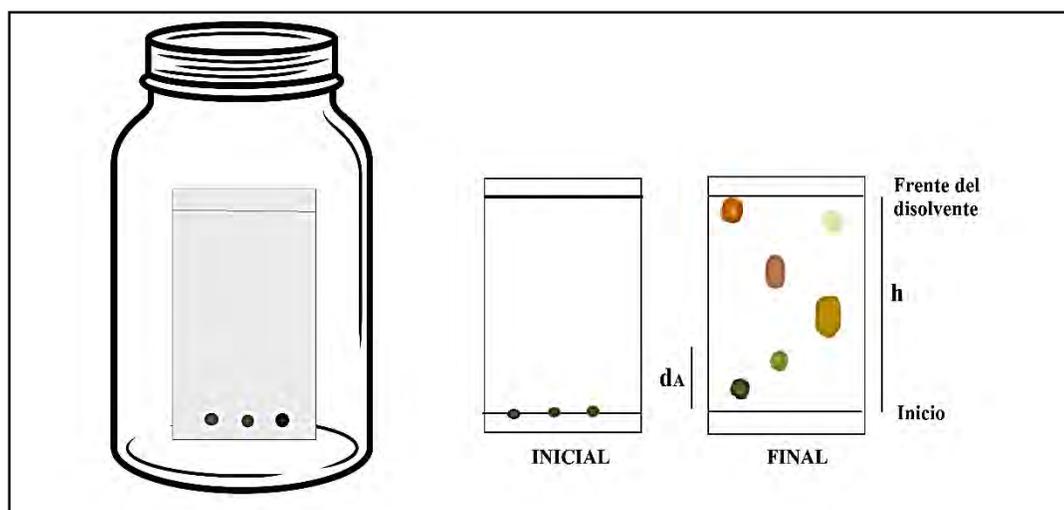


Figura 2. Cromatografía en capa fina

#### **5.2.10 Porcentaje de inhibición de *A. sativum* y *V. persicifolia* sobre *C. gloesporioides* en medios de cultivo.**

Se sembró cada hongo en cajas Petri con PDA y cloranfenicol al 1%, a partir de un cultivo monospórico, sobre cada punción, se colocaron 10 µL de cada colección, preparada con Tween 80 al 20%, en una proporción 1:10, considerando a cada una como un tratamiento con tres repeticiones incluyendo al testigo (modificado de Cruz *et al.*, 2012). Las cajas se incubaron a 25°C, durante cinco días, midiendo con la ayuda de un vernier, el crecimiento micelial radial de los hongos cada 24 h, calculando el porcentaje de inhibición diariamente.

#### **5.2.11 Porcentaje de inhibición de *A. sativum* y *V. persicifolia* sobre *C. gloesporioides* en fruto de mango y de jitomate.**

Se seleccionaron frutos en madures comercial (coloración del fruto verde oscuro), aparentemente sanos, provenientes de la central regional de abastos de la ciudad de Pachuca, Hidalgo.

Cada fruto fue lavado con una solución al 2 % de hipoclorito de sodio y agua destilada estéril, el fruto se puso a secar a temperatura ambiente. Se preparó una suspensión de conidios del hongo *C. gloesporioides* con una concentración de conidios  $1 \times 10^6$  conidios/ml. Se seleccionaron dos áreas en cada fruto y se procedió a inocular los frutos, mediante un sistema de herida superficial sobre la cascara, con un alfiler estéril, posteriormente sobre las heridas se inocularon 10 µL de  $1 \times 10^6$  conidios/ml de *C. gloesporioides*; después de 20 minutos se procedió a colocar sobre la herida 10 µL de las colecciones que presentaron mayor actividad antifúngica *in vitro*. Considerando las colecciones como tratamiento con tres repeticiones incluyendo al testigo (Guerrero *et al.*, 2007).

Los frutos, se mantuvieron en condiciones normales de almacenaje (cajas de cartón) durante 15 días; se midió diariamente el crecimiento del desarrollo micelial, en las heridas artificialmente inoculadas.

### 5.2.12 Severidad de infección de *C. gloesporioides* sobre jitomate y mango tratados con las colecciones de *A. sativum* y *V. persicifolia* de mayor porcentaje inhibitorio.

Se seleccionaron doce frutos, a los cuales, se les aplicó sobre la superficie como tratamiento: una concentración conocida de las colecciones de *A. sativum* y *V. persicifolia* que presentaron mayor actividad en el sistema *in vitro*, como testigo, se aplicó agua destilada estéril, en cada tratamiento se utilizaron cuatro frutos. Una vez aplicados los tratamientos, se inocularon con 10  $\mu$ L de  $1 \times 10^6$  conidios/mL de *C. gloesporioides*, por deposición, en la superficie de los frutos de mango y de jitomate. Estos se mantuvieron a condiciones de almacenamiento durante 12 días. A los 21 días se repitió una segunda evaluación, para determinar el efecto de las colecciones de extracto, en el desarrollo de síntomas causados por *C. gloesporioides*. Las evaluaciones fueron cualitativas, para esto, se desarrolló una escala visual, para medir el grado de infección del hongo (Tabla 7).

**Tabla 7.** Escala para evaluar la severidad de antracnosis en frutos, según % de superficie afectada.

Grado de daño	Descripción
0	Fruto totalmente sano sin indicios de infección
1	Indicios de infección, daños apenas visibles máximo 2 manchas menores a 2mm
2	Menos del 5% del área dañada
3	Hasta 12.5% del área dañada (1/8)
4	Hasta un 25% del área dañada (1/4)
5	Hasta un 50% del área dañada (1/2)
6	Más del 50% del área dañada

## **6. Análisis estadístico**

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente con un análisis de varianza de una sola vía (ANOVA) y la comparación de medias con la prueba de Tukey, con un nivel de significancia de ( $P=0.05$ ), se realizó con el programa estadístico SPSS, y los gráficos se realizaron mediante el programa sigma plot.

## 5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 5.1 Obtención de las cepas fúngicas

Los síntomas manifestados en mango fueron típicas de antracnosis, presentaron manchas hundidas de color café oscuro a negro. En jitomate la lesión consistió en lesiones hundidas y redondas de color negro en el centro, con micelio blanco en los borde (Figura 3).



**Figura 3.** Síntomas típicos de antracnosis causados por *Collectotricum gloesporioides*, a) Mango b) Jitomate.

De acuerdo a las características morfológicas observadas, se identificaron como *Collectotricum gloesporioides*, un total de 32 aislamientos en medio PDA, provenientes de las lesiones necróticas de mango y 10 aislamientos de jitomate infectados, de los cuales, se recuperaron las cepas identificadas como M1A, M1C y M1D en mango y J1C en jitomate.

En el diagnóstico dado por la observación de las colonias, en placas Petri con medio PDA, se obtuvieron colonias con morfología variable y esta variabilidad dependió de cada hospedero. Las colonias provenientes del mango, presentaron micelio aéreo, abundante, algodonoso, algunos presentaron masas de conidios distribuidas en toda la colonia y puntos negros, el micelio blanco se tornó a un color gris, visto desde la parte superior de las cajas Petri, mientras que la vista al reverso de la caja, parecía color marrón oscuro, con borde cremoso, estas características son similares a lo ya reportado por Onyeani *et al.*, (2012) y Barquero *et al.* (2013).

Las colonias que se obtuvieron del jitomate, formaron micelio aéreo blanquecino, de consistencia ligeramente algodonosa, masas de conidios ligeramente rosados, semejantes a las cepas obtenidas por Martínez en 2015.

Las variaciones en humedad relativa y temperatura ya sea en las zonas productoras de mango y jitomate, o bien durante su manejo, podrían conducir a cambios en las poblaciones de *C. gloeosporioides* en los frutos.

De acuerdo a lo observado al microscopio, se encontraron conidios con formas oblongo, ligeramente curvados con forma de pesa, con extremos obtusos, variables en tamaño, conidióforos hialinos y poseen hifas septadas, estas características morfológicas concuerdan con lo ya reportado por varios autores (Rhaiem y Taylor, 2016; Gyu *et al.*, 2009; Xie *et al.*, 2010).

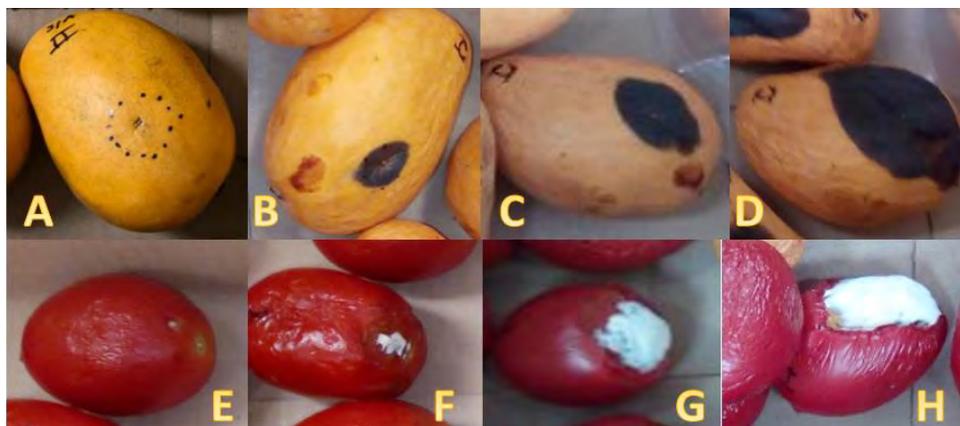
Esta variación en la morfología de las colonias depende del medio de cultivo, de la humedad y de la temperatura, entre otros factores, Contreras, 2006 también reporto variaciones entre el género *Colletotrichum*.

### **5.1.1 Prueba de patogenicidad**

El mango y el jitomate, al ser inoculados con *C. gloeosporioides*, previamente aislados, indujeron la aparición de síntomas típicos. En el mango inoculado, los primeros síntomas se identificaron al día 4, como puntos necróticos de color marrón, los cuales, posteriormente, pasaron a negro, ocasionando hundimiento en la zona central y fueron invadiendo el fruto al paso de los días (Figura 4).

En jitomate, las lesiones iniciales presentaron necrosis, con poco micelio blanquecino en el centro, las cuales fueron incrementándose, hasta invadir todo el fruto. El patógeno fue recuperado del tejido infectado, lo que demuestra que esta especie es el agente infeccioso de antracnosis para mango y jitomate.

En los frutos de mango y de jitomate evaluados, al igual que en otros frutos, las condiciones de maduración del fruto, la temperatura y la humedad, favorecen el desarrollo del hongo, la humedad de los tejidos, permite que el conidio germine, forme apresorio y se desarrolle la enfermedad, tal como lo describe Arauz (2000).



**Figura 4.** Patogenicidad de cepas de *C. gloesporioides* inoculados en mango y jitomate: a y e) 4 días después de inoculación; b y f) 8 días después de inoculación; c y g) 12 días después de inoculación; d y h) 16 días después de inoculación.

## 5.2 Obtención de extractos

En la tabla 8, se presentan los extractos obtenidos a partir de las dos plantas, teniendo un total de 11 tratamientos diferentes, los cuales fueron evaluados para determinar su efecto sobre el crecimiento y desarrollo del hongo *C. gloesporioides*. A cada tratamiento se le asignó una abreviatura para representarlo en este trabajo.

Los extractos de *Allium sativum* han mostrado efecto antibacteriano contra diversos grupos de bacterias como *E. coli*, *L. monocytogenes*, *S. aureus*, *P. aeruginosa* y *S. Typhi* (Lu *et al.*, 2011; Irerere y Igeleke, 2012), así como contra hongos como *P. capsici* (Li y Zhihui, 2009) y parásitos (Hang-Kyung, 2012). Siendo los estudios contra hongos escasos, es por eso que se realizó la evaluación de estos extractos sobre cepas causantes de antracnosis en frutos de mango y de jitomate. De igual forma, el efecto antifungico de extractos de la planta *Verbesina persicifolia*, no ha sido evaluado, motivo por el cual se seleccionaron estos materiales vegetales para estudiar su efecto contra los hongos de interés.

**Tabla 8.** Especies de plantas utilizadas para la obtención de los extractos bajo estudio.

Especie vegetal	Disolvente	Parte de la planta	Tratamiento
<i>Allium sativum</i>	Metanol	Bulbo	ASM <sup>1</sup>
	Etanol	Bulbo	ASE <sup>2</sup>
	Acetato de etilo	Bulbo	ASAE <sup>3</sup>
	Acetona	Bulbo	ASA <sup>4</sup>
	Agua	Bulbo	ASAC <sup>5</sup>
<i>Verbesina persicifolia</i>	Metanol	Hoja	VPM <sup>6</sup>
	Etanol	Hoja	VPE <sup>7</sup>
	Acetato de etilo	Hoja	VPAE <sup>8</sup>
	Acetona	Hoja	VPA <sup>9</sup>
	Agua	Hoja	VPAC <sup>10</sup>

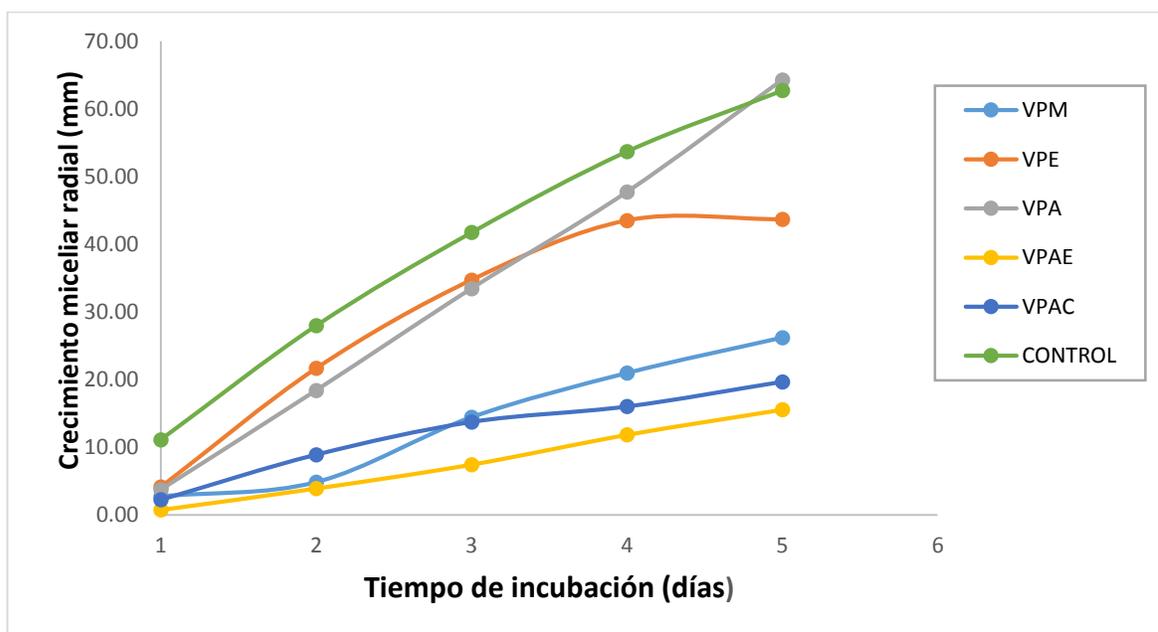
<sup>1</sup> Extracto metanólico de *Allium sativum*; <sup>2</sup> extracto etanólico de *Allium sativum*; <sup>3</sup> extracto de acetato de etilo de *Allium sativum*; <sup>4</sup> extracto acetónico de *Allium sativum*; <sup>5</sup> extracto acuoso de *Allium sativum*; <sup>6</sup> extracto metanólico de *Verbesina persicifolia*; <sup>7</sup> extracto etanólico de *Verbesina persicifolia*; <sup>8</sup> extracto de acetato de etilo de *Verbesina persicifolia*; <sup>9</sup> extracto acetónico de *Verbesina persicifolia*; <sup>10</sup> extracto acuoso de *Verbesina persicifolia*.

### 5.3 Efecto de los extractos sobre el crecimiento de *C. gloesporioides*

Los extractos vegetales descritos en la Tabla 8, se utilizaron como tratamientos para evaluar el efecto que presentan estos contra el desarrollo y crecimiento de los hongos anteriormente aislados en cultivos *in vitro*, las mediciones se realizaron cada 24 h, durante 5 días. El promedio de los valores obtenidos de las tres repeticiones (mm), se graficó en una cinética de crecimiento. El porcentaje de inhibición se calculó con los valores obtenidos al final del crecimiento micelial. Para la interpretación de los resultados, se consideraron activos los extractos con un porcentaje de crecimiento menor o igual a 80 y un porcentaje de inhibición mayor o igual al 20 (Márquez *et al.*, 2007).

Las Figuras 5 y 6, muestran los efectos de inhibición del crecimiento de las cepas de *C. gloesporioides* aisladas de mango y de jitomate en medio de cultivo, tratados con extractos

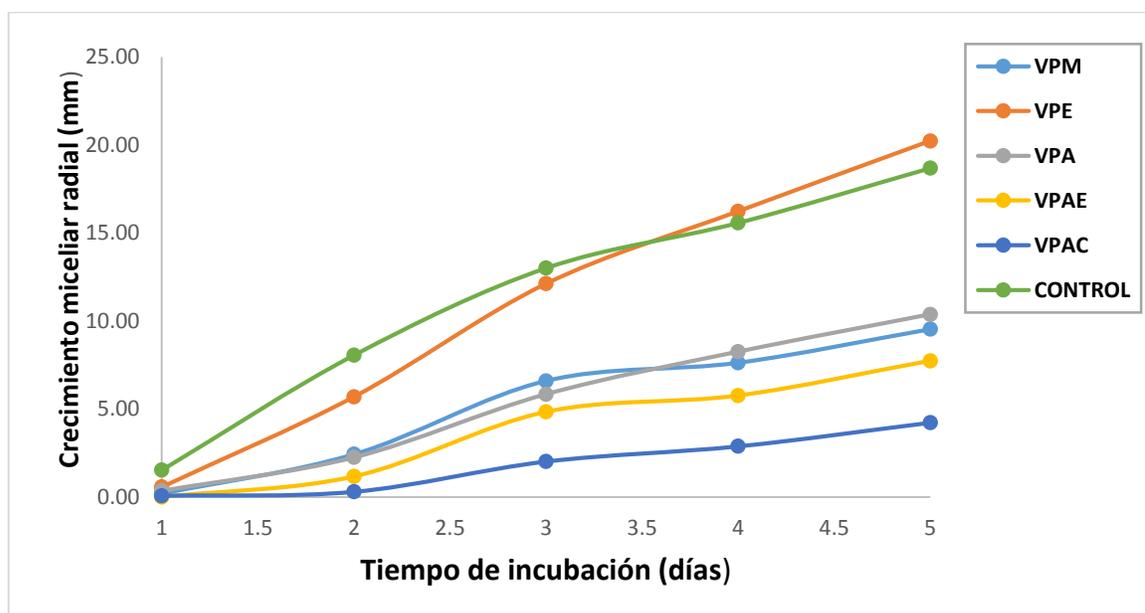
de *V. persicifolia*. Observándose que los tratamientos VPAE, VPAC y VPM (Figura 5) presentaron un efecto estadísticamente significativo, expresado como una mayor actividad contra el hongo aislado de jitomate, impidiendo su crecimiento. Cabe destacar que el extracto VPE, aunque presentó inhibición, esta no fue significativa, mientras que el extracto VPA no tuvo efecto, siendo el extracto de acetato de etilo (VPAE), el que presentó el mayor porcentaje de inhibición (75%) a los 5 días.



**Figura 5.** Cinética de crecimiento micelial radial de *C. gloesporioides* aislado de jitomate tratado con extractos de *V. persicifolia*. **VPM (Extracto metanólico de *V. persicifolia*); VPE (Extracto etanólico de *V. persicifolia*); VPA (Extracto Acetónico de *V. persicifolia*); VPAE (Extracto de acetato de etilo de *V. persicifolia*) y VPAC (Extracto acuoso de *V. persicifolia*)**

Las cinéticas de crecimiento del hongo aislado del mango (Figura 6), muestran que el extracto VPE tuvo el menor efecto inhibitorio, mientras que el extracto VPAC, tuvo el mayor efecto, inhibiendo el crecimiento, mostrando diferencias estadísticamente significativas respecto al testigo, aunque la inhibición del crecimiento de los extractos VPM y VPAE fue menor que la del extracto acuoso, también presentaron una diferencia significativa con respecto a la inhibición del crecimiento de los extractos VPA, VPE y del control.

Los extractos VPAC, VPM y VPAE, presentaron efecto inhibitorio desde el primer día y aunque el efecto disminuyó conforme paso el tiempo, en el quinto día, mantuvieron dicho efecto en un 79, 48 y 45%, respectivamente. En general, se observó una variabilidad del efecto de los extractos, según el disolvente de extracción utilizado, la variabilidad, también se mostró entre las cepas aisladas.

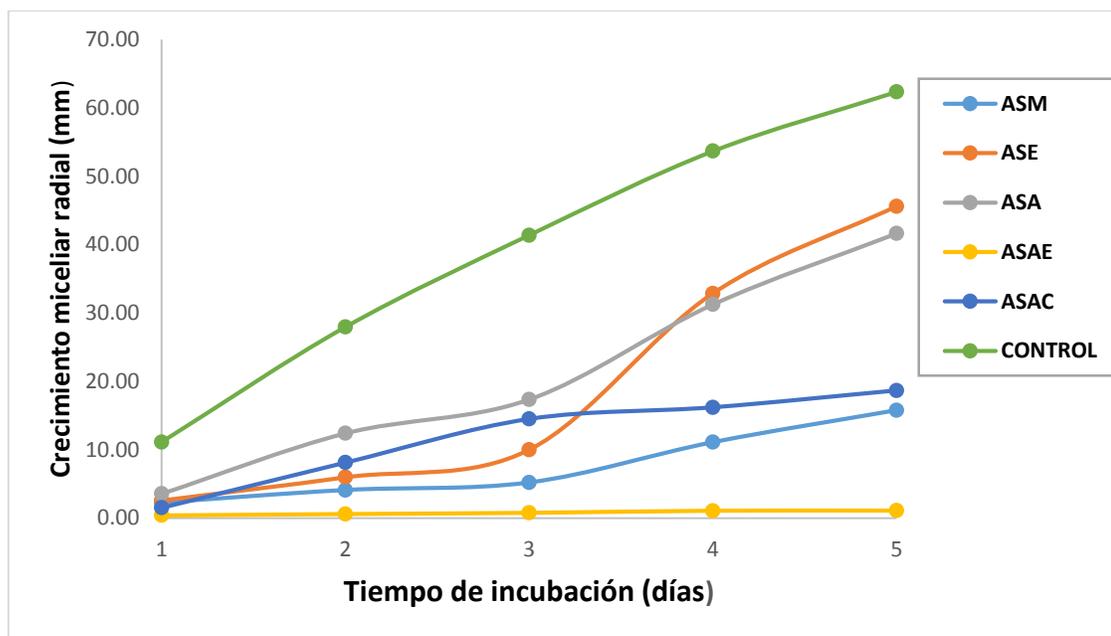


**Figura 6.** Cinética de crecimiento micelial radial de *C. gloesporioides* aislado de mango tratado con extractos de *V. persicifolia*. VPM (Extracto metanólico de *V. persicifolia*); VPE (Extracto etanólico de *V. persicifolia*); VPA (Extracto Acetónico de *V. persicifolia*); VPAE (Extracto de acetato de etilo de *V. persicifolia*) y VPAC (Extracto acuoso de *V. persicifolia*).

Hasta el momento de evaluar los resultados obtenidos del efecto inhibitorio del crecimiento de los hongos *C. gloesporioides*, aislados de mango y de jitomate de los extractos de *V. persicifolia*, no había sido reportado ningún estudio previo con esta planta, siendo este el primero en realizarse, los resultados obtenidos resultaron interesantes, ya que se aprecia que los extractos de esta planta presentan efecto fungistático, siendo la cepa más afectada la aislada de mango, esto muestra que la actividad de los componentes de *V. persicifolia* no es la misma para cada hospedero.

En las **figuras 7 y 8** se muestran los resultados obtenidos a partir de las cepas aisladas del mango y del jitomate, tratados con los diferentes extractos de ajo (*Allium sativum*). Se observó, que aunque todos los extractos tenían efecto inhibitorio en el crecimiento del hongo, el extracto ASAE presentó la mayor inhibición desde el primer día, los extractos ASM y ASAC, también presentaron inhibición, incluso hasta el quinto día, sin embargo, los extractos ASE y ASA, cuya inhibición fue semejante a ASM y ASAC, en el primer día, se observó que después del tercer día perdieron esta capacidad (Figura 7). El porcentaje inhibitorio de ASAE, fue el mayor (98%) al quinto día, mientras que para ASM y ASAC, el porcentaje inhibitorio fue de 74 y 70%, respectivamente.

**Figura 7.** Cinética de crecimiento micelial radial de *C. gloesporioides* aislado de jitomate tratado con extractos de *A. sativum*.

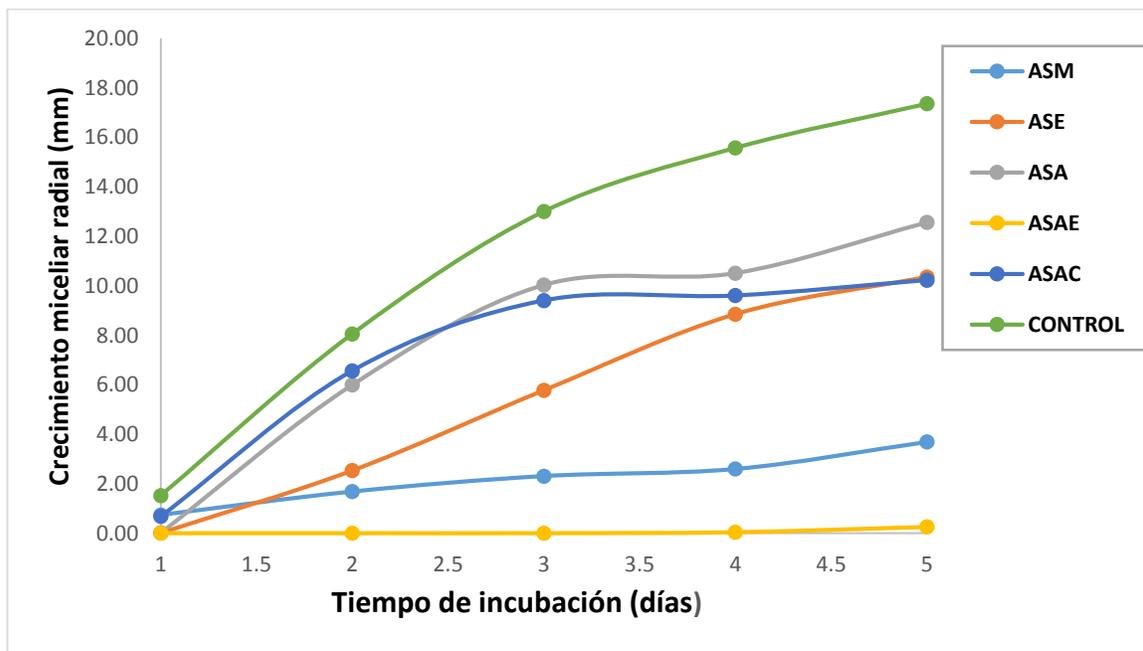


ASM (Extracto metanólico de *A. sativum*); ASE (Extracto etanólico de *A. sativum*); ASA (Extracto acetónico de *A. sativum*); ASAE (Extracto de acetato de etilo de *A. sativum*) y ASAC (Extracto acuoso de *A. sativum*).

Con respecto a las cepas aisladas de mango, todos los extractos presentaron efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo, siendo ASA el de menor efecto a partir del tercer día de incubación, lo cual muestra diferencias estadísticamente significativas con respecto a los extractos ASAE y ASM, cuyo crecimiento se vio inhibido desde el día uno, mientras que

para ASAC y ASA, el crecimiento se vio afectado a partir del día 3, lo cual muestra el efecto inhibitorio de *Allium sativum* (Figura 8).

Por la concentración de inhibición que presentó el tratamiento ASAE en el día 5, se presume que la acción antifúngica del extracto permanece durante estos días; ya que su poder inhibitorio solo disminuye en un 2% durante estos días, aunque para ASM y ASAC, el porcentaje inhibitorio fue menor en el día 5, mantuvieron efecto con porcentajes de inhibición del 78 y 41%, respectivamente. Sin embargo, en otros estudios, estos porcentajes de inhibición fueron mayores, como el realizado por Li and Cheng (2009), donde el extracto de ajo triturado afectó el crecimiento micelial de *P. capsici*, desde un 76.28% y hasta un 100% de inhibición, usando una concentración de 150 mg/mL del extracto acuoso, esto puede diferir, dependiendo de la concentración del extracto, pH del medio de cultivo, las condiciones ambientales e incluso el hongo que se está evaluando, entre otros.



**Figura 8.** Cinética de crecimiento micelial radial de *C. gloesporioides* aislado de mango tratado con extractos de *A. sativum*. ASM (Extracto metanólico de *A. sativum*); ASE (Extracto etanólico de *A. sativum*); ASA (Extracto acetónico de *A. sativum*); ASAE (Extracto de acetato de etilo de *A. sativum*) y ASAC (Extracto acuoso de *A. sativum*).

El efecto de inhibición de los extractos de Ajo (*Allium sativum*) puede ser atribuido a la presencia de compuestos volátiles y a la alicina, formada durante la obtención del extracto, tal y como lo demostró en su trabajo Gándara (2015), en el que los compuestos volátiles, la alicina y su derivado DATS en el extracto de ajo, tuvieron un efecto inhibitorio sobre la germinación de conidios de *B. cinerea* y en el desarrollo *in vitro* de moho gris sobre uvas de mesa. Baron y Tansey (1977), reportaron que la alicina se transforma en compuestos disulfuro, cuando los bulbos de ajo se dañan y los compuestos volátiles actúan como componentes fungistáticos o fungicidas, que alteran el metabolismo de las células fúngicas debido a la oxidación de las proteínas.

#### **5.4 Obtención de las fracciones cromatográficas a partir de los extractos con mayor actividad antifúngica mediante cromatografía en columna.**

Los extractos de acetato de etilo de *A. sativum* y de *V. persicifolia*, fueron los que mayor efecto inhibitorio tuvieron sobre los hongos aislados, Para esta evaluación, se obtuvieron solamente extractos de ambas plantas con acetato de etilo, para posteriores evaluaciones, los extractos fueron fraccionados mediante cromatografía en columna, donde se mezcló el extracto con sílica gel y fue colocada en la columna, por la cual se hicieron pasar disolventes de diferentes polaridades (hexano, acetato de etilo, metanol), posteriormente se recuperaron fracciones de 100 mL, los cuales fueron evaporados en rotaevaporador para posteriormente colocarlos en viales de vidrio.

Para el extracto de *A. sativum*, se obtuvieron un total de 431 fracciones (Tabla 9), las fracciones recuperadas fueron reunidas en colecciones, empleando cromatografía en capa fina para identificar las fracciones que presentaban un perfil de elución similar, logrando obtener un total de VII colecciones (Tabla 10). Para el extracto de *V. persicifolia*, se obtuvieron 765 fracciones en total (Tabla 11), que fueron agrupadas en XIII colecciones (Tabla 12).

**Tabla 9.** Fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo de *A. sativum*

<i>Fracción</i>	<i>Concentración de disolvente</i>
1-35	Hexano 100%
36-71	Hexano 90%-acetato de etilo 10%
72-107	Hexano 80%-acetato de etilo 20%
108-143	Hexano 70%-acetato de etilo 30%
144-179	Hexano 60%-acetato de etilo 40%
180-215	Hexano 50%-acetato de etilo 50%
216-251	Hexano 40%-acetato de etilo 60%
252-287	Hexano 30%-acetato de etilo 70%
288-323	Hexano 20%-acetato de etilo 80%
324-359	Hexano 10%-acetato de etilo 90%
360-395	Acetato de etilo 100%
396-431	Acetato de etilo 90%-Metanol 10%

**Tabla 10.** Colecciones obtenidas a partir de cromatografía en placa fina de extracto de acetato de etilo de *A. Sativum*

<b>Colección</b>	<b>Fracción</b>	<b>Polaridad</b>
I	1-39	Hexano 100%
II	40-62	9:1 Hexano - Acetato
III	63-107	9:1-8:2 Hexano - Acetato
IV	108-150	7:3-6:4 Hexano - Acetato
V	151-251	6:4-5:5-4:6 Hexano - Acetato
VI	252-359	3:7-1:9 Hexano – Acetato
VII	360-431	100% Acetato-9:1 9:1 Acetato-Metanol

**Tabla 11.** Fracciones obtenidas del extracto de acetato de etilo de *V. Persicifolia*.

<i>Fracción</i>	<i>Concentración de disolvente</i>
1-35	Hexano 100%
36-71	Hexano 90%-acetato de etilo 10%
72-107	Hexano 80%-acetato de etilo 20%
108-143	Hexano 70%-acetato de etilo 30%
144-179	Hexano 60%-acetato de etilo 40%
180-215	Hexano 50%-acetato de etilo 50%
216-251	Hexano 40%-acetato de etilo 60%
252-287	Hexano 30%-acetato de etilo 70%
288-323	Hexano 20%-acetato de etilo 80%
324-359	Hexano 10%-acetato de etilo 90%
360-395	Acetato de etilo 100%
396-431	Acetato de etilo 90%-Metanol 10%
432-467	Acetato de etilo 80%-Metanol 20%
468-503	Acetato de etilo 70%-Metanol 30%
504-539	Acetato de etilo 60%-Metanol 40%
540-575	Acetato de etilo 50%-Metanol 50%
576-611	Acetato de etilo 40%-Metanol 60%
612-647	Acetato de etilo 30%-Metanol 70%
648-683	Acetato de etilo 20%-Metanol 80%
684-719	Acetato de etilo 10%-Metanol 90%
720-765	Metanol 100%

**Tabla 12.** Colecciones obtenidas a partir de cromatografía en placa fina de extracto de *V. Persicifolia*

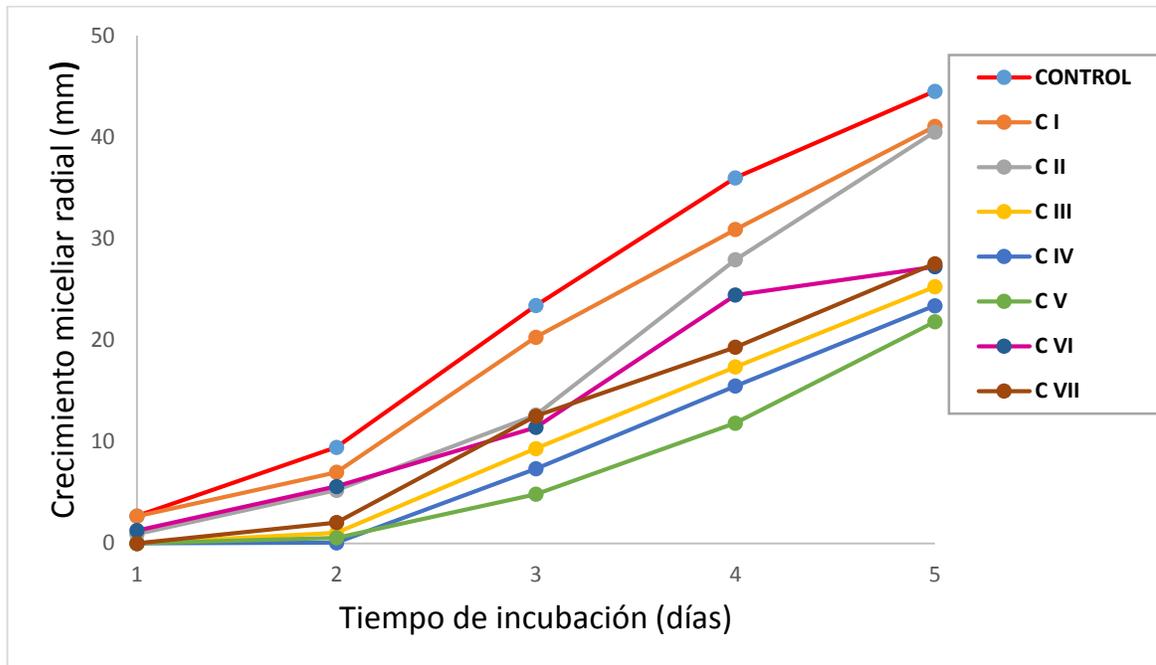
<b>Colección</b>	<b>Fracción</b>	<b>Polaridad</b>
I	1-45	Hexano 100% 9:1 hexano- Acetato
II	46-65	9:1 hexano- Acetato
III	66-107	9:1-8:2 hexano- Acetato
IV	108-127	7:3 hexano- Acetato
V	128-179	7:3-4:6 hexano- Acetato
VI	180-215	5:5 hexano- Acetato
VII	216-251	4:6 hexano- Acetato
VIII	252-277	3:7 hexano- Acetato
IX	278-395	3:7 hexano- Acetato 1:9 Hexano- Acetato
X	396-431	9:1 Acetato -Metanol
XI	432-467	8:2 Acetato -Metanol
XII	468-765	7:3-1:9 Acetato –Metanol 100% Metanol

### **5.5 Porcentaje de inhibición de colecciones cromatográficas de *A. sativum* y *V. persicifolia* sobre *C. gloesporioides* en medios de cultivo.**

Para evaluar la actividad de las colecciones obtenidas de los extractos de acetato de etilo de *A. sativum* y de *V. persicifolia*, se realizaron mediciones del diámetro micelial (mm) de cultivos *in vitro* cada 24 h durante 5 días, las mediciones realizadas por triplicado se promediaron y se presentan en cinéticas de crecimiento. Las figuras 9 y 10 muestran las evaluaciones realizadas sobre los hongos aislados de mango y de jitomate, con adición de las colecciones de *A. sativum*.

Para el caso del hongo aislado de mango (Figura 9), se aprecia como las colecciones obtenidas con polaridades bajas o muy altas, no ejercen un efecto inhibitorio significativo sobre su crecimiento, sin embargo, las colecciones obtenidas con mezclas de disolventes 70% hexano- 30% acetato; 60% hexano-40% acetato para la colección 4, y de 60% hexano-

40%acetato a 40% hexano-60% acetato, para la colección 5, tuvieron un efecto inhibitorio significativo en el crecimiento del hongo en comparación con el control.

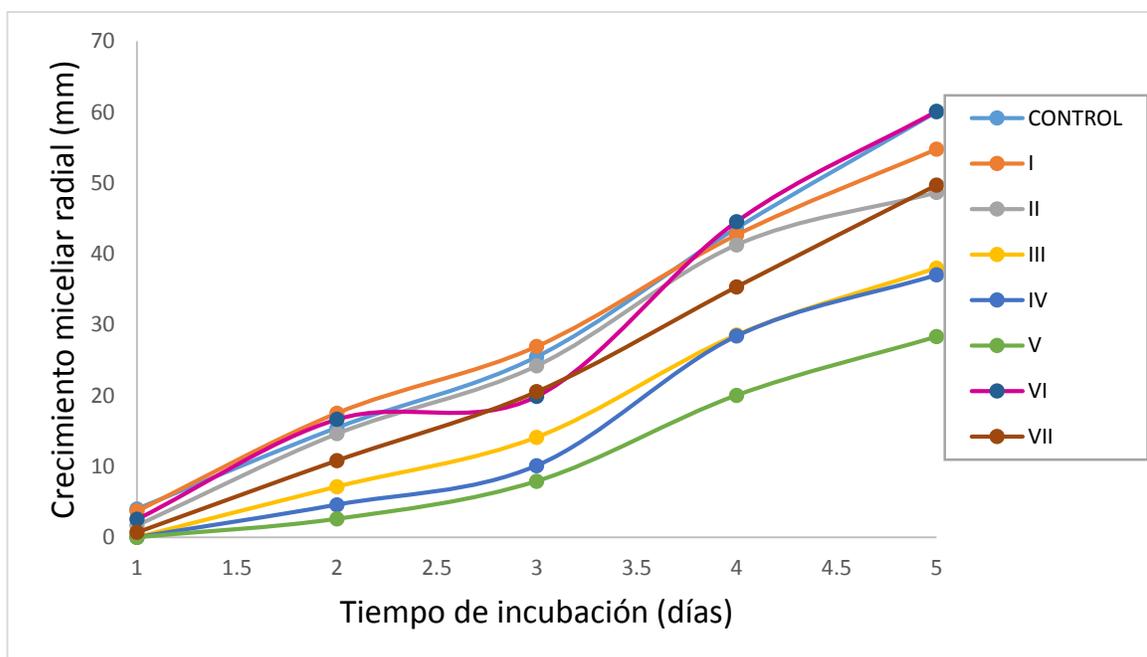


**Figura 9.** Cinética de crecimiento micelial radial de *C. gloesporioides* aislado de mango tratado con colecciones del extracto de acetato de etilo de *A. sativum*.

El efecto inhibitorio que presentaron las colecciones obtenidas en polaridades desde 70% hexano-30% acetato a 40% hexano-60% acetato, coincide con lo reportado por Cabrera (2015), donde las colección que presentaron mayor inhibición, se obtuvieron con las combinaciones de disolventes hexano-acetato 5:5-4:6 y hexano-acetato 4:6, con un porcentaje de inhibición del 50 y 100%, respectivamente. Sin embargo el porcentaje de inhibición que presentaron, no coincide con lo obtenido en este trabajo, donde la colección 4, tuvo una inhibición del 48 % y la colección 5, una inhibición del 51%, esta diferencia en la actividad, podría deberse a que algunos metabolitos o compuestos presentes en el extracto, ya no se encontraban, o bien, se encontraban en menor cantidad, pues la separación de compuestos no se realizó de inmediato a la obtención del extracto.

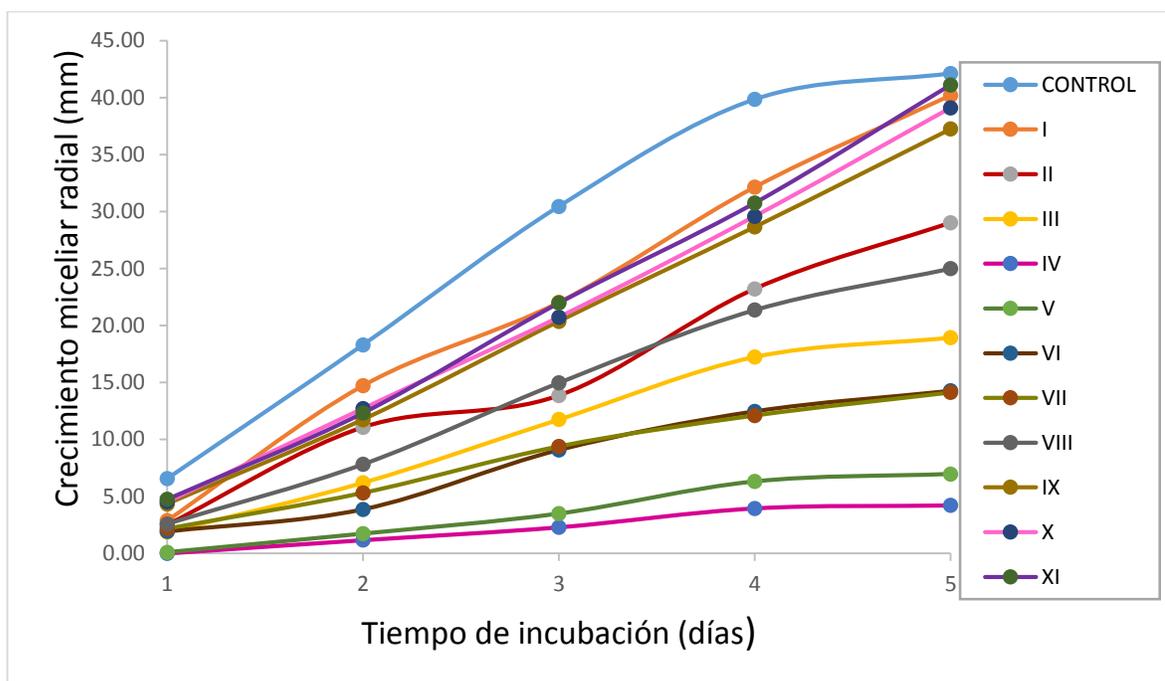
Los resultados de la evaluación de las colecciones de *A. sativum* realizadas en el hongo aislado de jitomate (Figura 10), muestran, que el desarrollo del hongo, no se vio afectado significativamente con la adición de las colecciones obtenidas con polaridades bajas o muy altas, los que presentaron menor desarrollo, fueron los hongos tratados con las colecciones 4 y 5, la colección 4, obtenida con mezclas de disolventes 70% hexano-30% acetato y 60% hexano-40% tuvo efecto inhibitorio sobre el crecimiento del hongo, sin embargo, la colección 5, obtenida con mezclas de disolventes de 60% hexano-40% acetato y 40% hexano-60% acetato, tuvo el mayor efecto inhibitorio sobre la cepa aislada de jitomate.

El porcentaje de inhibición obtenido al quinto día, fue del 53 %, semejante al porcentaje de inhibición para el aislado de mango, esto confirma lo que mostro la cromatografía en capa fina para dicha colección, presenta mezclas de compuestos azufrados con propiedades antifúngicas, entre ellos podrían estar presentes Alicina, el principal compuesto de ajo crudo, triturado y tiosulfinato de dialilo, constituyente principal del ajo, extraído con solvente, sin embargo, pueden disminuir durante almacenamiento a temperatura ambiente, tal como lo menciona Rahman (2007).



**Figura 10.** Cinética de crecimiento micelial radial de *C. gloesporioides* aislado de jitomate tratado con colecciones del extracto de acetato de etilo de *A. sativum*.

Las figuras 11 y 12, muestran las evaluaciones realizadas sobre el hongo aislado de mango y de jitomate con adición de las colecciones de *V. persicifolia*, mediante cultivos *in vitro*. En la cinética de crecimiento del hongo aislado de mango (Figura 11), se aprecia que el control tuvo un crecimiento continuo, las colecciones que se obtuvieron a polaridades, bajas o muy altas, no presentaron diferencias estadísticamente significativas, con respecto al control, mientras que las colecciones obtenidas con las combinaciones de 70% hexano-30% Acetato (colección 4) y las combinaciones 70% hexano -30% Acetato y 40% hexano-60% Acetato (colección 5), mostraron efecto inhibitorio en el desarrollo del hongo durante los 5 días. La mayor actividad inhibitoria se logró con la adición de la colección 4, alcanzándose un porcentaje de inhibición del 91% en el quinto día.

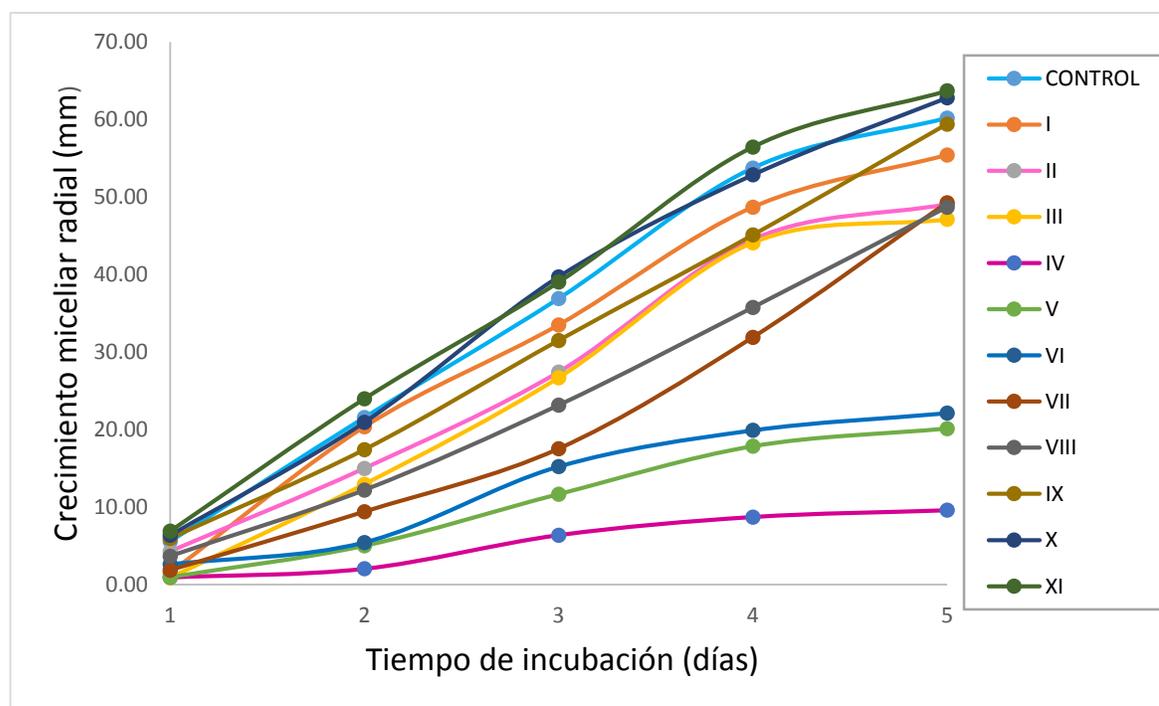


**Figura 11.** Cinética de crecimiento micelial radial de *C. gloesporioides* aislado de mango tratado con colecciones del extracto de acetato de etilo de *V. persicifolia*.

El hongo aislado de jitomate mostro una respuesta similar al aislado de mango, al ser tratado con las diferentes colecciones (Figura 12), se aprecia que desde el primer día, la actividad inhibitoria de las colecciones obtenidas con las combinaciones de 70% hexano-30% Acetato (colección 4) y las combinaciones 70% hexano-30% Acetato y 40% hexano-60% Acetato (colección 5), mostraron diferencias estadísticamente significativas en la inhibición del crecimiento del hongo, en comparación con el desarrollo del control,, al cual no se le aplicó ningún tratamiento. Siendo el hongo aislado del jitomate el que mostro más susceptibilidad a la colección 4, con un porcentaje de inhibición del 85% al quinto 5.

*V. persicifolia* presento un efecto fungistático sobre los dos hongos aislados (*C. gloesporioides* obtenidos de mango y de jitomate), efecto que resulto ser más potente ante el hongo aislado de mango, donde se obtuvo la mayor inhibición del crecimiento.

Resaltándose el hecho de que no se han encontrado reportes de investigaciones previas, realizadas con esta planta contra hongos, sin embargo, los datos obtenidos muestran que las hojas de esta planta pueden contener metabolitos secundarios con actividad antifúngica.



**Figura 12.** Cinética de crecimiento micelial radial de *C. gloesporioides* aislado de jitomate tratado con colecciones del extracto de acetato de etilo de *V. persicifolia*.

## 5.6 Porcentaje de inhibición de *A. sativum* y *V. persicifolia* sobre *C. gloesporioides* en frutos de mango y jitomate.

Se evaluó el efecto de las colecciones 5 de extractos de *A. sativum* y colección 4 de extracto de *V. persicifolia* sobre mango (Tabla 13), la aplicación de los tratamientos se realizaron posterior a la inoculación del hongo, mediante una herida superficial en los frutos.

Al día 6, después de iniciado el ensayo, los frutos, alcanzaron la madures y se observó el crecimiento del hongo, sin embargo, mostraron diferencias significativas entre los dos tratamientos ( $P=0.05$ ) y estos a su vez, con el testigo, el cual, solo contenía el inóculo de esporas. La colección del extracto de *A. sativum* fue la que mostro mayor efecto inhibitorio (99.4%), sobre el crecimiento del hongo, sin embargo, aunque la colección del extracto de *V. persicifolia*, presento menor efecto, también logro inhibir el crecimiento del hongo en un 64%.

**Tabla 13.** Efecto inhibitorio de la colección 4 de *V. persicifolia* y de la colección 5 de *A. sativum* sobre el crecimiento micelial de *C. gloesporioides* aislado de mango, a los 6 y 15 días de inoculación.

Tratamientos	Día 6	Día 15
Testigo	4.46±0.50 C	37.72±0.71 C
<i>A. sativum</i>	0.03±0.53 A	5.38±0.71 A
<i>V. persicifolia</i>	1.69±0.53 B	15.56±0.72 B

Media ± desviación estándar. Medias con distinta letra, en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey  $P \leq 0.05$ ), promedio de tres repeticiones. Diámetro (mm).

Al día 15, las lesiones sobre la superficie del mango ya eran necróticas, típicas de la antracnosis, de esta manera, se muestra el ataque del fitopatógeno sobre el fruto, sin embargo, las diferencias de crecimiento del hongo entre los tratamientos y el testigo fue significativo ( $P \leq 0.05$ ). *A. sativum* y *V. persicifolia* muestran actividad fungistática contra el fitopatógeno de estudio, *A. sativum*, presenta mayor actividad inhibitoria (84.2%) sobre el crecimiento del hongo. Una menor respuesta se obtuvo con *V. persicifolia*, al inhibir el crecimiento en un 53%.

Para determinar el efecto de las colecciones de los extractos de *A. sativum* y de *V. persicifolia*, sobre jitomate, se aplicaron las colecciones sobre frutos previamente inoculados sobre heridas superficiales.

Una vez que los frutos, alcanzaron la madures (Tabla 14), se observó el crecimiento del hongo, mostrando diferencias estadísticamente significativas, entre las dos colecciones de extractos vegetales ( $P \leq 0.05$ ) y el testigo, el cual solo contenía el inóculo de esporas.

La adición de la colección de extracto de *A. sativum*, no permitió el desarrollo del hongo, obteniéndose porcentajes de inhibición del 99.2, sobre el crecimiento del hongo, esto demuestra la acción fungistática del ajo. Una menor respuesta se obtuvo con la colección del extracto de *V. persicifolia*, sin embargo, fue efecto inhibitorio fue significativo en comparación con el control, lograndose inhibir el crecimiento del hongo en un 64%, mostrando de igual manera su poder fungistático.

**Tabla 14.** Efecto inhibitorio de la colección 4 de *V. persicifolia* y de colección 5 de *A. sativum* sobre el crecimiento micelial de *C. gloesporioides* aislado de jitomate, a los días 6 y 15 de inoculación.

Tratamientos	Día 6	Día 15
Testigo	4.50±0.54 C	11.02±0.41 C
<i>A. sativum</i>	0.03±0.54 A	2.24±0.40 A
<i>V. persicifolia</i>	1.11±0.55 B	3.96±0.40 B

Media ± desviación estándar. Medias con distinta letra en la misma columna indican diferencias estadísticamente significativas (Tukey  $P \leq 0.05$ ), promedio de tres repeticiones. Diámetro (mm).

Los análisis estadísticos indican diferencias significativas entre tratamientos ( $P \leq 0.05$ ) al día 15, observándose un incremento en el desarrollo del hongo sobre jitomate sin extracto, sin embargo, para los jitomates con los extractos, se evidenció el efecto inhibitorio, ambas colecciones, en comparación con el control, mostraron diferencias estadísticamente significativas.

La colección del extracto de *A. sativum*, permitió el menor crecimiento, es decir, que inhibió el crecimiento del hongo significativamente (80%), mientras que la colección del extracto de *V. persicifolia*, mostro menor actividad sobre el hongo (inhibición del 64%).

En ambos frutos (mango y jitomate), no se observó el desarrollo del hongo durante los primeros días, este fue evidente, hasta que estos alcanzaron la madures, lo que significa que los frutos se mantienen en estado de quiescencia hasta que alcanzan las condiciones, para que continúe el proceso de infección, tal como lo describe Soriano *et al.* (2001).

La capacidad inhibitoria del ajo sobre los hongos aislados de mango, en esta evaluación, superó los resultados reportados por Cabrera (2015), la cual inhibió el 71% del crecimiento de *C. gloesporioides*, cuando se usó el extracto de bulbos de ajo entero, la diferencia entre ambos estudios radicó en que, en este estudio se utilizó ajo triturado, lo que significa que productos diferentes podrían estar presentes en el extracto, de acuerdo a lo reportado por Al-Wabel y Omar (2009), quienes comentan que cuando el ajo es triturado, se activa una enzima llamada alinasa, que metaboliza alin en Alicina, compuesto con actividad antibacterial. El uso de extractos de ajo o alicina contra patógenos de plantas, ya ha sido documentado (Slusarenko *et al.*, 2008). Hoy en día, se encuentran disponibles preparaciones a base de compuestos de ajo, aunque estos están dirigidos al control de plagas, en lugar de patógenos.

No se han reportado estudios de *V. persicifolia*, contra hongos, sin embargo en los datos obtenidos se muestra que tiene efecto fungistático sobre los hongos aislados.

### **5.7 Severidad de infección de *C. gloesporioides* sobre jitomate y mango tratados con las colecciones de *A. sativum*. y *V. persicifolia* de mayor porcentaje inhibitorio.**

A frutos sanos, se les aplicaron las colecciones de los extractos en la superficie sin herida, se realizaron cuatro repeticiones con cada tratamiento y como testigo, se utilizaron frutos sin tratamiento, posteriormente se inocularon con el hongo y se dejaron en condiciones de almacenamiento (alta humedad relativa y temperatura ambiente).

Para el día 12, solo presentaron síntomas, los jitomates sin tratamiento (Figura 13), al día 21, en los jitomates sin tratamiento, se incrementó el tamaño de la herida (5%), en el caso de los jitomates tratados con *A. sativum*, no se presentaron heridas, únicamente se observó la

marchitez de la piel. Esto mismo ocurrió con el jitomate tratado con *V. persicifolia*, aunque en este caso, la marchitez fue ligeramente más grande.

En el caso de los mangos, para el día 12, los mangos sin tratamientos fueron los únicos que presentaron desarrollo de la enfermedad (figura 13). Para la segunda evaluación (día 21), el área dañada del testigo, alcanzó hasta el 50% de los frutos, mientras que en el caso de los mangos tratados con la colección del extracto de *A. sativum*, el daño alcanzado para este día fue del 12% y para los mangos tratados con la colección del extracto de *V. persicifolia*, el daño alcanzado fue del 25%.



**Figura 13.** Severidad de infección de *C. gloesporioides*, en frutos de mango y de jitomate, a los 21 días de almacenamiento. a) Mango tratado con la colección del extracto de *V. persicifolia*; b) Mango tratado con la colección del extracto de *A. sativum*; c) Mango sin tratamiento (testigo); d) Jitomate tratado con la colección del extracto de *V. persicifolia*; e) Jitomate tratado con la colección del extracto de *A. sativum*; f) Jitomate sin tratamiento (testigo).

Como respuesta a las aplicaciones de la colección 5 del extracto de *A. sativum* y de la colección 4 de extracto de *V. persicifolia* sobre frutos de mango y de jitomate, se observó, que ambas protegen a los frutos, evitando que el hongo penetre inmediatamente y se desarrolle. *Colletotrichum* puede penetrar la superficie vegetal directamente o por heridas (O'Connell *et al.*, 2000).

Los resultados de esta investigación, indican, que tanto el extracto de *A. sativum* y como el de *V. persicifolia*, contienen metabolitos que no permiten el desarrollo de *C. gloesporioides* y pueden ser utilizados, para prevenir la antracnosis en frutos de mango y de jitomate, por lo que se considera conveniente seguir experimentando en futuras investigaciones.

## CONCLUSIONES

Las colonias obtenidas de los aislamientos en medio PDA, a partir de frutos de mango y de jitomate, presentaron aspectos característicos del género *Collectotricum*.

Con la prueba de patogenicidad, se comprobó que los hongos aislados, fueron patogénicos en frutos de mango y de jitomate, la presencia se determinó mediante la observación de la expresión de síntomas sobre los frutos.

De los resultados obtenidos, del efecto de las plantas utilizadas, sobre el desarrollo de los hongos aislados, se concluye que los extractos de acetato de etilo de *Verbesina persicifolia* (hierba del toro) y de *Allium sativum* (ajo), en condiciones *in vitro*, presentaron el mayor efecto inhibitorio.

La colección 4 del extracto de acetato de etilo de *V. persicifolia* y la colección 5 del extracto de acetato de etilo de *A. sativum*, presentaron la mayor inhibición del crecimiento radial sobre cepas de *C. gloesporioides* en medio PDA.

La aplicación de las colecciones de los extractos sobre los frutos de mango y de jitomate, inoculados, no eliminó la enfermedad, pero sí inhibió la extensión de la misma.

## **PERPECTIVAS Y RECOMENDACIONES**

Estudios posteriores permitirán determinar los metabolitos involucrados en el efecto inhibitorio, hecho que abre la posibilidad de ser utilizados como una opción para el control de antracnosis en frutos. Sobre todo por la naturaleza biodegradable y no tóxica de esos compuestos.

Con base en los efectos que presentaron las colecciones de los extractos, se recomienda aislar los compuestos que muestran actividad inhibitoria contra hongos

Es importante considerar los cambios moleculares, morfológicos y bioquímicos que estos compuestos causan sobre el patógeno y el hospedero.

Realizar investigaciones en los diferentes estados fenológicos del fruto, para determinar donde hay una mayor infección del patógeno y en donde, hay mayor inhibición por parte de los extractos.

## BIBLIOGRAFÍA

1. Agrios, G. N. (2005). Plant pathology. Fifth edition. Elsevier. Academic Press. New York, USA. 922pp.
2. Alkan, N., Friedlander, G., Ment, D., Prusky, D. and Fluhr, R. (2015). Simultaneous transcriptome analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* and tomato fruit pathosystem reveals novel fungal pathogenicity and fruit defense strategies. *New Phytologist*, 205 (2): 801–815.
3. Al-Wabel, N., and Omar, S. (2010). Organosulfur compounds and possible mechanism of garlic in cancer. *Saudi Pharmaceutical Journal*, 18: 51-58.
4. Allende, R., Juárez, C., García, R., Carrillo, a., Patiño, M., y Galindo, E. (2001). *Rhodotorula minuta*, agente de control biológico potencial contra *Colletotrichum gloeosporioides* en mango. *Brazilian Phytopathology*, 26 (supplement), pp. 461-462.
5. Arauz, L. F., (2000). Mango anthracnose: economic impact and current options for integrated management. *Plant Dis*. 84:600–609.
6. Avilán, L. Rengifo, A. y Carmelo, A. (1996). El mango. Ed. Americana, C.A. Caracas, Venezuela. 401 pp.
7. Baron, F. E., and Tansey, M. R. (1977). Isolation, purification, identification, synthesis and kinetics of activity of the anticandidal component of *Allium sativum* and a hypothesis for its mode of action. *Mycologia*, 69:793–825.
8. Barquero, Q. M., Péres, N. A. y Arauz, L.F. (2013). Presencia de *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum gloeosporioides* en helecho hoja de cuero, limón criollo, papaya, carambola y mango en Costa Rica y Florida (Estados Unidos). *Agronomía Costarricense*, 37(1): 23-38.
9. Aristegui, B. (2002). *Alternaria alternata* (Fries) Keissler. *Rev. Iberoam Micol*. 19-21.

10. Bokaeian, M. and Bameri, Z. (2013). *In Vitro* antibacterial properties of aqueous garlic extract (AEG) against multidrug-resistant Enterococci. *Zahedan Journal of Research in Medical Sciences*, 15(6): 43-49.
11. Cabrera, E.F S. (2015). Control del crecimiento del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* y *alternaria alternata* en medios de cultivo y en mango (*Mangifera indica* L.). Universidad Autónoma del Estado de Hidalgo. Tulancingo de Bravo Hidalgo. Tesis de Maestría.
12. Cannon, P. F., Damm, P. U., Johnston., P. R., and Weir., B. S. (2012). *Colletotrichum* – current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73: 181–213.
13. Carrillo, F. J. A., García, E. R. S., Muy-Rangel, M. D., Sañudo, B. A., Márquez, Z. I., and Allende, M. R. (2005). Control biológico de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] y su efecto en la calidad poscosecha del mango (*Mangifera indica* L.) en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de fitopatología*. 23(1): 24-32.
14. Carrillo, L. (2003). Los Hongos de los alimentos y forrajes. Universidad Nacional de Salta. Cuarta edición. 130p.
15. Cifuentes, B. M. C., y García, J. D. J. (2006). *Colletotrichum gloeosporioides* fitopatógeno asociado a la nutrición humana. *Investig. Andina*. 8: 73-80.
16. Coates, L. M., and Gowanlok. D. (1993). Infection process of *Colletotrichum* species in tropical and subtropical fruits. *Proc. in an int. Agric. res. (ACIAR)*, 30: 162-168.
17. Contreras, C. (2006). Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum spp.* Obtenidos de frutos de lulo, tomate de árbol, granadilla, mango y tallos de mora con síntomas de antracnosis. Undergraduate thesis. Facultad de Ciencias Básicas, Pontificia Universidad Javeriana. Bogotá, Colombia.
18. Cseke, J. L., Setzer, N. W., Volgler, B., Kirakosyan, A., and Kaufman, B. P. (2006). Traditional, analytical, and preparative separations of natural product. In:

- Natural products from plants. (Eds.) Taylor & Francis Group, LLC. U.S.A. 263-217pp.
19. Dickman, M. B. and Álvarez, A.M. (1983). Latent infection of papaya caused by *Collectotricum gloesporioides*. *Plant Disease*. 67: 748-750.
  20. Duran, J.A y Mora, D. 1987. Variabilidad en la sintomatología de la antracnosis (*Colletotrichum gloesporioides* sp.) en papaya durante el periodo postcosecha en Costa Rica. *Agronomía Costarricense*, 11. (2): 155-161.
  21. D.R. Biblioteca Digital de la Medicina Tradicional Mexicana. 2009.
  22. Estrada, A. B., Dodd J. C., and Jeffries, P. (2000). Effect of humidity and temperature on conidial germination and appressorium development of two Philippine isolates of the mango anthracnose pathogen *Colletotrichum gloesporioides*. *Plant Pathology*, 49: 608-618.
  23. FHIA. 2007. Deterioro poscosecha de las frutas y hortalizas frescas por hongos y bacterias.4:2-5. Consultado el día 22/03/2017 en la siguiente dirección: [http://fhia.org.hn/downloads/fhia\\_informa/fhiainfdic2007.pdf](http://fhia.org.hn/downloads/fhia_informa/fhiainfdic2007.pdf)
  24. Fox, M. A y Whitesell, J. K. (2000). Química orgánica. Addison Wesley Longman. Edo. de México, México. 1232pp.
  25. Galán S. V. (2009). El cultivo del mango. Ediciones Mundi prensa. Segunda edición. Madrid, Barcelona. España. 256 pp.
  26. Gándara, L. A., Corrales, M. C., Rivera, D. M., Martinez, T. M. A., and Vargas, A. I. (2014). Post-harvest control of graymold in table grapes using volatile sulfur compounds from *Allium sativum*. *J Sci Food Agric*, 95: 497–503.
  27. Gastélum, R. F. (2002).Control del Moho Negro, *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) en el Fruto de Tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.) Considerando Unidades Calor y Variables Ambientales para la Aplicación de Azoxystrobin en Sinaloa, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 20. (1): 72-76.
  28. Gómez H. J. E. (2002). Evaluación del extracto de fiquen en el desarrollo *in vitro* de *Collectotricum gloesporioides* (Pens) Pens & sacc. Y *Sclerotinia sclerotiorum*

- (Lib.) de Bary. Medellin. Iv Seminario Nacional, Frutales de Clima Frio Moderado. 182.
29. Hernández L. A. y Bautista. S. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Rev. Fitotec. Mex.* 30(2): 119-123.
  30. Hoa, N. V. (2008). Current research activities and the development of good agricultural practice (GAP) for pitaya in Vietnam. Pitaya Production. Market Export Challenges Prospects 20. October, Putrajaya, Malaysia.
  31. Irorere U. V., and Igeleke, C. L. (2012). Antimicrobial properties of the extracts of locally sold garlic and neem leaf in Benin City, Nigeria. *International Journal of Biosciences*, 2(4): 21-27.
  32. InfoAgro. (2017). El cultivo del tomate. Consultado el día 28/03/2017 en la siguiente dirección: <http://www.infoagro.com/hortalizas/tomate.htm>
  33. InfoAgro. (2016). El cultivo del mango. Consultado el día 28/03/2017 en la siguiente dirección: [http://www.infoagro.com/frutas/frutas\\_tropicales/mango.htm](http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/mango.htm)
  34. Inforural. (2017). El papel de México en la producción y exportación de frutas y verduras. Consultado el día 28/03/2017 en la siguiente dirección: <https://www.inforural.com.mx/el-papel-de-mexico-en-la-produccion-y-exportacion-de-frutas-y-verduras>
  35. Inifap. (2011). Enfermedades fungosas y bacterianas del cultivo de tomate en el estado de Nayarit. Consultado el día 25/04/2017 en la siguiente dirección: <http://biblioteca.inifap.gob.mx:8080/jspui/bitstream/handle/123456789/3034/ENFERMEDADES%20FUNGOSAS%20Y%20BACTERINAS%20DEL%20CULTIVO%20DEL%20TOMATE%20EN%20EL%20ESTADO%20DE%20NAYARIT%20202.pdf?sequence=1>
  36. Jaccobi, K. K., MacRae, E. A., and Hetherington, S. E. (2001). Postharvest heat disinfestation treatment of mango fruit. *Sci. Horticulturae*, 89: 171–193.

37. Juárez B. G. P., Sosa M. M. E., y López M. A. (2010). Hongos Fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. Universidad de las Américas Puebla. 4 (2): 14-23.
38. Kamle, M., Kumar, P., Gupta, V., Tiwari, A., Misra, A., and Pandey, B. K. (2013). Identification and phylogenetic correlation among *Colletotrichum gloeosporioides* pathogen of anthracnose for mango. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2: 285–287.
39. Kaushal, K. S., Deoak, B., and Hatnagar. (1998). Mycotoxins in agriculture and food safety. Marced dekker. 497pp.
40. Kefialew, Y., and Ayalew, A. (2008). Postharvest biological control of anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) on mango (*Mangifera indica*). *Postharvest Biology and Technology*, 50: 8–11.
41. Kyung. (2012). Antimicrobial properties of *allium* species. *Current Opinion in Biotechnology*, 23: 142–147.
42. Li, S., and Zhihui, C. (2009). *Allium sativum* extract as a biopesticide affecting pepper blight. *Int. J. Vegetable Sci*, 15: 13–23.
43. Márquez, R., De la Rosa, C. y Mercado, A. (2007). Actividad antifúngica del extracto en etanol de las hojas frescas de *Pedilanthus tithymaloides*. *Scientia et Técnica*, 13(33): 155-159.
44. Martínez, R. F. E. 2016. Hongos Fitopatógenos Asociados Al Tomate (*Solanum Lycopersicum* L.) En la zona árida del noroeste de México: La importancia de su diagnóstico. *European Scientific Journal*. 12 (18): 1857- 7431.
45. McNair, H., and Milker, J. (1998). Basic gas chromatography. A Wiley Interscience Publication, New York, p. 4.
46. Moctezuma, Z. M. G., Pedraza R. M., Cárdenas, G. J. F., Martínez, J. V. M., y Acosta, R. J. I. (2016). Efecto del ajo (*allium sativum*) sobre el crecimiento de algunas especies de hongos. *Revista Académica de Investigación Tlatemoani*. Universidad Autónoma de San Luis Potosí. 22.

47. Notario, M. C. M. y Sosa, M. M-E. (2012). El jitomate (*Solanum lycopersicum*): aporte nutrimental, enfermedades post cosecha y tecnologías para su almacenamiento en fresco. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. Fundación Universidad de las Américas Puebla, México. 6(1): 40-53.
48. O'Connell, R., Perfect, S., Hughes, B., Carzaniga, R., Bailey, J., and Green, J. (2000). Dissecting the cell biology of *Colletotrichum* infection process. In: *Colletotrichum* Host Specificity, Pathology and Host-Pathogen Interaction. Editores Dov Prusky, Stanley Freeman y Martin B. Dickman.
49. Páez, R. 2003. Tecnologías sostenibles para el manejo de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (penz) pens y sacc.) en papaya (*Carica papaya* L.) y mango (*Mangifera indica*). Boletín técnico. 8. 7(9), P 4-5.
50. Perera, S. y Méndez, C. (2007). Enfermedades del mango. Información técnica. Servicio técnico de agricultura y desarrollo rural. Cabildo Tenerife.
51. Phoulivong, S., Cai, L., Chen, H., McKenzie, E H. C., Abdelsalam, K., Chukeatirote, E., and Hyde, K. D. (2010). *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity*, 44: 33-43.
52. Rahman, S. M. (2007). Allicin and other functional active components in garlic: Health benefits and bioavailability. *International Journal of Food Properties*, 10: 245–268.
53. Rodríguez, L. E., Cárdenas, S. E., Hernández, D. S., Gutiérrez, D. A., and Mayek, P. N. (2013). Análisis de infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. de frutos de aguacatero. *Bras. Frutic., Jaboticabal* – SP, 35(3): 898-905.
54. Ramírez, G. S. I., Báez, L. O., Zaragoza, E. S., y Villarreal, W. A. (2016). Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*. *Rev. Mex. Cienc. Agríc*, 7(8): 1879-1891.
55. Rotem Y. (1994). The Genus *Alternaria*: Biology, Epidemiology and Pathogenicity. APS Press, American. Phytopathological Society. 326p.

56. Rozas, R. P. A. y Sandoval, B. C. (2006). Evaluación de la efectividad de diferentes fungicidas, *in vitro*, para el control de aislados de *Alternaria alternata*, obtenidos de frutos de tomate. Agroindustrial. Universidad de Talca (Chile). Escuela de Agronomía.
57. SAGARPA. (2017). Aumenta producción de mango mexicano 36 por ciento en tres años. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Consultado el día 14/04/2017 de la dirección: [http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/2017/enero/Documents/JAC\\_0001-1.PDF](http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/distritofederal/boletines/2017/enero/Documents/JAC_0001-1.PDF)
58. SAGARPA. (2017). Aumenta producción de mango mexicano 36 por ciento en tres años. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación (SAGARPA). Consultado el día 14/04/2017 de la dirección: <http://www.sagarpa.gob.mx/Delegaciones/jalisco/boletines/2017/febrero/Documents/2017B02006.PDF>
59. Sepúlveda, J. G., Porta, D. H. y Rocha, S. M. (2003). La Participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(3): 355-363.
60. Shah, K. A., Patel, M. B., Patel, R. J., and Parmar, P. K. (2010). *Mangifera Indica* (Mango). *Pharmacogn Rev*, 4 (7): 42-48.
61. Shilpa, K., Varun, K., and Lakshmi, B. S. (2010) An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *J Plant Sci*, 5: 222-247.
62. Skoog, D. A., Donald, M. W., Holler, F. J., y Stanley, R. C. (2001). Química Analítica. Séptima Edición. McGraw-Hill Interamericana. Pp. 666-667.
63. Slusarenko, A. J., Patel, A., and Portz, D. (2008). Control of plant diseases by natural products: Allicin from garlic as a case study. *Eur J Plant Pathol*, 121: 313-322.

64. SIAP. (2013). Hortalizas, legumbres y frutos en las exportaciones mexicanas. SIAP informa. Número 18. México. Consultado el día 19/04/2017 de la dirección: <http://www.campomexicano.gob.mx/boletinsiap/018-e.html>
65. Song, L., Z.H. Cheng, and H.W. Meng. (2007). Study on inhibitive effects of garlic bulb crude extracts on *Fusarium oxysporium* f. *niveum* Snyder et Heansen. *J. Northwest A & F Univ. Natur. Sci. Edit.*, 35:135–138.
66. Tequida, M. M., Cortez, R. M., Rosas, B. E. C., López, S. S. y Corrales, M. C. (2002). Efecto de extractos alcohólicos de plantas silvestres sobre la inhibición de crecimiento de *Aspergillus flavus*, *Aspergillus niger*, *Penicillium chrysogenum*, *Penicillium expansum*, *Fusarium moniliforme* y *Fusarium poae*”. *Rev Iberoam Micol*, 19: 84-88.
67. Thomma, B. P. H. J. (2003). *Alternaria* spp. From general saprophyte to specific parasite. *Molecular Plant Pathology*, 4: 225-226.
68. Lu, X., Rasco, B. A., Kang, D. H., Jabal, J. M. F., Aston, D. E., and Konkel, M. E. (2011). Infrared and raman spectroscopic studies of the antimicrobial effects of garlic concentrates and diallyl constituents on foodborne pathogens. *Anal. Chem*, 83: 4137-4146.
69. Xie, L., Zhang J., Wan, Y., and Hu, W. (2010). Identification of *Colletotrichum* spp. isolated from strawberry in Zhejiang Province and Shanghai City, China. *Zhejiang Univ-Sci B. Biomed & Biotechnol*, 11(1): 61-70.
70. Xu, X., Lei, A., Ma, A., Lai, T., Song, H., Shi, X., and Li, J. (2017). Antifungal activity of 1-methylcyclopropene (1-MCP) against anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in postharvest mango fruit and its possible mechanisms of action. *International Journal of Food Microbiology*, 241: 1–6.
71. Yasmeeen S., and Asgar A. (2014). Postharvest Decay Control Strategies. Chapter 11. Malaysia. 337–371pp.
72. Zhou. Z., Wu, J., Wang, M., and Zhang, J. (2017). ABC protein CgABCF2 is required for asexual and sexual development, appressorial formation and plant infection in *Colletotrichum gloeosporioides*. *Microbial Pathogenesis*, 110: 85-92.