INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

Centro Interdisciplinario de Investigación

para el Desarrollo Integral Regional

Unidad Michoacán.

BIOCONTROL DE *Botrytis cinerea* A PARTIR DE EXTRACTOS FENÓLICOS DE FRESA

TESIS

Que para obtener el grado de

Maestro en Ciencia en Producción Agrícola Sustentable

TANIA BELEN ALVAREZ GÓMEZ

DIRECTORES DE TESIS

Dra. MARÍA VALENTINA ANGOA PEREZ

Dra. HORTENCIA GABRIELA MENA VIOLANTE

Jiquilpan, Michoacán, Noviembre 2012

SIP-14-BIS

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 10:00 horas del día 12 del mes de Noviembre del 2012 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de **CIIDIR Unidad Michoacán** para examinar la tesis titulada:

"Biocontrol de ***Botrytis cinerea*** a partir de extractos fenólicos de fresa."

Álvarez	**Gómez**	**Tania Belén**
Apellido paterno	Apellido materno	Nombre

Con registro: | B | 1 | 0 | 1 | 5 | 1 | 0 |

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

Después de intercambiar opiniones los miembros de la Comisión manifestaron ***APROBAR LA TESIS***, en virtud de que satisface los requisitos señalados por las disposiciones reglamentarias vigentes.

LA COMISIÓN REVISORA
Directores de tesis

Dra. María Valentina Angoa Pérez

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

Dr. Luis Fernando Ceja Torres

Dr. Carlos Víctor Muñoz Ruíz

Dr. Jorge Molina Torres

SECRETARÍA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
Instituto Politécnico Nacional
CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL
CIIDIR - IPN - U- MICH.

Dr. Guillermo Herrera Arreola.
PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES.

INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan de Juárez Michoacán el día 26 del mes noviembre del año 2012, el (la) que suscribe Tania Belen Álvarez Gómez alumno (a) del Programa de **Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable** con número de registro B101510, adscrito a **C.I.I.D.I.R. I.P.N. Unidad Michoacán**, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de María Valentina Angoa Pérez y Hortencia Gabriela Mena Violante y cede los derechos del trabajo intitulado Biocontrol de *Botrytis cinerea* a partir de extractos fenólicos de fresa, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección: flaka_0220@hotmail.com; valeangoa@hotmail.com y tenchisgmv@hotmail.com Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Tania Belen Álvarez Gómez

Nombre y firma

Agradezco en primer lugar al Instituto Politécnico Nacional por el apoyo otorgado en la beca de estudio a partir del año 2010 desde el ingreso al centro de investigación CIIDIR. Unidad Michoacán, con la cual he podido realizar mis estudios de posgrado hasta su término.

Del mismo modo agradezco al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Michoacán por permitirme desarrollarme profesionalmente dentro de sus instalaciones así como al personal que en él labora por el apoyo brindado durante el periodo de formación como investigadora.

Además extiendo mi agradecimiento al CINVESTAV. Unidad Irapuato por haberme permitido desarrollar parte de mi investigación dentro de sus instalaciones.

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer principalmente a la Dra. María Valentina Angoa Pérez por haber dirigido mi proyecto de maestría, por el apoyo otorgado durante estos años, por inspirarme y recordarme que la investigación es más que solo conocimiento, es pasión, entrega y esfuerzo, además de ser un ejemplo como profesora y amiga.

Así mismo quiero agradecer a aquellas personas involucradas en el desarrollo de este trabajo; a la Dra. Hortencia G. Mena Violante por sus contribuciones en la investigación, así como en mi formación profesional y por aceptar ser la codirectora de este proyecto; al Dr. Carlos Víctor Muñoz Ruíz y al Dr. Luis Fernando Ceja Torres por su apoyo y disponibilidad en la realización de esta tesis y en mi formación como investigadora.

De la misma manera también extiendo mi agradecimiento a la M.C. Guadalupe Oyoque Salcedo por su gran apoyo en la realización de este proyecto y por su confianza y amistad que surgió desde mi llegada al centro de investigación, también agradezco Erendira Jazmín Medellín por su apoyo en el laboratorio y su amistad; así como al personal administrativo. Así como algunas compañeras especialmente a Guadalupe Samano, Berenice, Martha

Agradezco también al Dr. Jorge Molina Torres por haberme aceptado en su laboratorio y estar al pendiente en la realización de una parte importante de mi trabajo de investigación, así como al M. en C. Enrique Ramírez por su apoyo en el laboratorio.

DEDICATORIA

Reza un dicho; reconoce y valora a los que están a tu lado, ellos son en gran medida los causantes de tus éxitos.

Por lo tanto, este trabajo lo dedico especialmente a mis padres Carolina Gómez Cervantes y Bernabé Álvarez González por su apoyo y amor incondicional, por cada palabra de aliento ante cualquier obstáculo y por inspirarme a salir adelante cada día, agradezco su confianza, consejos y valores que me han inculcado para llegar a ser la persona que hoy soy.

También le dedico este pequeño gran esfuerzo a mis hermanos: Citlalli, Jimena y Samuel por animarme a cumplir nuevas metas. A mi tía consentida Leticia por su apoyo y grandes consejos, a mi pequeña sobrina Regina a quien espero le interese la investigación algún día, así como a mis abuelos y principalmente a mi abuela Margarita a quien siempre tengo en mente y corazón y a toda mi familia por estar conmigo siempre. Así mismo, le dedico este trabajo a mi novio Luis por su apoyo en los últimos años y por compartir su vida conmigo.

ÍNDICE

RESUMEN ……11
ABSTRACT ……13
1. INTRODUCCIÓN ……...14
2. ANTECEDENTES ……16
2.1. Generalidades fresa ……...16
2.1.1. Descripción de la fresa ..…….....17
2.1.2. Importancia de la fresa a nivel mundial ……18
2.1.3. Importancia de la fresa en México …….……18
2.2. Principales enfermedades del cultivo fresa ……20
2.3. *Botrytis cinerea* ……22
2.3.1. Clasificación taxonómica …….……...……23
2.3.2. Morfología y función de las estructuras de *B. cinerea* …….……..23
2.3.3. Ciclo de infección de *B. cinerea* ……...……..25
2.3.3.1. Adhesión y germinación ……...……...25
2.3.3.2. Penetración ……...……26
2.3.3.3. Muerte del tejido vegetal ……...……..26
2.3.3.4. Fase de latencia ……..….27
2.3.3.5. Colonización y maceración ……...……..27
2.3.3.6. Esporulación y dispersión ……27
2.4. Alternativas de control ……28
2.4.1. Control químico ……...……..29
2.4.1.1. Efecto del uso de agroquímicos ……...……..30
2.4.1.2. Efecto del uso de agroquímicos en el medio ambiente ….…30
2.4.1.3. Clasificación de agroquímicos ……31
2.4.2. Control biológico ……...33

2.5. Compuestos químicos de las plantas ……..35
2.5.1. Metabolismo secundario ……..35
2.5.1.1. Fenilpropanoides ……..36
2.5.1.2. Terpenoides …….……....37
2.5.1.3. Alcaloides …….……..37
2.6. Mecanismos de defensa y acción de los metabolitos secundarios. …...38
2.6.1. Actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios ……..…39
2.7. Uso de extractos vegetales como alternativas de control biológico …...41
3. OBJETIVO ……43
3.1. Objetivos específicos ……..……...43
4. MATERIALES Y MÉTODOS ..……44
4.1. Material vegetal …….……..44
4.2. Obtención de extractos de hojas de planta de fresa ……44
4.3. Aislamiento de *Botrytis cinerea* ……..…..45
4.4. Ensayo de inhibición *in vitro Botrytis cinerea* ……..……45
4.4.1. Determinación de biomasa seca de *Botrytis cinerea* ……....45
4.5. Visualización de esporas ……...46
4.6. Evaluación de la actividad biocontroladora de extractos *in vivo* ..……46
4.7. Fraccionamiento de extractos vegetales de la planta de fresa ……..47
4.7.1. Cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos ……47
4.7.2. Detección de compuestos flavonoides de extractos vegetales de fresa ……48
4.7.3. Purificación de fracciones ……48
4.8. Evaluación de la actividad biocontroladora de fracciones de extractos vegetales de planta de fresa *vs Botrytis cinerea in vitro* ……..……..49
5. RESULTADOS ……...50
5.1. Ensayo *in vitro*. *Botrytis cinerea vs* extractos vegetales ……..……50
5.2. Evaluación de la actividad biocontroladora de extractos *in vivo* ……...53
5.3. Fraccionamiento de extractos etanólicos de planta de fresa y detección de compuestos flavonoides ……..54

5.4. Evaluación de la actividad biocontroladora de fracciones de extractos vegetales de planta de fresa *vs Botrytis cinerea in vitro* ……..55

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS ……...……56

7. CONCLUSIONES …….....63

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS ……64

Índice de Tablas

TABLA 1 Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea* ……..……..…….23
TABLA 2 Inhibición de esporulación de *B. cinerea* en extractos vegetales de planta de fresa ……...……52
TABLA 3 Índices de retención de los extractos etanólicos de planta de fresa ….54

Índice de Figuras

FIGURA 1 Planta de fresa …….…..…… 17
FIGURA 2 Cultivo de fresa ……...…….. 19
FIGURA 3 Fruto de fresa infectado por *Botrytis cinerea* ……...…… 22
FIGURA 4 Porcentaje de producción de biomasa en base al peso seco de *B. cinerea in vitro* a partir de su desarrollo con la aplicación de los extractos etanólicos de planta de fresa EFEC y EFES en diferentes volúmenes ……..……..….. 51
FIGURA 5 Efecto de extractos vegetales de fresa: EFES y EFEC sobre la inhibición de *B. cinerea* en frutos de fresa …….. 53
FIGURA 6 Efecto de las fracciones de los extracto etanólicos de planta de fresa EFEC y EFES sobre el crecimiento radial de *Botrytis cinerea* ……..…… 55

RESUMEN

Michoacán es el primer productor de fresa a nivel nacional, ocupando aproximadamente 4,300 hectáreas en el último año. El cultivo de fresa, es susceptible a microorganismos patógenos que causan enfermedades, tal como *Botrytis cinerea* agente causal de la podredumbre gris una de las principales enfermedades de este cultivo. Esta enfermedad, provoca pérdidas económicas importantes. Su control se hace generalmente con agroquímicos resultando en graves consecuencias ecológicas, por lo que se requiere de nuevas alternativas para su control. Una alternativa que se plantea en este trabajo, es el uso de insumos biológicos, como las plantas de fresa de ciclo productivo terminado para la obtención de extractos vegetales que presenten actividad antimicrobiana y que permitan además la sustentabilidad del cultivo.

Se evaluaron dos extractos etanólicos obtenidos de plantas de fresa desechadas al término de su ciclo productivo. El primer extracto se obtuvo utilizando etanol y aplicando alta temperatura (EFEC) y el segundo extracto se obtuvo en forma similar pero a temperatura ambiente (EFES). Se realizó una prueba *in vitro* de la actividad biocontroladora de los extractos con tres volúmenes diferentes en medio papa dextrosa agar (PDA), y una prueba *in vivo* asperjando los extractos sobre frutos de fresa. De igual manera se realizó el fraccionamiento por cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos y cada una de las fracciones de evaluó *in vitro*; confrontando cada una de las pruebas con el hongo *B. cinerea*.

El extracto EFES a la concentración de 125 μL permitió la inhibición de la producción de biomasa del hongo en base al peso seco. Otro resultado interesante fue la inhibición de la formación de esporas con ambos extractos en al menos una concentración. En la evaluación *in vivo* ambos extractos mostraron una importante inhibición del desarrollo de la enfermedad con un porcentaje de inhibición de 73.8%

para el extracto EFEC y un 66.3% para el extracto EFES en comparación con el control ($p \leq 0.05$). En cuanto a la evaluación de las fracciones obtenidas por cromatografía en capa fina, 3 de ellas en cada extracto, permitieron reducir significativamente el crecimiento micelial del patógeno. Esta actividad biocontroladora podría ser atribuida a la presencia de compuestos de tipo flavonoides.

ABSTRACT

Michoacan is the first producer of strawberry in Mexico, occupying approximately 4,300 h in the last year. The strawberry crop is susceptible to disease-causing by pathogenic microorganisms, such as, *Botrytis cinerea* gray mold as causal agent a major disease of this crop. It causes major economic losses, therefore it is usually controlled with agrochemicals, for that reason it requires of new alternative of control. An alternative that is propose in this paper, is the use of biological inputs, as strawberry plants that finished production cycle meant for obtaining plant extracts that present antimicrobial activity and also allow the crop sustainability.

Two ethanol extracts of strawberry plants were evaluated. The first extract was obtained using high temperature (EFEC) and the second extract at room temperature (EFES). It performed an *in vitro* test of the biocontrol activity of the extracts in three different volumes in potato dextrose agar (PDA), and one *in vivo* test the extracts were sprayed on strawberry fruits; in a similar way it performed a fractionation thin layer chromatography, each one of the fractions was evaluated *in vitro*; confronting each test with the fungus *B. cinerea*.

The EFES at 125 µL concentrations allowed the inhibition of the production of biomass dry weight basis of the fungus. Another interesting finding was the inhibition of spore formation in both extracts at least one concentration. In vivo evaluation both extracts showed significant inhibition of the development of the disease with a percent inhibition of 73.8% and 66.3% for EFEC and EFES compared to the control ($p \leq 0.05$). Regarding the evaluation of the fractions, three of them in each extract, allowed significantly reduce pathogen mycelial growth. This biocontrol activity could be attributed to the presence of flavonoids type compounds.

1. INTRODUCCIÓN

El cultivo de fresa en el estado de Michoacán es de gran importancia, por la cantidad de producto que se aporta al mercado, además de la generación de fuentes de empleo y divisas dentro del país, colocándose en los primeros lugares de producción nacional y exportación del fruto en los últimos años (Martínez-Bolaños y col., 2008; Medina y Aguirre, 2007).

La fresa es una planta que pertenece a la familia Rosacea y el género *Fragaria*. Presenta tallos rastreros nudosos y con estolones, hojas grandes y frutos de color rojo intenso; perennes, no climatéricos. La planta se cultiva para la obtención del fruto que es comestible, rico en vitamina A y C, además de un alto contenido en compuestos antioxidantes. Sin embargo, el fruto además de ser altamente perecedero presenta una elevada susceptibilidad al ataque de microorganismos especialmente de hongos parásitos (Chaves y Wang, 2004; Hanhineva, 2008).

Una de las principales enfermedades que ataca al cultivo de fresa, tanto a la planta en campo como a los frutos cosechados, es el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*, capaz de afectar cualquier tejido de la planta en cualquier estado de desarrollo, causando la enfermedad conocida como podredumbre gris, que se presenta inicialmente con una mancha marrón o amarillenta y después de pocos días se cubre de un moho gris. En el cultivo de fresa, si se presentan las condiciones adecuadas para su crecimiento este hongo es capaz de afectar la producción en un 95% en solo 48 horas, por lo que su control se hace necesario (Chaves y Wang, 2004). En la agricultura son frecuentes e importantes las enfermedades que se presentan en los cultivos. Los métodos de control de patógenos se han basado en el uso de agroquímicos, que originan cepas más resistentes, contaminación al medio ambiente por su uso y aplicación inadecuada, así como problemas de salud en los seres humanos, y el incremento de los costos de producción (Ghorbani y col., 2004).

Es por esto que en los últimos años se han estado buscando alternativas que contrarresten dichos efectos, como aquellas obtenidas a partir de insumos biológicos como los bioproductos los cuales son elaborados a partir de organismos vivos o recursos renovables e incluso del uso de prácticas culturales tradicionales en combinación con las nuevas prácticas tecnológicas. Estos se consideran elementos clave en el manejo integrado de los cultivos, siendo el control biológico una herramienta que utiliza estos recursos para mantener las poblaciones de especies dañinas en cultivos por debajo de niveles que causen daños económicos (Guédez y col., 2008).

Una alternativa que se ha estado evaluado desde hace ya algunos años, es el uso de extractos de plantas, que presenten actividad antimicrobiana, la cual es el resultado de la presencia de distintos grupos de compuestos químicos naturales, conocidos como metabolitos secundarios tales, como los fenilpropanoides, terpenoides y los compuestos nitrogenados que son producidos por la planta a partir ante cualquier tipo de estrés generado.

Es así que el uso de plantas de fresa como insumos biológicos para la obtención de extractos vegetales, con potencial antimicrobiano resulta importante para el manejo sustentable del cultivo de fresa en Michoacán, tomando en cuenta que en el último año el cultivo de fresa ocupó una superficie sembrada de 4,325 ha (SIAP-2012) con aproximadamente de 55 a 60 mil plantas/ha, las cuales cada ciclo de siembra son importadas pagando regalías a las compañías productoras de plantas, y al final de su ciclo son desechadas y muy poca cantidad es reintegrada al cultivo como abono verde. Por lo tanto el objetivo del trabajo fue probar extractos vegetales de la planta de fresa de ciclo productivo terminado para el control del hongo fitopatógeno *B. cinerea*.

2. ANTECEDENTES

2.1. Generalidades Fresa

La fresa es un fruto que se consume a nivel mundial tanto en fresco como procesado en un gran número de productos, debido a su sabor y aroma, y sus propiedades nutricionales como su contenido de vitamina A y C, y de compuestos antioxidantes. De acuerdo a diversas investigaciones estos compuestos ayudan a contrarrestar efectos involucrados en procesos de oxidación que se encuentran relacionados con algunas patologías crónico degenerativas como las enfermedades cardiovasculares, diabetes, cáncer, y enfermedades neurodegenerativas (Rivera, 2012).

2.1.1. Descripción de la Fresa

La planta de fresa taxonómicamente pertenece dentro de la división *Magnoliophyta*, de la clase *Magnoliopsida*, la familia Rosaceae y al género *Fragaria*.

Es una planta herbácea, rastrera y perenne; compuesta por un sistema radicular de raíces primarias y secundarias de aspecto fibroso, que surge de la corona lo que le permite fijarse al suelo así como incorporar agua y minerales esenciales. La profundidad del sistema radical es variable y depende de las condiciones del suelo, así como la presencia de microorganismos patógenos.

Las raíces alcanzan de 30 a 40 cm de profundidad concentrándose la mayor cantidad en los primeros 25 cm del suelo. El tallo, que funciona como medio de transporte de las sustancias provenientes de raíz hacia las hojas y viceversa, está constituido por un tallo acortado llamado comúnmente corona, presenta tejidos vasculares y además puede llegar a formar coronas secundarias o brotes con raíces.

Las hojas son el área fotosintética de la planta, son trifoliadas, dentadas, blancas por el envés y color verde brillante del haz. Poseen una gran cantidad de estomas, entre 300 y 400 mm^{-2} por lo que presentan una elevada tasa de transpiración. El estolón es un brote que se forma a partir de yemas auxiliares de las hojas, que se encuentran situadas en la base de la corona, son rastreros, largos, delgados y pueden ser usados fácilmente para propagación obteniendo plantas “hijas”. Las flores son los órganos reproductivos de la planta, son de color blanco, con cinco a seis pétalos. Pueden ser “perfectas” con órganos femeninos (pistilos) y masculinos (estambres), o “imperfectas” con solo un tipo de órgano reproductor. Las inflorescencias se encuentran formadas con una flor al extremo de cada eje. Las inflorescencias pueden ser de forma basal o distal y el fruto es comestible denominado botánicamente “eterio” un fruto falso formado por un engrosamiento del receptáculo floral, siendo los aquenios (semillas) sobre el receptáculo, el verdadero fruto (Figura 1) (Branzanti, 1985; INFOAGRO 2012).

Figura 1.Planta de fresa.

2.1.2. Importancia de la fresa a nivel Mundial

La fresa es un fruto que se cultiva en más de 20 países, siendo EE.UU. el principal productor aportando 1, 294,180 t de la producción mundial seguido de Turquía, en tercer lugar España, en cuarto lugar Egipto, en quinto lugar la República de Corea y México con el sexto lugar con una producción correspondiente a 226,657 t en el 2010 (FAO 2012).

En cuanto a exportaciones, en el 2010, España se colocó como principal exportador de fresa con 30.81% seguido de EE.UU. con el 19.30% mientras que México se colocó en el tercer lugar con 66,914 t, de las exportaciones totales correspondientes al 11.06% (Hernández y col., 2011).

Además, las importaciones de fresa en el mundo resultan de gran interés económico para México ya que en el año 2009 EE.UU. importó más de 84 mil toneladas de fresa donde el 99.30% de esa importación provino de México (Hernández y col., 2011), colocando a la fresa producida en México en un punto importante dentro del mercado mundial.

2.1.3. Importancia de la fresa en México

En la producción de fresa en México en los últimos años, destacan ocho estados productores: Aguascalientes, Baja California, Baja California Sur, Guanajuato, Jalisco, México, Michoacán y Zacatecas. Estos fueron los principales productores a nivel nacional en el año 2011. Michoacán ocupa el primer lugar en producción nacional con el 52% de la producción total (109,810 t), seguido de Baja California con el 40% de la producción (84,995 t) y Guanajuato en tercer lugar con el 4% (8,722 t) (SIAP, 2012).

En lo que va del año del ciclo agrícola 2012, la producción de fresa se ha incrementado en un 38.38% colocándose nuevamente Michoacán, en el primer lugar con el 55.91% de la producción total correspondiente a 190,386 t, seguido de Baja California con el 35.26% y Guanajuato con el 4.6% de la producción total nacional (SIAP-2012).

El producto fresa en Michoacán, resulta de gran importancia a nivel nacional no solo por volumen de producción sino también por la generación de empleos y divisas por concepto de exportación. SAGARPA en el 2010 reportó, que solo el estado de Michoacán generó el 50% de los empleos en relación al cultivo de fresa a nivel nacional.

Dentro del estado de Michoacán destacan tres regiones productoras; el Valle de Zamora, Maravatío y Panindícuaro, las cuales han convertido el cultivo de fresa en una actividad productiva y punto de desarrollo notable en los últimos años por el aumento de producción, industrialización e infraestructura productiva (Figura 2) (Medina y Aguirre, 2007).

Sin embargo, el fruto de fresa presenta pérdidas importantes al enfrentarse a diversos problemas tecnológicos y biológicos, ya que el fruto es muy susceptible a plagas y enfermedades después de la cosecha, además por su corta vida de anaquel.

Figura 2. Cultivo de fresa

2.2. Principales enfermedades del cultivo de fresa

El cultivo de fresa como cualquier otro cultivo agrícola, es susceptible al ataque de patógenos. Las infecciones fúngicas son las principales enfermedades que afectan al cultivo de fresa tanto en el campo como en postcosecha. Algunas se describen a continuación:

Antracnosis: causada por el hongo *Colletotrichum spp.* afecta casi a toda la planta, en frutos maduros se desarrollan puntos firmes y hundidos de color marrón oscuro o negro al inicio de la infección, cuando se encuentran en condiciones elevadas de humedad se desarrolla el hongo de micelio blanco y una masa de esporas de color rosa-salmón (Cedeño y Carrero,1997; Ullio y Macarthur, 2004). Así las especies de *Colletotrichum* como *Colletotrichum gloeosporioides* y *Colletotrichum acutatum* causan enfermedades como la pudrición de la corona y la mancha negra de las hojas (Black leaf spot) respectivamente.

Mancha foliar: causada por *Mycosphaerella fragariae* aparecen inicialmente como manchas pequeñas circulares, de color morado en la superficie superior de la hoja, crecen entre 3-6 mm de diámetro y el centro de la macha torna de color gris a blanco en las más viejas y color marrón en las hojas jóvenes. El hongo produce más esporas en las manchas y es capaz de afectar peciolos, estolones, tallos y el fruto (Ellis, 2008; Ullio y Macarthur, 2004).

Quemadura de la hoja: causada por el hongo *Diplocarpon earliana*, la enfermedad se presenta por pequeñas manchas irregulares de color púrpura con centros de color marrón, cuando infecta mayor superficie las manchas se tornan de un color violeta rojizo hasta marrón, la hoja se seca hacia arriba con los márgenes enrollados y presenta las características de la enfermedad, ataca peciolos, tallos, flores y frutos donde las manchas son alargadas y hundidas de color rojizo. (Ellis, 2008; Ullio y Macarthur, 2004).

Tizón de la hoja: causada por el hongo *Phomopsis obscurans,* la infección se presenta con manchas circulares de color rojizo a púrpura en diferentes zonas de la mancha, estas crecen en forma de V y se tornan de color marrón oscuro en la zona interior y marrón en el exterior, las lesiones siguen las venas principales y siguen hasta el interior, infecta además de las hojas peciolos, cálices y fruto (Ellis, 2008; Ullio y Macarthur, 2004).

Pudrición de la fruta: (leaf blotch/Gnomonia fruit rot) causada por el hongo *Gnomonia comari* infecta las flores y los frutos de la planta generalmente desde la base, los cálices de las flores y los frutos inmaduros son rápidamente infectados y la fruta se seca. Cuando el cáliz y el fruto mueren se forma una podredumbre marrón que se extiende lentamente y cubre el fruto. La mancha foliar se produce de color púrpura o marrón con puntos necróticos (Ullio y Macarthur, 2004)

Oídio: causada por el hongo *Sphaerotheca macularis*, los síntomas iniciales de la enfermedad se presentan en las hojas hacia arriba de los bordes, seguido de un manchado irregular de color púrpura en la superficie de las hojas superiores y generalmente a lo largo de las venas principales. Esta enfermedad no produce masas de esporas pero si un micelio de color blanco (Ullio y Macarthur, 2004).

Marchitamiento por fusarium: Causada por el hongo *Fusarium oxysporum* las platas se marchitan y mueren rápidamente, los síntomas se presentan en la corona con una coloración marrón-rojiza. Causando pudrición inhabilitando el intercambio de compuestos (Ullio y Macarthur, 2004).

Pudrición de la corona: Causada por *Phytophthora nicotianae* un patógeno importante que afecta las raíces en una amplia variedad de cultivos, provoca una marchites rápida que se presenta inicialmente en las hojas jóvenes para extenderse a toda la planta. La corona presenta un color rojizo a marrón y muestra signos de descomposición (Ullio y Macarthur, 2004).

Podredumbre gris: Causada por el hongo *Botrytis cinerea* considerado como el principal patógeno que afecta el cultivo de fresa en campo así como en postcosecha, infecta cualquier parte de la planta en cualquier estado de desarrollo, la enfermedad

se presenta inicialmente como una mancha marrón-amarillenta hacia el final de cáliz, y a los pocos días se cubre de una apariencia polvosa de moho gris en toda la superficie de la fruta provocando una pudrición, en las hojas se forman manchas de color café necrosadas en un estado latente para dispersarse y seguir con la infección (Chaves y Wang, 2004; Ullio y Macarthur, 2004).

Al ser *Botrytis cinerea* considerado uno de los principales y más importantes hongos patógenos en el cultivo de fresa y modelo de estudio, se describe más a fondo las características del hongo (Figura 3).

Figura 3. Fruto de fresa infectado por el hongo *B. cinerea*

2.3. *Botrytis cinerea*

Botrytis cinerea Pers., es un hongo necrotrófico, agente causal de la Podredumbre gris. Es capaz de afectar a más de 200 especies vegetales. Se desarrolla bajo condiciones de elevada humedad relativa y temperaturas de 0°C a 25°C.

2.3.1. Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea*

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea*.	
Clasificación taxonómica	
Reino:	Fungi
División:	Amastigomycota
Subdivisión	Deuteromycota
Clase:	Deuteromycetes
Subclase:	Hyphomycetidae
Familia:	Moniliales
Orden:	Moniliaceae
Género:	*Botrytis*
Especie:	*cinerea*
	Fiallos, 2012

2.3.2. Morfología y función de las estructuras de *Botrytis cinerea*

La morfología de *B. cinerea* y la función de cada una de sus partes le permite infectar a su hospedero (Holz y col., 2007), por lo que conocer al patógeno resulta en información para crear nuevas alternativas de control.

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

plantas. A partir del micelio, generalmente envejecido, se forman diversas estructuras tales como los macroconidióforos, microconidióforos y esclerocios cuya función es la propagación y supervivencia ante condiciones desfavorables (Espinosa, 2006; Holz y col., 2007).

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

Las clamidosporas son células de aspecto hialino de alta variabilidad de forma y tamaño. Se consideran estructuras de resistencias bajo condiciones críticas. Se forman a partir de la transformación de algunas partes de micelio y liberadas por la desintegración de las hifas. Bajo condiciones de humedad y sin nutrientes, estas estructuras germinan dando lugar a microconidios que permanecerán en estado latente hasta que se tengan los nutrientes para germinar originando hifas que penetren al huésped, esporulen y formen conidios nuevamente (Holz y col., 2007).

Los esclerocios son considerados las estructuras de mayor importancia involucradas en la supervivencia y reproducción del hongo. Pueden sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas y producir estructuras llamadas apotecios, las cuales tienen una considerable capacidad de producción de conidios. La formación de estas estructuras está influenciada por varios factores como la temperatura, la luz, el pH y la composición del tejido sobre el cual se desarrollan. Dentro de los esclerocios se encuentra pigmentos melánicos y una reserva de nutrientes (Espinosa, 2006; Holz y col., 2007).

2.3.3. Ciclo de infección de *Botrytis cinerea*

El inóculo de *B. cinerea* se encuentra presente generalmente en el campo dentro de un proceso que se repite por la producción, liberación y dispersión del inóculo. Tal como se describe el ciclo de infección de *B. cinerea* al iniciar con la dispersión de algunas de la estructuras que permitan al hongo seguir desarrollándose. Estas estructuras se dispersan a través del aire, la lluvia o los insectos, hasta entrar en contacto con una superficie vegetal e iniciar el ciclo descrito a continuación (Benito, 2000; Espinosa, 2006).

2.3.3.1. Adhesión y germinación

La adhesión de las estructuras de propagación como los conidios, se lleva a cabo en dos fases. En la primera el conidio se hidrata para establecer interacciones hidrofóbicas y permitir su germinación mediada por diversos factores como la disponibilidad de agua y una humedad relativa alta (>93%), la dureza e hidrofobicidad de la superficie, la fuente de carbono, los nutrientes y la producción de etileno por parte de la planta. La segunda etapa se presenta cuando el conidio ha germinado y se forma una matriz compuesta de lípidos, polisacáridos y melanina que le permite al hongo adherirse a la superficie del huésped (Benito, 2000; Espinosa, 2006).

2.3.3.2. Penetración

La infección puede iniciar a partir de tejidos dañados o que han sido infectados previamente por algún otro patógeno, mediante la penetración directa e incluso por aberturas naturales como los estomas. Es así que el apresorio o el tubo germinativo inicia la penetración. Sin embargo, *B. cinerea* es capaz de producir sustancias que tienen la capacidad de degradar el material vegetal y facilitar la penetración. Estas son enzimas como la cutinasa la que destruye la cutina, la primera barrera de protección de la planta. La pectinasa es otra enzima que degrada la pectina de la pared celular y las lipasas, enzimas que hidrolizan ésteres de ácidos insaturados de cadena larga que forman parte de la cutícula y la cera presente en este tejido (Benito, 2000; Espinosa, 2006).

2.3.3.3. Muerte del tejido vegetal

Cuando el hongo penetra el tejido vegetal, da origen a una lesión primaria que facilita la invasión del tejido por la difusión de compuestos con actividad fitotóxica como toxinas, metabolitos secundarios e.g. botridial, dihidrobotridial y bocinolina de *B. cinerea*, relacionados con las manchas necróticas. El ácido oxálico al estar presente dentro de la planta forma cristales de oxalato cálcico el cual actúa como quelante de iones de calcio y cobre. La eliminación del calcio de la pectina provoca que esta absorba agua y se hinche causando una deformación. Otra forma de ocasionar la muerte celular del tejido está mediada por la producción de especies reactivas de oxígeno (Benito, 2000; Espinosa, 2006).

2.3.3.4. Fase de latencia

Durante esta fase, las condiciones son desfavorables para el hongo, ya que se presentan los mecanismos de defensa de la planta, por lo que el hongo permanece en un estado de latencia. Este periodo se describe en un gran número de frutos aunque se presenta con mayor frecuencia en fresa, frambuesa y vid (Benito, 2000; Espinosa, 2006).

2.3.3.5. Colonización y maceración

Cuando las condiciones son nuevamente favorables para el hongo y ha logrado invadir intracelularmente los tejidos de la planta, la infección se establece, segregando una serie de enzimas degradativas obteniendo nutrientes para su crecimiento a partir del tejido vegetal que se encuentra a su alrededor (Benito, 2000; Espinosa, 2006).

2.3.3.6. Esporulación y dispersión

La putrefacción del tejido vegetal se presenta una vez establecida la infección de manera que las condiciones permiten la formación de conidios y conidióforos sobre la superficie del cultivo dando lugar a la coloración característica de la enfermedad. Una vez que el hongo ha esporulado la dispersión de los conidios inician nuevamente el ciclo en otra superficie vegetal (Benito, 2000; Espinosa, 2006).

2.4. Alternativas de control

Las enfermedades en los cultivos generan pérdidas importantes y crean amenazas económicas en los ecosistemas agrícolas. Las enfermedades se presentan al cumplir tres condiciones: 1) cuando el hospedero se encuentra susceptible, 2) cuando se encuentra un microorganismo patógeno que cause enfermedad y 3) cuando se encuentran en el entorno las condiciones adecuadas para el desarrollo de la enfermedad (Ghorbani y col*.,* 2008).

Generalmente las prácticas agrícolas para el control de enfermedades se concentran cuando la enfermedad se hace evidente, dejando a un lado la práctica más importante que es la prevención, en el periodo antes de la infección.

Es así que el hombre se ha enfocado en satisfacer la necesidad de una elevada producción de alimentos, aplicando tecnologías que permitan mantener el producto evitando pérdidas del mismo, independientemente de la conservación de los recursos naturales. Sin embargo, actualmente la preocupación de la conservación del ecosistema y el medio ambiente se hace evidente en la creación de nuevas tecnologías. Existen pequeños grupos de investigadores que se interesan en lograr una agricultura sustentable.

Las alternativas de control de plagas y enfermedades han cambiado con el paso del tiempo, antes del uso del control químico, la prácticas de manejo de enfermedades se trataban de manera preventiva con el control cultural eliminando aquellas plantas que fueran focos de infección para evitar la propagación, aplicando productos básicos de plantas como el ajo entre otros, sin embargo, esta práctica se dificultaba cuando los campos de producción se extendían. Es así que por la necesidad de cuidar los cultivos surgieron los productos químicos.

2.4.1. Control químico

El control químico se basa en el uso de compuestos químicos sintéticos provenientes de hidrocarburos a partir de sustancias tóxicas con acción biocida, reprimiendo el desarrollo de organismos dañinos. Este tipo de control se ha considerado el de mayor difusión, impulsado por empresas comerciales, con tecnología de fácil adopción y con resultados en corto plazo.

El crecimiento y desarrollo de la industria tuvo una importante influencia sobre la agricultura y para el incremento en la producción de granos principalmente, el maíz, arroz y trigo, productos elementales para la comercialización nacional e internacional, esto debido al cambio tecnológico que se inició a mediados del siglo XX, con la llegada de la Revolución Verde, un modelo que nace en EE. UU. que se implementó para obtener mayores rendimientos bajo una técnica y la creación de pilares políticos y económicos que mantendrían a flote la industria, la agricultura y la transformación del país (Pichardo, 2006).

Es así que a partir de los paquetes tecnológicos que incluían semillas mejoradas de maíz, trigo y arroz en los años 90 los rendimientos aumentaron un 70% en los años 90 en países en desarrollo, logrando así mayor rentabilidad del producto a pesar del costo de la tecnología el producto se hizo más barato (Pichardo, 2006).

En cuanto al uso de productos químicos estos tuvieron un impacto importante, desde el inicio de su empleo, aumentaron la producción de los cultivos y mostraron acción protectora contra plagas y enfermedades, su uso se intensificó y en la mayoría de los casos de forma incorrecta por la falta de información, teniendo consecuencias importantes desde los años 40, los cuales se reflejan en suelos pobres en materia orgánica, el bajo contenido de nutrientes disponibles así como de bajas poblaciones de microorganismos, tomando en cuenta que estas condiciones desfavorables del suelo influyen en el crecimiento de las plantas y en la aparición y gravedad de las enfermedades(Ghorbani y col., 2008).

2.4.1.1. Efecto del uso de agroquímicos

La base de desarrollo de cada una de las plantas depende enteramente del medio ambiente y su ecosistema, que, cuando se encuentra en desequilibrio, trae como resultado consecuencias con un alto costo al medio ambiente y la salud humana. Es así que el uso indiscriminado de agroquímicos afecta todo el ecosistema, suelo, aire, agua, organismos benéficos así como patógenos, incluso al ser humano.

2.4.1.2. Efecto del uso de agroquímicos en el medio ambiente

El suelo es el sistema elemental para la producción del mayor número de cultivos. Con el uso excesivo de agroquímicos, el suelo puede llegar a una degradación química y física del mismo, esto es, la pérdida total o parcial de su capacidad productiva, tanto para su utilización en el presente como en el futuro. Los datos más recientes del país muestran que la degradación de suelos para el año 2002, al menos el 44.9% de la superficie nacional mostraba al menos algún signo de degradación (SEMARNAT, 2009).

Un suelo degradado provoca una disminución progresiva del rendimiento de los cultivos, aumento el costo de producción, el abandono de las tierras e incluso en los casos más extremos la desertificación, siendo la labranza la principal causa de degradación de los suelos. Debido a la perdida de nutrientes, modificación de las propiedades fisicoquímicas y deterioro de la estructura del suelo, disminución de la capacidad de retención de agua, pérdida física de materiales, incremento de la toxicidad (Ortega, 2009; Ghorbani y col., 2008).

Gran parte de los agroquímicos después de su aplicación terminan en aguas subterráneas, ríos, lagos y lagunas. Esto se debe al largo tiempo en que los

agroquímicos persisten en el suelo, manteniendo su actividad biológica, que depende de la toxicidad y su capacidad para degradarse en el medio (Ortega, 2009).

La contaminación del agua se presenta por dos tipos de agroquímicos: plaguicidas y fertilizantes. Los plaguicidas en el agua, afectan su calidad en el caso de fertilizantes se da por un incremento de nutrientes principalmente nitrógeno, fósforo; aunque puede darse también por sílice, potasio, calcio, hierro y manganeso dando origen al fenómeno de eutrofización (RAPAL-Uruguay, 2010; Hernández y Hansen, 2011).

Los agroquímicos afectan de igual manera la calidad del aire y de los alimentos, además genera problemas en la salud humana por la continua exposición. Sin embargo, la diversidad biológica es una de las más afectada, por su actividad biocida de amplio espectro ante los organismos patógenos, así como los enemigos naturales, conjuntamente generando microorganismos con mayor resistencia y en consecuencia, la creación de químicos más tóxicos (García, 1998; Badii y col., 2007; Ghorbani y col., 2008).

2.4.1.3. Clasificación de agroquímicos

Una primera clasificación de los agroquímicos se hace en función de su fin aplicativo. Detener o aminorar plagas (plaguicidas) y aquellos que proporcionan nutrientes a las plantas (fertilizantes).

Los plaguicidas se pueden clasificar de acuerdo a un grupo de plaga u organismo que se considere dañino o intervenga con el desarrollo de la planta. Dentro del grupo de plaguicidas se conocen; los herbicidas, insecticidas, nematicidas, bactericidas y fungicidas (Ramírez y Lacasaña, 2001).

Los fungicidas son productos químicos que matan o evitan el desarrollo de hongos y algas de cultivos agrícolas. Su clasificación se basa en el periodo de

aplicación con respecto a la infección que causan los hongos y la movilidad del producto sobre los tejidos, es así que se clasifican en tres grupos: 1) de protección, 2) de erradicación y 3) sistémicos. De acuerdo a su naturaleza química: 1) inorgánicos, 2) organometálicos y 3) orgánicos (Barcenas, 2005).

Los fungicidas inorgánicos se basan en el empleo de dos compuestos químicos de acción fungicida. El azufre que actúa bloqueando las enzimas que intervienen en el mecanismo respiratorio del hongo y el cobre incluyendo sus derivados como el sulfato, el oxicloruro, el carbonato, óxido cuproso, que actúan como iones cúpricos, inhibiendo una gran variedad de grupos tiol (-SH) en las enzimas. También provocan la coagulación del protoplasma celular y al inhibir el desarrollo de las esporas del hongo. Los fungicidas organometálicos utilizan elementos metálicos como: Ag, Hg, Cu, Cd, Cr, Ni, Pb, Co, Zn, Fe y Ca tomando en cuenta que la toxicidad del mismo aumenta con la masa atómica. Los fungicidas orgánicos pertenecen a los fungicidas actuales más importantes. Estos fungicidas pertenecen a diferentes grupos químicos como: ditiocarbamatos, derivados fenólicos, derivados ftalimídicos, sulfonamidas, bencimidazoles, tiofanatos, oxatiinas y pirimidinas. Estos actúan como quelante de iones metálicos y evitan la incorporación de fosfato inorgánico al ATP, así mismo desacoplan la fosforilación oxidativa y rompen enlaces R-R oxidando el interior de la célula (Barcenas, 2005).

En cuestión de los fungicidas su aplicación presenta mayores riesgos carcinogénicos que los insecticidas y herbicidas juntos (Wilson y col., 1997). En el caso del cultivo de fresa el control de *B. cinerea* se lleva a cabo por fungicidas que tienen acción directa a partir de tratamientos anticriptogámicos: derivados de imidazoles, benomilo, entre otros; folpet, captan, captafol, derivados ftalimídicos; benzoamidazoles de acción sistématica, tiofanato, benlate, etc; diclofuanidas, adicionados generalmente con oxicloruros de cobre; ditiocarbamato, thiram, TMTD, zineb, entre otros (Branzanti, 1985).

2.4.2. Control biológico

A raíz de las consecuencias del uso inadecuado de los agroquímicos, ha surgido la necesidad de buscar y analizar nuevas alternativas que permitan controlar las enfermedades agrícolas, reduciendo el impacto negativo sobre el medio ambiente. Es así que se han desarrollado productos de origen biológico, basados en la utilización de microorganismos manejando las interacciones que permitan el control de plagas o enfermedades por competencia por nutrientes, espacio, entre otros. El uso de insectos en el papel de predadores, extractos de plantas con actividad biológica, se cuentan entre dichas alternativas (Altieri, 2001; Murillo y Salazar, 2011).

El control biológico tuvo sus inicios como alternativa para el control plagas, es así que fue inicialmente definido como la "acción de parásitos, depredadores o patógenos que mantienen poblaciones de otros organismos a un nivel más bajo de lo que pudiera ocurrir" (DeBach, 1997). Sin embargo, esta definición ha ido cambiando a lo largo del tiempo y fue la Organización Internacional de Lucha Biológica (OILB) quien definió el control biológico como la "utilización de organismos vivos, o de sus productos, para evitar o reducir las pérdidas o daños causados por los organismos nocivos" (Guédez y col., 2008). Aunque aún este concepto sigue en controversia.

El uso de control biológico presenta ventajas y desventajas, sin dejar a un lado riesgos y beneficios. Dentro de las ventajas del control biológico se encuentra el poco o nulo efecto de daño colateral hacia el ser humano; la generación de organismos resistentes es menor; este se llega a mantener a largo plazo y puede llegar a ser permanente; su empleo reduce el uso de agroquímicos y las relaciones costo-beneficio se ven favorecidos. En cuanto a las desventajas que presenta es la acción lenta, requiere de mayor investigación ya que cada caso de control biológico es específico para el control de enfermedades o plagas (Lauwerys, 2004).

El control biológico hace uso de parasitoides, depredadores, entomopatógenos, hongos antagonistas o micopatógenos, bacterias antagonistas y

levaduras, y en los últimos años extractos bacterianos y el uso de extractos vegetales.

Los parasitoides son organismos que se alimentan de un huésped de la misma clase taxonómica siendo su fase activa el estado larval, y puede atacar por ejemplo huevos (*Trichogramma* y *Telenomus*), que atacan larvas (*Cotesia flavipes*) o pupas (*Spalangia cameroni*). Los depredadores son insectos polífagos que se alimentan de diferentes estados biológicos de sus presas que generalmente son otros insectos, por ejemplo depredadores *Poliste erythrocephalus* y *Chrysoperla carnea*. Los entomopatógenos son microorganismos que infectan al insecto causándole la muerte, ya sean hongos (*Beauveria bassiana*), virus (Baculovirus) o bacterias (*Bacillus thurigiensis*). Los hongos antagonistas son agentes reguladores naturales que impiden el desarrollo de ciertos hongos o nematodos (*Trichoderma* sp) (Guédez y col., 2008). Las bacterias como *Pseudomonas cepaci, Pseudomonas* syringae, *Bacillus subtilis*) presentan efecto antagonista sobre hongos. Las levaduras como *Debaryomyces hansenii, Rhodotorula glutinis* y *Aureobasidium pullukans* presentan actividad antagonista hacia diversos patógenos que se presentan en postcosecha como bacterias y hongos (Hernández y col., 2007a). Los extractos vegetales presentan actividad antimicrobiana así como insecticida (Bazan y col., 2011).

La agricultura actual requiere de i investigación intensa, que permita el manejo integrado de las plagas y las enfermedades, para lograr implementar una agricultura sustentable a partir de una biotecnología segura, rentable y efectiva.

En los últimos años el estudio y la elaboración de productos biológicos ha tomado importancia en el mundo científico, y las plantas presentan un amplio campo de estudio en el control de enfermedades de acuerdo a su composición química natural.

2.5. Compuestos químicos de las plantas

Las plantas son organismos vivos sésiles, razón por la cual han desarrollado por evolución mecanismos de defensa que les permiten responder ante cualquier tipo de estrés presente en el entorno. En general se distinguen dos tipos de estrés: el abiótico, provocado por factores ambientales, físicos y químicos; y el estrés biótico, causado por la acción de otros seres vivos como patógenos, otros vegetales y animales. Tomando en cuenta cada tipo de estrés, estos no desencadenan el mismo mecanismo de respuesta, sin embargo, pueden presentar una respuesta común como la síntesis de compuestos fenólicos, debido a la estimulación de la enzima fenilalanina amonio liasa, que responde a elicitores bióticos y a la luz UV (Herrero, 2000).

Los compuestos que le permiten a la planta defenderse y adaptarse al medio en el cual se desarrollan, son obtenidos como productos del metabolismo primario de la planta en el cual se generan las macromoléculas esenciales para la vida. Estos "Productos" conocidos como metabolitos secundarios juegan un rol importante en las interacciones de las plantas con otros organismos y su supervivencia pues no son considerados esenciales para el crecimiento de la planta (Croteau y col., 2000).

2.5.1. Metabolismo secundario

La mayoría de los compuestos que se obtiene a partir de productos del metabolismo primario, se conocen como metabolitos secundarios, estos compuestos fueron definidos en el marco ecológico en 1994 como "Sustancias ecológicamente eficaces" y su distribución se encuentra limitada en comparación con los metabolitos primarios los cuales se consideran "Sustancias fisiológicamente eficaces" los cuales se encuentran presentes en todo el reino vegetal (García, 2004).

Actualmente se conocen cerca de 20,000 estructuras de metabolitos secundarios, que se clasifican en tres grandes grupos de acuerdo a su composición química básica en: fenilpropanoides, terpenoides y alcaloides. Además, cada tipo de compuesto secundario está estrechamente relacionado con una o varias funciones específicas en la planta que lo contiene y hasta la fecha, en la mayoría de ellos, no se conoce con exactitud cada función en particular (Sepúlveda y col., 2003; García, 2004; García y Pérez, 2009).

2.5.1.1. Fenilpropanoides

Estos compuestos reciben el nombre de compuestos fenólicos, polifenoles o fenilpropanoides ya que presentan un grupo fenol, esto es un anillo aromático unido a un grupo hidroxilo. La ruta de biosíntesis de estos compuestos se encuentra en la vía del ácido shikimico, a partir de la eritrosa-4-P, el ácido fosfoenolpirúvico y aminoácidos aromáticos como la fenilalanina, el triptófano y la tirosina.

Estos compuestos participan como agentes antimicrobianos, protectores de la radiación UV, reguladores de crecimiento, algunos actúan como pigmentos de las plantas, flores y frutos. Y se clasifican en: ácidos fenólicos, fenoles simples, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas.

Los fenilpropanoides debido a su alta fitotoxicidad son almacenados en la planta en su forma glucosilada en la vacuolas y algunos otros se conjugan con otros componentes de la pared celular (Croteau y col., 2000; Domingo y López, 2003; Sepúlveda y col., 2003)

2.5.1.2. Terpenoides

Es el grupo con mayor número de metabolitos secundarios. Se sintetizan a partir de dos rutas: la del ácido mevalónico y la ruta del metileritritol fosfato. Dentro de la planta, actúan como pigmentos, hormonas, proporcionan olor y sabor, además presentan propiedades antimicrobianas y actúan como repelentes de insectos. Su clasificación se basa en el número de unidades de isopreno: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos y politerpenos. El lugar de síntesis de los mono, di y tretaterpenos se sintetizan en los plástidos, los sesquiterpenos en el retículo endoplásmico, triterpenos y politerpenos en el citosol (Croteau y col., 2000; García y Pérez, 2003; Sepúlveda y col., 2003; Montes, 2009).

2.5.1.3. Alcaloides

Este grupo de metabolitos secundarios se caracteriza por tener al menos un átomo de nitrógeno en la molécula, la mayoría son heterocíclicos algunos otros no cíclicos o alifáticos. Estos compuestos presentan actividad antimicrobiana y se clasifican según los anillos presentes en su estructura: quinolina, isoquimolina, indol, tropano, quinolizidina, piperidina, purina, y pirrolizideno. La síntesis de amidas y alcaloides tiene lugar en la mitocondria (Croteau y col., 2000; Sepúlveda y col., 2003 y Montes, 2009).

2.6. Mecanismos de defensa y acción de los metabolitos secundarios

El ataque de patógenos en las plantas resulta en una condición desfavorable que conlleva a la activación de sus mecanismos de defensa para detener, aminorar o contrarrestar la infección (Madriz, 2002). Por otra parte existen compuestos pre-infeccionales y otros post-infeccionales con capacidad de inhibir el desarrollo de microorganismos (Maestro y col., 1993).

Los compuestos pre-infeccionales se clasifican en dos grupos: 1) prohibitinas, compuestos pre-infeccionales que pueden reducir o detener el desarrollo de microorganismos *in vivo* tales como la barreras estructurales, donde interviene la cutículas, suberilina y la pared celular y 2) inhibitinas, compuestos que se encuentran presentes en vegetal sano, y aumentan en concentración en el momento de la invasión del patógeno, tales como la lignificación y suberización.

Los compuesto post-infeccionales se dividen en dos categorías: 1) post-inhibitinas, que son compuestos que se forman por una reacción de hidrólisis u oxidación de compuestos existentes en tejido sano como especies reactivas de oxígeno y 2) fitoalexinas, compuestos que se forman de *novo* a partir de la activación de genes o sistema enzimático que no operaba antes de la infección y son detectados únicamente en plantas infectadas, tales como las fitoalexinas, proteínas relacionadas con la patogénesis, entre otras (Maestro y col., 1993).

Las plantas para defenderse cuentan con diferentes barreras que van evitando que la infección del patógeno avance. Cuando un patógeno llega a la superficie vegetal, este es reconocido por la planta a partir de moléculas receptoras que detectan moléculas inductoras liberadas por el patógeno; cuando esto sucede los mecanismos de defensa de las plantas son activados dando lugar a una respuesta incompatible, presentándose una reacción hipersensible, la producción y síntesis de metabolitos secundarios y proteínas PR, si la planta no reconoce al patógeno se

presenta una respuesta compatible, donde el patógeno infecta la planta sin activar los mecanismo de defensa (García y Lozoya, 2004).

La primera barrera con la que se encuentra el patógeno son las barreras físicas o estructurales de la planta; la presencia de pelos, ceras, cutícula, pared celular, el comportamiento de los estomas, lenticelas, tejido interno, lignificación y suberificación, impiden la entrada y establecimiento del patógeno. Cuando estas barreras son superadas el patógeno entra en contacto con el segundo sistema de defensa, la respuesta química en donde participan los metabolitos secundarios, especies reactivas de oxígeno y enzimas entre otros (Camarena y De la Torre, 2007; King y col., 2011).

2.6.1. Actividad antimicrobiana de los metabolitos secundarios

En cuanto a los metabolitos de origen fenólico se han encontrado en distintas especies de plantas, este tipo de moléculas que presentan actividad antimicrobiana, hacia hongos, bacterias y virus, por ejemplo: el timol y algunos taninos del tomillo (*Thymus vulgari*), taninos de bardana (*Arctium lappa*), cumarinas de comino (*Carum carvi*), taninos de cáscara sagrada (*Rhamnus purshiana*) hacia hongos, bacteria y virus. La salicina y taninos del sauce (*Salix alba*), taninos de gaulteria (*Gaultherua procumbens*), cumarinas de bregandia (*Galium odoratum),* phloretina de la manzana (*Malus* sylvestris), taninos de canela (*Cinnamomum verum*), catequina de la planta de té (*Camellia sinensis*), Lupulona, humulona del lúpulo (*Humulus lupulus*) presentan actividad de amplio espectro. Ácido antémico de la manzanilla (*Matricaria chamomilla*), el ácido salicílico de anacardo (*Anacardium pulsatilla*), el ácido nordihidroguaiarético del chaparral (*Larrea tridentada*), el ácido gálico de planta de henna (*Lawsonia inermis*) presentan actividad bactericida. Taninos del eucalipto (*Eucalyptus globulus*) presentan actividad sobre bacterias y virus. El resveratrol de la

uva presenta actividad antifúngica (Murphy, 1999; Van Baarlen y col., 2004; Giovinazzo y col., 2012).

Una gran variedad de compuestos terpenoides también presentan actividad hacia patógenos como: aceites esenciales de albahaca (*Ocimum basilicum*) y la capsaicina del chile (*Capsicum annuum*) presentan actividad sobre bacterias. Algunos aceites esenciales del laurel (*Laurus nobilis*) presentan actividad sobre bacterias y hongos. La terabithina del pimentero brasileño (*Schinus terebinthifolius*), el eugenol del clavo (*Syzygium aromaticum*), el mentol de la menta (*Mentha piperita*), el carvacrol de la ajedrea (*Satureja montana*), ácido caféico del estragón (*Artemisia dracunculus*) presentan actividad de amplio espectro. Timol, carvacrol, α-pineno, limoneno, 1-8 cineol, linalol del tomillo (*Thymus vulgaris*), avenacina de avena (*Avena sativa*), presentan actividad antifúngica de amplio espectro (Murphy, 1999; Montes, 2009).

La presencia de algunos compuestos nitrogenado y alcaloides con actividad antimicrobiana que se han reportado son: la berberina de bérbero (*Berberis vulgaris*) y la cocaína de la planta de coca (*Erythroxylum coca*) los cuales presentan actividad antibacteriana. La piperina del pimiento negro (*Piper nigrum*) presenta actividad hacia hongos y bacterias. La cochicina del glorioso lirio (*Gloriosa superba*), la berberina del sello de oro (*Hydrastis canadensis*), la raíz serpentina (*Rauvolfia serpentina*) y la uva de Oregón (*Mahonia aquifolia*), la reserpina de vincapervinca (*Vinca minor*), la mescalina del peyote (*Lophophora williamsii*), el opio de la amapola (*Papaver somniferum*), presentan actividad de amplio espectro. La alicina del ajo (*Allium sativum* L.) presentan actividad antifúngica de amplio espectro (Murphy, 1999; Montes, 2009).

Las plantas están compuestas de un gran número de metabolitos secundarios, algunos autores mencionan que pueden llegar a existir más de 100000 metabolitos secundarios involucrados en la defensa de todas las especies de plantas y de los cuales solo se conoce el 10% (Mazid, 2011).

2.7. Uso de extractos vegetales como alternativa de control biológico

La capacidad antimicrobiana de los extractos vegetales se debe a ciertos compuestos obtenidos del metabolismo secundario mencionados anteriormente. A partir de diversas investigaciones, se ha intensificado el estudio de los compuestos presentes en los extractos vegetales para su uso en el control de enfermedades de varios cultivos. En el caso de control de hongos fitopatógenos, Hernández y col., en el 2007b, realizaron una revisión de los estudios de extractos vegetales para el control de hongos fitopatógenos. Extractos de ajo (*Allium sativum* L.), acuyo (*Piper auritum* HBK.), guayaba (*Psidium guajava* L.) y eucalipto blanco (*Eucalyptus globulus* Labill.), inhibieron el crecimiento micelial de *Colletotricum gloeosporioides* en 54.3, 48.8, 47.7 y 39% respectivamente. El guamúchil (*Pithecellobium dulce*) redujo el desarrollo de *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Pestalotia* spp. y *Rhizopus* spp., en el caso de *Botrytis cinerea* la inhibición se presentó entre un 50 y 78%, así mismo extractos crudos de *Allium* y *Capsicum* afectaron la germinación de esporas de *B. cinerea* mientras que los extractos de nogal negro (*Juglans nigra* L.), liquidámbar (*Liquidambar styraciflua* L.*)*, *Matricaria* spp., durazno (*Prunus persica* L.), peral (*Pyrus communis* L.) y tejo inglés (*Taxus canadensis* Marsh.) inhibieron su germinación entre 90 y 99%.

De la misma manera Wilson y col., (1997), realizaron una rápida evaluación de diferentes extractos de especies de plantas como chile (*Capsicum annuum, chinense* y *frutescens*), ajo (*Allium ampeloprasum, ramosum* y *sativum*), de *adenocalymma alliaceum* presentaron la mayor actividad antifúngica en *B. cinerea*, inhibiendo la germinación de esporas en 48 h en una dilución del 10% del extracto crudo.

Bautista y col., (2000a), evaluaron la actividad antifúngica de diversos extractos foliares de planta de *Annona muricata*, *Iris spuria*, *Chrysophyllum cainito*, *Pithecellobium dulce* y *Psidium guajava*, los cuales inhiben el crecimiento de *Fusarium*, extractos foliares de *Crataegus mexicana*, *Iris spuria* y *Pithecellobium*

dulce redujeron el crecimiento de *Pestalotiospsis* en un 50%. Extracto de *Annona muricara, Iris spuria, Psidium guajava* y *Pithecellobium dulce* inhibieron la germinación de *Pestalotiospsis.* En el caso de *Rhizopus* se presentó una leve inhibición en el desarrollo de micelio a partir de los extractos de *Achras sapota, Annona. cherimola, Crataegus mexicana* y *Spondias purpurea*, sin embargo se inhibio la esporulación de *Rhizopus* a partir del uso de extractos de *Crataegus. mexicana, Citrus limón, Pithecellobium dulce* y *Pounteria sapota.*

La especificidad de los extractos hacia ciertos patógenos es muy interesante, además de que algunos de los extractos mencionados, presentan mayor actividad en cierta etapa de desarrollo de la planta. Por lo que aún es necesario seguir realizando investigaciones a partir de extractos de planta que presenten actividad antimicrobiana hacia patógenos de interés económico en la agricultura, ya que la mayoría de los extractos analizados son probados *in vitro* y solo pocos estudios se evalúa su efecto en el control de enfermedades postcosecha en el control de enfermedades.

Dado el evidente potencial de algunos extractos vegetales para inhibir el crecimiento de ciertos fitopatógenos, surge el interés en este trabajo de explorar el potencial de extractos de plantas de fresa para controlar el desarrollo del hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea.* Cabe destacar que el interés por elaborar los extractos a partir de plantas de fresa parte del que, en caso de poseer actividad antimicrobiana pudiera proponerse como materia prima para aprovechar las más de 60 mil plantas de fresa por hectárea que se desechan al final de cada temporada de zafra ya sea por quema utilizando agroquímicos y/o fuego; ya que es muy poca la cantidad de planta la que se reintegra al cultivo como abono orgánico. Resultando en una práctica adicional sustentable para este cultivo.

3. OBJETIVO

Determinar el efecto de extractos vegetales de plantas de fresa en el control de *Botrytis cinerea*.

3.1. Objetivos específicos.

- Determinar el método adecuado para la extracción de compuestos del área foliar de plantas de fresa
- Evaluar *in vitro* la inhibición de *Botrytis cinerea* mediante extractos vegetales de planta de fresa.
- Evaluar *in vivo* la inhibición de *Botrytis cinerea* mediante extractos vegetales de planta de fresa aplicados en frutos de fresa.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

El trabajo se realizó en el laboratorio de fitopatología del CIIDIR-IPN-Unidad Michoacán y en el laboratorio de fitobioquímica del departamento de Bioquímica y Biotecnología del CINVESTAV-IPN-Unidad Irapuato bajo la asesoría del Dr. Jorge Molina Torres.

4.1. Material vegetal

Se utilizaron plantas de fresa (*Fragaria* x *ananassa*, variedad Albión) cultivadas en el invernadero del CIIDIR-IPN Unidad Michoacán, las cuales se encontraban al final de su ciclo productivo

4.2. Obtención de extractos de hojas de planta de fresa

Se realizaron dos extracciones sólido-líquido con etanol al 90%. El primer extracto se obtuvo a partir de 3 g de muestra homogeneizada y 100mL de solvente (etanol al 90%); se realizó la extracción de 10 ciclos en cada uno de los seis espacios de la unidad de extracción E-816 Büchi siguiendo la técnica de Soxhlet. Al terminar los ciclos de extracción se concentraron por 15 min en un Rotavapor Büchi. Se obtuvo además un extracto etanólico de hojas de fresa el cual se extrajo a temperatura ambiente, en reposo y en oscuridad durante 36 h a partir de 18 g de muestra y 400mL de etanol al 90%.

4.3. Aislamiento de *Botrytis cinerea*

A partir de frutos que presentaron los síntomas de la enfermedad causada por *Botrytis cinerea* se tomaron dos porciones de aproximadamente 1 cm^3 del fruto y se colocaron en cajas Petri en medio papa dextrosa agar (PDA) previamente estéril. Posteriormente se tomaron esporas del hongo y se inocularon nuevamente en cajas Petri hasta obtener un cultivo puro de *B. cinerea*.

4.4. Ensayo de inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea*

Se aplicaron tres dosis diferentes de cada uno de los extractos: 125, 250 y 500 µL, mezclando con 45 mL de medio de cultivo PDA y se repartieron en tres cajas Petri. En el centro de cada caja se colocó un trozo de 0.6 cm de diámetro de medio PDA que contenía el hongo *Botrytis cinerea* y se dejó incubar a temperatura ambiente por aproximadamente 10 días, hasta que el patógeno cubriera en su totalidad la superficie de la caja. El mismo procedimiento se realizó para el tratamiento control en el cual se aplicó etanol en ausencia del extracto.

4.4.1. Determinación de biomasa seca de *Botrytis cinerea*

Después de 10 días de incubación, se determinó el peso seco de *Botrytis cinerea* ya que su crecimiento no fue radialmente uniforme. Para ello se cortaron círculos de papel filtro los cuales se pesaron. Posteriormente, se calentó el medio de cultivo con el hongo de cada una de las cajas de los diferentes tratamientos en un microondas a la máxima potencia por 30 s, el medio ya fundido se filtró sobre los papeles previamente preparados al vacío. El hongo sobre el papel filtro se secó por 24 h en

un horno a una temperatura de 100 °C, hasta obtener peso constante de cada una de las muestras. El porciento de inhibición se obtuvo a partir de la fórmula descrita por Bernal y col*., (*2005):

$$\% \text{ total de Inhibición} = [(Ca-Ta)/Ca]*100$$

Donde:

Ca= Peso seco en el testigo después del periodo de incubación; Ta= Peso seco en el tratamiento después del periodo de incubación.

4.5. Visualización de esporas

Se tomó una muestra de cada uno de los tratamientos en las diferentes concentraciones y se colocaron en un portaobjeto, se realizó una tinción con azul de tripano para visualizar a *Botrytis cinerea* en un microscopio (Thomas Scientific Motic B3a) 40X y 100X e identificar la presencia de esporas de cada muestra.

4.6. Evaluación de la actividad biocontroladora de extractos *in vivo*

Se evaluaron los extractos etanólicos de hojas de fresa elaborados con y sin alta temperatura. Se estableció un experimento con 10 frutos de fresa por unidad experimental y tres repeticiones por tratamiento, las cuales se colocaron en un recipiente cubierto de papel absorbente previamente estériles, a los frutos se les realizó una herida previa de 1 cm^2 en el centro del fruto con un bisturí previamente estéril y se asperjaron 10 mL de cada uno de los extractos, los cuales se dejaron actuar durante 10 min en los frutos. Después se asperjó una suspensión de esporas a una concentración de $2.0X10^5$ esporas mL^{-1}. Un grupo de frutos únicamente

inoculados con el patógeno fue usado como control. Todos los frutos fueron incubaron a 25°C. A las 24 h se inició la evaluación del índice de severidad usando una escala de severidad 5 niveles: 1.- Fruto sano, 2.- Fruto con 25 % de infección, 3.- Fruto con 50 % de infección, 4.- Fruto con 75% de infección y 5.-Fruto 100% infectado. La evaluación se realizó diariamente durante 7 días. El índice de severidad se realizó utilizando la fórmula descrita por Pérez y col., (1995):

$$\text{Índice de Severidad} = [Xi(1) + Xi(2) + Xi(3) + Xi(4) + Xi(5)]/ N$$

Donde:

Xi= número de frutos; (1, 2, 3, 4, 5)= niveles de severidad; N= número total de frutos.

4.7. Fraccionamiento de extractos vegetales de la planta de fresa

4.7.1. Cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos

Para la TLC se utilizaron placas de gel sílice, preparativas de 20x20 cm y 500 micrones de espesor donde se llevó a cabo la separación de los compuestos presentes en cada uno de los extractos etanólicos. Se tomaron 600µL de muestra de cada uno de los extractos vegetales los cuales fueron aplicados en la placa hasta saturar de muestra la línea base de aplicación y se dejaron correr por 2 h aproximadamente en una fase móvil de Cloroformo, acetona, metano y ácido fórmico en una proporción 66:16.5:10:8.5 a una temperatura de 4°C. Finalmente la placa se dejó secar en campana para evaporar la mezcla de solventes.

4.7.2. Detección de compuestos flavonoides de extractos vegetales de fresa

La detección de las fracciones de cada una de los extractos se hizo con el reactivo de Productos Naturales para detección de flavonoides (Wagner y Bald, 2001). Para su preparación se utilizó 10mL de difenilboriloxyetilamina al 1% en metanol y 8mL de polietilenglicol 600 al 5% en etanol. Para observar los compuestos se utilizó una lámpara de luz UV a 365nm. La presencia de flavonoides muestra una fluorescencia que puede ir de amarillo-verde al azul dependiendo del tipo de estructura de los flavonoides.

4.7.3. Purificación de fracciones

Las placas de TLC reveladas se observaron en oscuridad y luz UV a 365nm las fracciones obtenidas fueron marcadas, para poder retirar el sílice contenido en cada una de ellas de la placa. Cada una de las fracciones obtenidas se colocaron en tubos Eppendorf y se les agregó etanol para eluírlas del gel de sílice. Posteriormente se centrifugaron por 5 min a 1400 rpm. Finalmente se separó el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf.

4.8. Evaluación de la actividad biocontroladora de fracciones de extractos vegetales de planta de fresa *vs Botrytis cinerea in vitro*

De cada una de las fracciones purificadas de los extractos vegetales de planta de fresa, se tomaron 500 µL, realizando la misma metodología para el ensayo *in vitro* se evaluó el crecimiento de *B. cinerea* hasta que el control cubriera en su totalidad la superficie de la caja. Así mismo se realizó el mismo procedimiento para el control en el cual se aplicó etanol.

5. RESULTADOS

5.1. Ensayo *in vitro. Botrytis cinerea vs* extractos vegetales

En los tratamientos en donde se aplicó el extracto vegetal de fresa sin alta temperatura (EFES), la producción de biomasa micelial presentó una disminución de 17.98% en el tratamiento con la dosis 125 µL, en comparación con los tratamientos de 250 µL y 500 µL, promovieron el incremento de la biomasa micelial, en comparación ($p \leq 0.05$) con el tratamiento control, con solo *Botrytis cinerea*. De igual manera, al aplicar el extracto etanólico de planta de fresa con alta temperatura (EFEC), las tres dosis del tratamiento presentaron una mayor producción de biomasa micelial, con respecto al control (Figura 4.)

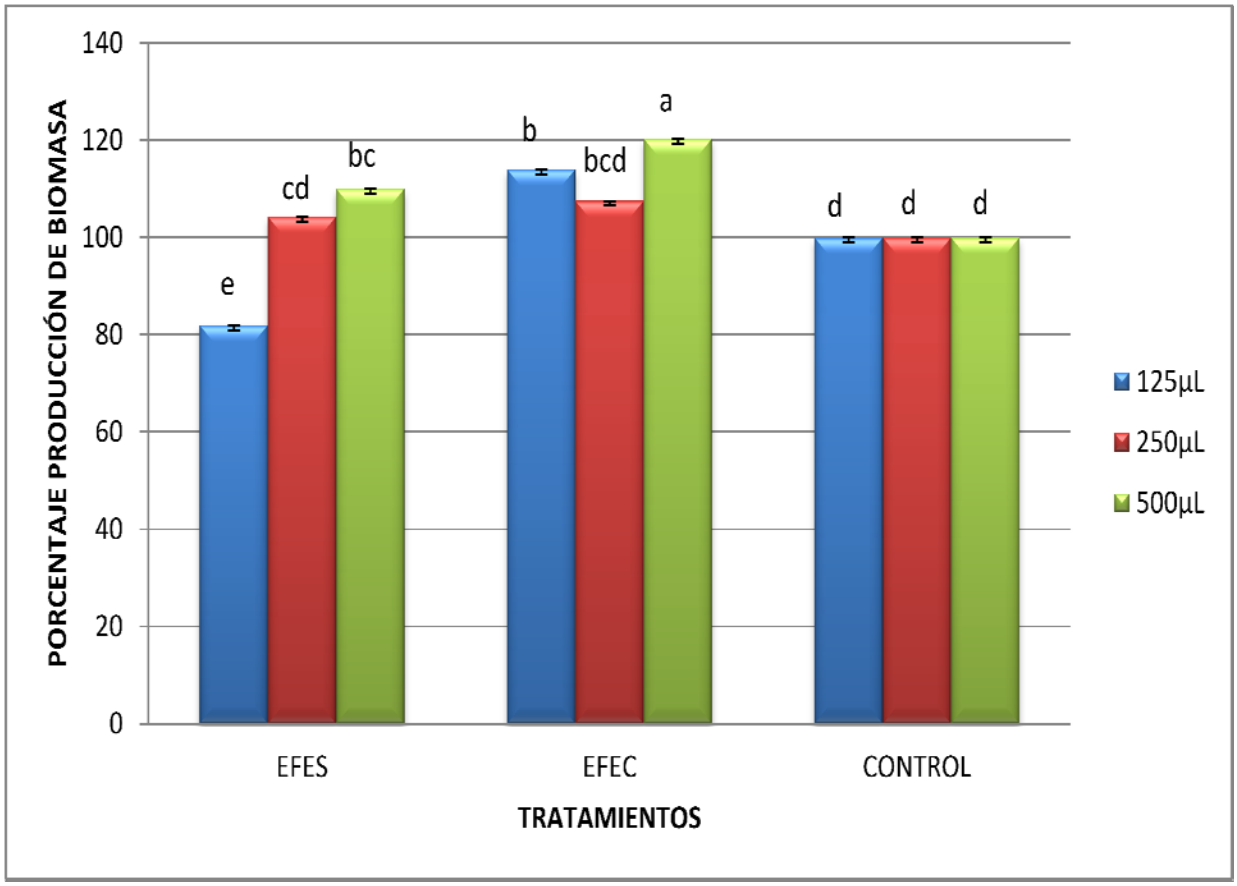

Figura 4. Porcentaje de producción de biomasa en base al peso seco de *B. cinerea in vitro* a partir de su desarrollo con la aplicación de los extractos etanólicos de planta de fresa EFEC y EFES en diferentes volúmenes. ANOVA (p=0.05), (n=3) y comparación de medias de Tukey (letras iguales no presentan diferencias significativas)

.

La Tabla 2 muestra el efecto de los extractos vegetales EFES y EFEC a distintas concentraciones sobre la esporulación de *B. cinerea.* El extracto EFES, favoreció la inhibición de la esporulación del patógeno en dos de las dosis probadas 125 y 250 µL y solo el EFEC presentó la inhibición solo en la dosis más elevada de 500 µL.

Tabla 2. Inhibición de esporulación de *B. cinerea* en extractos vegetales de planta de fresa		
Tratamiento	**Concentración (µL)**	**Esporulación**
EFEC	125	(+)
EFEC	250	(+)
EFEC	500	(-)
EFES	125	(-)
EFES	250	(-)
EFES	500	(+)
		Esporulación negativa = (-) **Esporulación positiva = (+)**

5.2. Evaluación de la actividad biocontroladora de extractos *in vivo*

La Figura 5 muestra el efecto de cada uno de los extractos etanólicos de la planta de fresa sobre el crecimiento de *B. cinerea* en frutos de fresa. Como es evidente, resultó más efectivo el EFEC al reducir de manera significativa (73.8%) el crecimiento micelial con respecto al control ($p \leq 0.05$). En cuanto a la severidad de la infección, el extracto EFES presentó un índice de severidad de 1.7, el extracto EFEC de 1.3, ambos significativamente menores ($p \leq 0.05$) al control presentó un índice de severidad promedio de 5 que corresponde al mayor daño ocasionado en frutos.

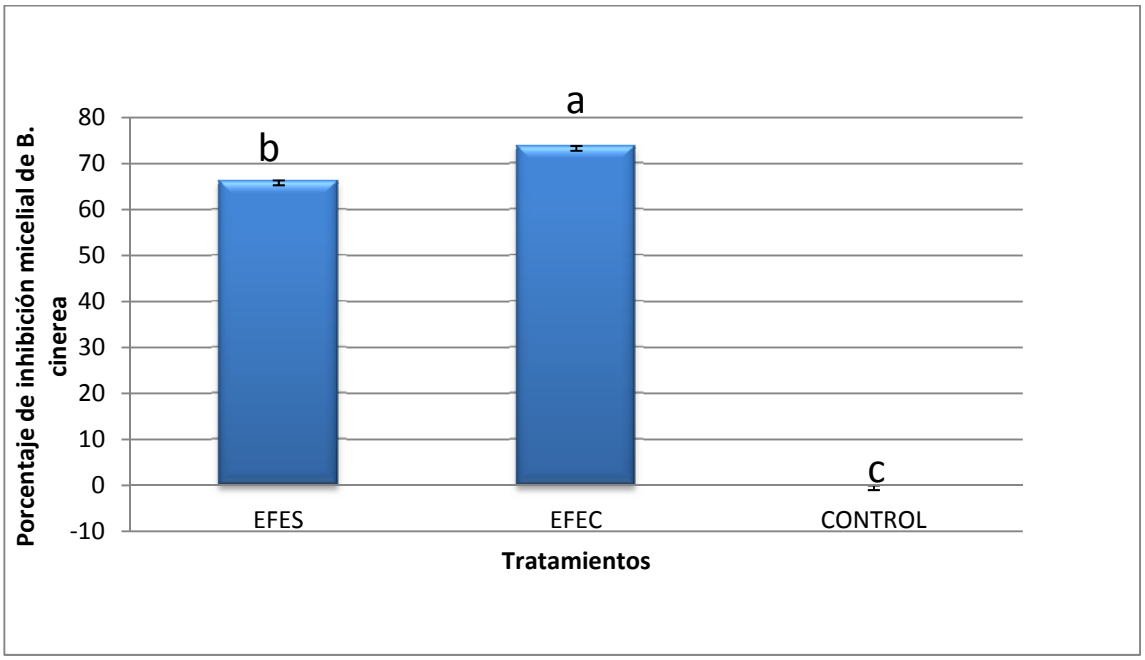

Figura 5. Efecto de extractos vegetales de fresa: EFES y EFEC sobre la inhibición de *B. cinerea* en frutos de fresa. A una (p=0.05), (n=3) y comparación de medias de Tukey (letras iguales no presentan diferencias significativas).

5.3. Fraccionamiento de extractos etanólicos de planta de fresa y detección de compuestos flavonoides

Al realizar la cromatografía en capa fina, se obtuvieron 7 fracciones para ambos extractos, las cuales presentaron los siguientes índices de retención R_F así como la fluorescencia para cada fracción la cual se presenta por el tipo de estructuras de cada compuesto (Tabla 3).

Tabla 3. Índices de retención (R_F) de los extractos etanólicos de planta de fresa

Fracción	Tratamiento		Color de fluorescencia de cada banda
	EFES	EFEC	
	R_F	R_F	
1	1.00	1.00	Amarillo
2	0.96	0.95	Azul
3	0.93	0.93	Amarillo
4	0.85	0.89	Verde
5	0.63	0.74	Amarillo
6	0.20	0.34	Azul
7	0.15	0.24	-

5.4. Evaluación de la actividad biocontroladora de fracciones de extractos vegetales de planta de fresa *vs Botrytis cinerea in vitro*

En cuanto al porcentaje de inhibición de *B. cinerea* (Figura 6), las fracciones que mostraron una mayor inhibición del desarrollo del hongo fueron: 5, 4 y 6 del extracto EFEC con un promedio de inhibición radial de 22.8, 36.9 y 38.9% respectivamente. En cuanto al extracto EFES el mayor porcentaje de inhibición (32.8%) se presentó en la fracción 6, con respecto al control seguido de las fracciones 2 y 5 con un porcentaje de inhibición radial de 22.1 y 20.8% respectivamente ($p \leq 0.05$).

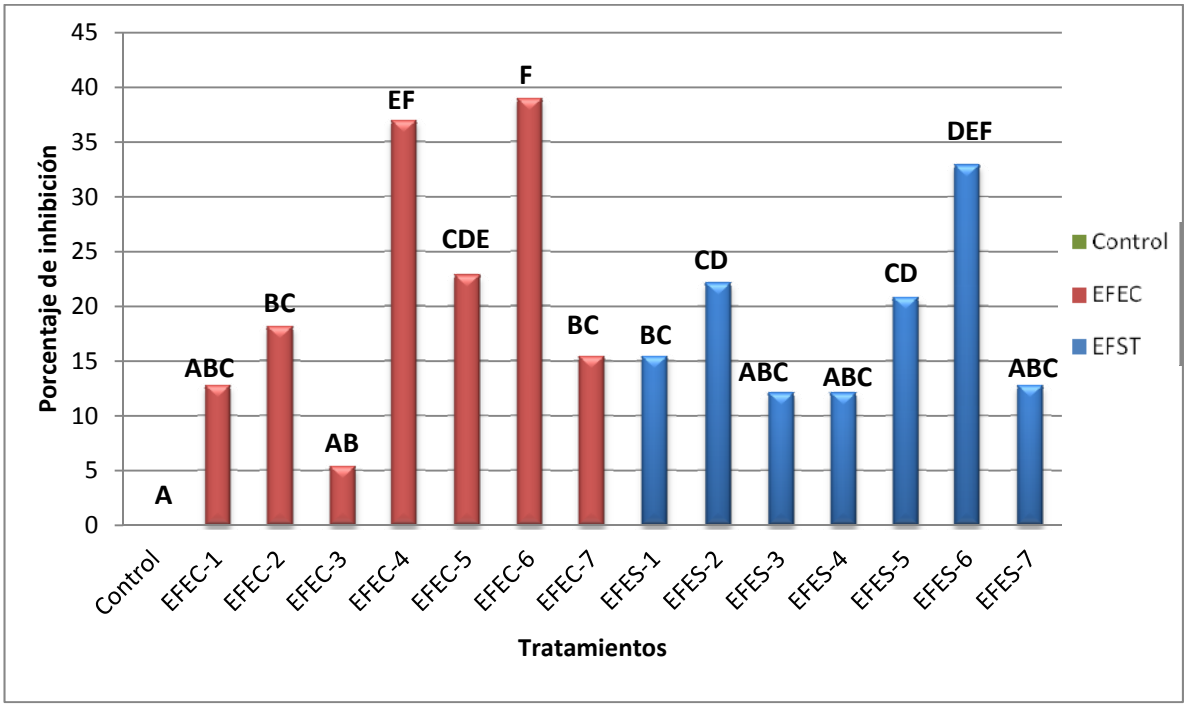

Figura 6. Efecto de las fracciones de los extracto etanólicos de planta de fresa EFEC y EFES sobre el crecimiento radial de *B. cinerea.* A una (p=0.05), (n=3) y comparación de medias de Tukey (letras iguales no presentan diferencias significativas).

6. DISCUSIÓN DE RESULTADOS

De acuerdo con los resultados obtenidos, la inhibición de *B. cinerea* se presentó en el ensayo *in vitro* en el extracto obtenido a temperatura ambiente (EFES) al aplicar un volumen del extracto de 125 µL con una inhibición del 15.24 % en la reducción de producción de biomasa en base a su peso seco; en cuanto a las concentraciones de 250 µL y 500 µL se presentó un incremento en la producción de biomasa al igual que con el extracto obtenido con alta temperatura (EFEC) en las tres concentraciones evaluadas. Sin embargo, ambos extractos presentaron una inhibición en la formación de esporas del hongo, el EFES se presentó la inhibición en las concentraciones de 125 y 250 µL y en el EFEC la inhibición se presentó en la más alta concentración 500 µL. Por lo que se necesita una mayor cantidad de extracto EFEC para obtener la inhibición de esporas.

Los resultados obtenidos con el extracto EFES, concuerdan con los observados en diversas investigaciones en donde se ha probado la actividad antifúngica de diversos extractos tales como extractos de ajo (*Allium sativum* L.), acuyo (*Piper auritum* HBK.), guayaba (*Psidium guajava* L.) y eucalipto blanco (*Eucalyptus globulus* Labill.), reportan que estos inhibieron el crecimiento micelial de *Colletotricum gloeosporioides* en 54.3, 48.8, 47.7 y 39% respectivamente. Así como extractos de guamúchil (*Pithecellobium dulce*) redujeron el desarrollo de *Alternaria* spp., *Fusarium* spp., *Pestalotia* spp. y *Rhizopus* spp. En el caso de *Botrytis cinerea* la inhibición se presentó entre un 50 y 78% *in vitro*, (Hernández y col., 2007b). Sin embargo, también se ha reportado que algunos otros extractos resultan ser inhibitorios para un hongo y estimuladores para otros como sucede con *Pithecellobium dulce* L. que inhibe a *Uromyces. appendiculatus* pero estimula la germinación de esporas de *Aspergillus flavus;* otro caso se presenta con extractos de *Amphipterygium adstringens* que inhibe a *Fusarium moniliforme* pero estimula a

Aspergillus flavus (Montes y col. 2000), tal y como fue observado en los EFEC de este trabajo en particular.

La importancia de la actividad de los extractos radica en su capacidad para inhibir el crecimiento del patógeno (Wilson y col*.,* 1997; Domingo y López, 2003; Kliebenstein y col., 2005; Harish y col., 2007; Chérif y col., 2007; Hernández y col., 2007b; Mazid y col., 2011; Jaso de Rodríguez y col., 2011), sin embargo no todos presentan dicha capacidad para un amplio espectro de patógenos, tal como en la evaluación de Stauffer y col. (2000) quienes evaluaron 98 extractos vegetales diferentes, de los cuales solo el 10% presentó actividad antimicrobiana contra hongos (*Colletotrichum* sp., *Penicillium italicum, Aspergillus flavus, Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani, Alternaria* sp., y *Pythium* sp.) y bacterias (*Xanthomonas campestri*), haciendo énfasis solo en aquellos extractos que presentaron la inhibición; de la misma manera, Arciniegas y col*.* (2002) realizaron una evaluación de 20 extractos etanólicos crudos de diferentes partes de la planta pertenecientes a trece familias, de las cuales solo ocho especies mostraron actividad antifúngica hacia *Mycosphaerella fijiensis in vitro*. En este mismo sentido Montes y col. (2000) realizaron una revisión de 12 años de investigación sobre las propiedades antifúngicas de las plantas de 206 especies contra 26 especies de hongos fitopatógenos, de los cuales solo entre el 32 y 51% de las plantas presentó un efecto contra los hongos y la respuesta de los patógenos varío desde la estimulación biológica hasta su total inhibición. Por otro lado Mendoza y col. (2007), evaluaron 97 extractos vegetales obtenidos de 37 especies vegetales los cuales ningún extracto presentó inhibición de los patógenos *Phytophthota palmivora* y *Colletotrichum gloeosporioides*, hecho que atribuyeron a que las propiedades que poseen los metabolitos secundarios de las plantas, puede variar de acuerdo a su entorno, por lo que destacaron la necesidad de evaluar la mayor cantidad de extractos posibles para una amplia gama de organismos. En cambio Bautista y col. (2002a) evaluaron 20 especies de plantas contra hongos patógenos de los cuales los extractos de *Achras sapota, Pouteria sapota* y *Psidium guajava* disminuyeron la producción de biomasa micelial en base al peso seco de *Alternaria* spp., mientras que los extractos de *Phitecellobium dulce, Persea americana* y *Annona cherimola* estimularon su

producción. En el caso de *Fusarium* spp., los extractos de *Crysophyllum cainito, Phitecellobium dulce, Psidium guajava* e *Inga spuria* inhibieron la producción de biomasa micelial y el extracto de *Achras sapota* promovieron su producción.

Por otro lado, el efecto promotor del crecimiento de *B. cinerea* de los extractos probados a las distintas dosis, podría deberse a la presencia de ciertos compuestos originados del metabolismo secundario los cuales pueden llegar a estimular el crecimiento de hongo y otros a inhibir incluso su crecimiento (Montes, 2009). El comportamiento de promoción del desarrollo observado en el caso de este trabajo en *Botrytis* cinerea fue observado y reportado también por Rangel y col. (2001), pero en bacterias, al evaluar extractos de *Baccharis nitida* sobre el crecimiento de *Enterococcus feacalis, Escherichia coli, Pseudomonas aeruginosa* y la levadura *Candida albicans*. La respuesta estimulatoria también se ha observado en extractos acuosos de *Asclepias glauscence* H.B.K., *Citrus limón* L., *Hibiscus rosa.sinensis* L. y *Ricinus comunis* L., se observó un incremento mayor de germinación de *Alternaria. solani,* en el caso de *Penicillium* se vio estimulado por extractos de *Euphorbia* spp., *Bacharis salicifolia* H.N.K., *Schinus molle* L., *Buoganvillea spectabilis¸ Allium cepa* L., y *Citrus limón* (Montes y col. 2000). Entre los compuestos capaces de inhibir el desarrollo de enfermedades en las plantas se encuentran las fitohormonas como las auxinas y giberelinas las cuales son capaces de reducir la tasa de crecimiento micelial *in vitro* y la gravedad de la enfermedad de *B. cinerea* en plantas de tomate. En tratamiento con giberelinas reduce la pudrición del tallo causado por *B. cinerea* en vid y en plantas de tomate, frijol y en rosas. Por su parte, el ácido abscísico puede estimular la enfermedad. En el caso de *B. cinerea* se ha sugerido que el ácido abscísico es participe en la patogénesis y representa un factor de virulencia para el desarrollo de la enfermedad. En el mismo tenor se ha comprobado que el etileno juega un papel importante en la germinación de conidios de *B. cinerea* en manzanas maduras, así como estimular el crecimiento del micelio, producción de biomasa *in vitro* como *in vivo* en fresas (Amir y col*.,* 2007). Cabe señalar que pese al gran número de investigaciones que se realizan sobre el efecto de los extractos vegetales en el desarrollo de las enfermedades, son muy pocos aquellos que mencionan la posible causa de esta estimulación.

En cuanto al efecto inhibitorio de la formación de esporas de *B. cinerea*, en diferentes dosis (Tabla 2) por los extractos EFES y el EFEC, este efecto se ha reportado para el uso de extractos crudos de *Allium* y *Capsicum* los cuales afectaron la germinación de esporas de *B. cinerea* mientras que los extractos de nogal negro (*Juglans nigra* L.), liquidámbar (*Liquidambar styraciflua* L.*)*, *Matricaria* spp., durazno (*Prunus persica* L.), peral (*Pyrus communis* L.) y tejo inglés (*Taxus canadensis* Marsh.) inhibieron su germinación entre 90 y 99% (Wilson y col*.,* 1997). Así mismo extractos de *Flourencia cernua* afectaron la producción de conidios *in vitro* en *Penicillium digitatum* (Guerrero y col. 2007). Al igual que los extractos de planta de fresa, 19 extractos evaluados por Bautista y col*.* (2000b) inhibieron esporulación y germinación de esporas de *Rhizopus stolonifer* más que el desarrollo del micelio, de manera similar este efecto se reporto por Bautista y col. (2002a) por diferentes extractos contra *Pestalotiopsis* spp. Se ha reportado la capacidad de algunos metabolitos secundarios para inhibir la germinación de esporas de *B. cinerea*; tal es el caso de los compuestos fenólicos, como flavonoides y proantocianidinas del aloe vera y el resveratrol de hojas de uva, los cuales inhiben la germinación de *B. cinerea* en un 95 y 50% respectivamente (Domingo y López, 2003; Van Baarlen y col*.,* 2007). Así como la uvangoletina y chrysina de extractos etanólicos de *Piper Septuplinevium* presentaron actividad fungicida contra *Fusarium oxysporum* y *Botrytis cinerea* (Ávila y col., 2011) y el kaempferol es propuesto como el responsable del efecto antifúngico contra *B. cinerea* en extractos de guamúchil (Hernández y col., 2007b)*.* Sin embargo, no se han desarrollado productos para tratamientos posteriores a la cosecha, puesto que a la industria les resulta más fácil patentar y proteger compuestos recién sintetizados que los productos naturales de las plantas (Wilson y col., 1997), además algunos extractos de plantas a pesar de presentar inhibición contra hongos no se recomienda su utilización ya que desprenden mal olor tal como extractos de *Capsicum frutescens* inhibieron la pudrición causadas por *Penicillium expansum* en manzana (Hernández y col. 2007b; Bautista y col., 2004).

En cuanto a la evaluación *in vivo*, los extractos etanólicos EFEC y EFES de hojas de fresa (Figura 5) presentaron una significativa actividad antifúngica en frutos de fresa, presentando un índice de severidad (IS) de 1.3 y 1.7 obteniendo así un

porcentaje de inhibición de 74 y 66% respectivamente disminuyendo la incidencia de la enfermedad. Resultados similares fueron reportados en un estudio realizado *in vivo* en frutos de papaya, donde se observó que extractos de hojas de papaya, inhibieron completamente las pudriciones del fruto de la misma (Hernández y col. 2007); otros estudios muestran que extractos de ajo y eucalipto estimulan la enfermedad, presentando un índice de severidad de 4.2 y 4.5 causado por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de papaya en una escala de 5 niveles (Baños y col*.,* 2004). Por su parte, López y col. (2006) reportaron que extractos etanólicos vegetales de *Plantago major, Lippia alba, Pteridium aquilinum* y *Ruta graveolens in vitro* e *in vivo* en frutos de fresa para el control de *B. cinerea*, presentaron resultados alentadores *in vitro* al disminuir el crecimiento micelial e inhibición de esporas en los cuatro extractos, sin embargo, en la prueba en fruto, estos presentaron un índice de severidad de 4.06, 4.93, 4.20 y 4.73 en una escala de 5 niveles respectivamente lo que representa una mayor incidencia de la enfermedad en frutos en comparación con los extractos de planta de fresa, así mismo estos extractos se evaluaron en frutos de plátano mostrando resultados similares salvo que el extracto de *P. aquilinum* presentó la menor incidencia de la enfermedad con un índice de severidad de 1.94 en el control de *Colletotrichum musae*.

Cabe mencionar el efecto observado en el extracto EFEC al no presentar actividad inhibitoria *in vitro*¸ esto podría deberse al un cambio de estructuras de los metabolitos secundarios al estar en contacto con alta temperatura; por ejemplo Irianda (2010), menciona que los extractos obtenidos con alta temperatura, presenta mayor cantidad de compuestos fenólicos que aquellos obtenidos a temperatura ambiente en extractos etanólicos de orégano sin embargo, estos no muestran actividad antimicrobiana. Esto puede deberse a que los compuestos fenólicos en su mayoría se encuentran glicosilados y el enlace glicosídico es inestable a cambios de pH y temperatura ya que es muy débil y solo se necesita de 26 kcal/mol para romper su enlace (Badui, 1995). Sin embargo el mismo extracto EFEC fue el que presentó mayor actividad inhibitoria del hongo *B. cinerea* lo que supone que puede existir un reestructuracción al estar en contacto con polisacáridos, esto porque se ha comprobado en el caso de polifenoles glicosilados de las hojas de olivo como la

oleuropeína, la barbaloína o el verbascósido modifican las propiedades físicas de las membranas biológicas interaccionando directamente con los fosfolípidos que se encuentran cargados negativamente de la membrana estableciendo puentes de hidrógeno; cambiando el comportamiento de las membranas, dado que los fosfolípidos son abundantes en membranas bacterianas, este efecto podría contribuir de forma significativa a la capacidad antimicrobiana de estos compuestos, así como otros aspectos de su actividad biológica en los que estén involucrados fosfolípidos con carga negativa (Molina, 2010), aunque no puede establecerse una correlación exacta de estructura-actividad (Lizarraga y Abdala, 2004), y que otros factores pueden estar en relación con dicha actividad inhibitoria como: la presencia de otro compuesto con el cual presente sinergismo.

En cuanto al fraccionamiento de los extractos y su evaluación *in vitro* nos permitió conocer que el crecimiento radial de los extractos fraccionados se vio afectado por las fracciones 4, 5 y 6 del extracto EFEC y las fracciones 2, 5 y 6 del EFES (Figura 6), logrando una reducción del 22-40%, es así que la separación de los compuestos presentan mayor actividad de inhibición en cuanto al crecimiento micelial radial y de acuerdo al crecimiento radial, tomando en cuenta que el porcentaje de inhibición mayor al 20% es positivo para evidenciar la inhibición del crecimiento de hongos según Márquez y col. (2007). Este efecto puede deberse a compuestos de tipo flavonoides del grupo de fenilpropanoides los cuales se han reportado con mayor actividad antimicrobiana (López y col., 2006; Montes, 2009; Kumar y McConchie 2010; Hernández y col., 2007b; Cushnie y Lamb, 2005; Alvarez y col., 2007; Celis y col., 2008; Ávila y col., 2011; Sepúlveda y col., 2003; Friedman, 2007; Domingo y López, 2003), además son los compuestos que en su mayoría se encuentran en los extractos de planta de fresa, lo anterior basándose en la técnica de detección de compuestos reportada por Wagner y Bladt (2001) con la utilización de productos naturales para la detección de flavonoides se presenta la fluorescencia característica para estos compuestos tales como una fluorescencia de naranja-amarilla, amarilla-verde compuestos de tipo flavonoles y naranja, amarillo-verde de tipo de las flavonas. Además cabe señalar que en conjunto las fracciones del EFES tienen mayor efecto antimicrobiano que por separado al reducir la producción de biomasa

en base al peso seco de *B. cinerea*, esto puede deberse al sinergismo que presentan los compuestos fenólicos de tipo flavonoides reportado por (Cushnie y Lamb, 2005; Ortega y col., 2011; Cushnie y Lamb, 2011). Por lo tanto en el caso de los extractos EFEC y EFES completos y fraccionados cada uno tiene sus ventajas y desventajas principalmente los extractos completos, reducen la producción de biomasa en EFES sin embargo EFES y EFEC inhiben la germinación de esporas, y las fracciones promueven la producción de biomasa sin embargo reducen el crecimiento del micelio.

Los resultados obtenidos en este trabajo son alentadores pues permiten vislumbrar la posible utilidad de las plantas de fresa que son desechadas para elaborar extractos con potencial biocontrolador, en este caso de *B. cinerea.*

7. CONCLUSIONES

Los extractos de fresa presentaron potencial para ser utilizados en el control de *B. cinerea* en postcosecha, al reducir aproximadamente un 40% la producción de biomasa *in vitro*, además inhibieron la formación de esporas del hongo, una parte importante del ciclo de vida e infección del hongo, así como reducir la enfermedad en frutos de fresa postcosecha. Sin embargo, aun faltan estudios que realizar para conocer qué compuesto o compuestos son responsables de la actividad antifúngica y la forma en que actúan estos con el fruto para presentar una mayor actividad.

El extracto con mayor potencial de inhibición del hongo *in vivo* fue el extracto obtenido con la aplicación de temperatura (EFEC).

8. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Amir, S; Elad, Y; Barakat, R. y Tudzynski, P. (2007). Phytohormones in *Botrytis*-plant interactions, In: Elad, Y; Williamson, B; Tudzynski, P. y Delen, N. *Botrytis*: *Biology, pathology and control*, pp 163- 179, Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Altieri, M. (2001). Biotecnología agrícola: Mitos, riesgos ambientales y alternativas. Ed. Foundation for deep ecology and Fred Gellert Family Foudation. San Francisco California, pp: 1-41.

Alvarez, A; Debattista, N. y Pappano, N. (2007). Antimicrobial activity and synergism of some substituted flavonoides. Folia Microbiologica, vol. 53(1):23-28.

Arciniegas, A; Riveros, A. y Loaiza, J. (2002). Efecto de extractos vegetales sobre el desarrollo in-vitro de *Mycosphaerella fijensis*, agente causal de la Sigatoka negra en Musáceas. En: Memorias XV Reunión de la Asociación de Bananeros "AUGURA", pp. 593-595. Cartagena.

Ávila, M; Patiño, O; Prieto, J; Delgado, W. y Cuca, L. (2011). Flavonoides con actividad antifúngica aislados de *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). *Revista Colombiana de química*, vol. 40(1):25-33.

Badii, M; Landeros, J. y Cerna, E. (2007). Papel de los ecosistemas en la sustentabilidad. Cultura Científica y Tecnológica de la Universidad Autónoma de Ciudad Juárez-Ecologia, vol. 4(21):19-28.

Badui, J. (1995). Quimica de alimentos. 3ª edición, 2ª reimpresión. p. 62-65. Editorial Alambra Mexicana S.A: de C.V. México

Baños, P; Zavaleta, E; Colinas, M; Luna, I. y Gutiérrez J. (2004) Control biológico de *Colletrotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. Y Sacc.] en papaya maradol roja

(*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 22(002):198-205.

Barcenas, C. (2005). Química y ecotoxicología de los fungicidas, En: Vázquez, A; Rendon, J; Gold-Bouchot, G. y Agraz-Hernández, C. *Golfo de México: Contaminación e impacto ambiental: diagnostico y tendencias*, pp 191-198, Ed. Universidad Autónoma de Campeche, Centro de Ecología, Pesquerías y Oceanografía del Golfo de México, segunda edición.

Bautista, S; Hernández, M. y Barrera, L. (2000a). Antifungal screening of plants of the state of Morelos, Mexico against four fungal postharvest pathogens of fruits and vegetables. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 18(001):36-41.

Bautista, S; Hernández, M; Díaz, J. y Cano, F. (2000b). Evaluation of the fungicidal properties of plant extracts to reduce *Rhizopus stolonifer* of ciruela fruit (*Spondias purpurea* L.) during storage. *Postharvest biology technology*, vol. 20:99-106.

Bautista, S; De Lucca, A. y Wilson, C. (2004). Evaluatión of the antigungal activity of natural compounds to reduce postharvest blue mould (*Penicillium expansum* Link.) of apples (*Malus domestica* Borkh.) during storage. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 22(003)362-369.

Bernal, A; Zamora, J; Virgen, G. y Nuño, R. (2005). Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Lupinus* spp. sobre hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 23(002):140-146.

Camarena, G. y De la Torre, R. (2007). Resistencia sistémica adquirida en plantas: estado actual. *Revista Chapingo serie ciencias forestales y del medio ambiente*, vol. 13(002):157-162.

Cedeño, L. y Carrero, C. (1997). Antracnosis causada por *Colletotrichum acutatum* en frutos de fresa en Mérida, Venezuela. *Revista Interciencia*, vol. 22(6) 315-319.

Celis, A; Mendoza, C; Pachón, M; Cardona, J; Delgado, W. y Cuca, L. (2008). Extractos vegetales utilizados como biocontroladores con énfasis en la familia Piperaceae. Una revisión. *Agronomía Colombiana*, vol. 26(1):97-106.

Chaves, N. y Wang, A. (2004). Combate al moho gris (*Botrytis cinerea*) de la fresa mediante *Gliocladium roseum*. *Agronomía Costarricense*, vol. 28(2):73-85.

Chérif, M; Arfaoui, A. y Rhaiem, A. (2007). Phenolic compounds and their role in bio-control and resistence of chickpea to fungal pathogenic attacks. *Tunisian Journal of Plant Protection*, vol. 2(1):7-21.

Croteau, R; Kutchan, T. y Lewis, N. (2000). Natural Products (Secondary metabolites). En Buchanan, W; Gruissem, W. y Jones, R. *Biochemistry & molecular biology of plants*. Ed. American Society of plant physiologists, 1250-1318pp.

Cushnie, T. y Lamb, A. (2005). Antimicrobial activity of flavonoides. *International journal Antimicrobial agents*, vol. 26:343-356.

Cushnie, T. y Lamb, A. (2011). Recent advances in understanding the antibacterial properties of flavonoides. *International journal Antimicrobial agents*, vol. 38(2):99-107.

DeBach, P. (1997). Lucha biológica contra los enemigos de las plantas. Ed. Mundi-Prensa, Madrid, 399pp.

Domingo, D. y López, M. (2003). Plantas con acción antimicrobiana. Revista Española de Quimioterapia, vol. 16(4):385-389.

Espinosa, M. (2006). Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea.* Tesis Doctoral Universidad de Cadíz.

Fiallos, H. (2012). Inhibición de *Botrytis cinerea* en rosas a base de extractos alcohólicos y acuosos de hierba mora (*Solanum nigrum*). Tesis pregrado. http://hdl.handle.net/123456789/1828

Friedman, M. (2007). Overview of antibacterial, antitoxin, antiviral, and antifungal activities of tea flavonoides and teas. *Molecular Nutrition and Food Research*, vol. 51(1):116-134.

García, A. y Pérez, E. (2009). Metabolismo secundario de plantas. *Reduca. serie fisiología vegetal*, vol. 2(3):119-145.

García, D. (2004). Metabolitos secundarios de las especies vegetales. *Pastos y forrajes*, vol. 27(1): 1-12.

García, E. y Lozoya, E. (2004). Genes de resistencia a enfermedades en plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 22(003): 414-422.

García, J. (1998). Intoxicaciones agudas con plaguicidas: costos humanos y económicos. *Revista Panamericana de Salud Pública*, vol. 4(6):383-387.

Ghorbani, R; Wilcockson, S; Koocheki, A. y Leifert, C. (2008). Soil management for sustainable crop disease control: a review. *Journal Environmental Chemistry Letters*, vol. 6:149-162.

Giovinazzo, G; Ingrosso, I; Paradiso, A; De Gara, L. y Santino, A. (2012). Resveratrol biosynthesis: plant metabolic engineering for nutritional improvement of food. Original paper. *Journal Plant Foods for Human Nutrition*, 1-9pp.

Guédez, C; Castillo, C; Cañizales, L. y Olivar, R. (2008). Control biológico: una herramienta para el desarrollo sustentable y sostenible. *Revista Control Biológico*, vol. 7(13):50-74.

Guerrero, E; Solis, S; Hernández, F; Flores, A; Sandoval, V. y Jasso, D. (2007). Actividad biológica *in vitro* de extractos de *Flourensia cernua* D. C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.:Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides. Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 25(001):48-53

Hanhineva, K. (2008). Metabolic engineering of phenolic biosynthesis pathway and metabolite profiling of strawberry (*Fragaria* × *ananassa*). Kuopio University Publications C. Natural and Environmental Sciences 231:89 p.

Harish, S; Saravana, kumar, D; Radjacommare, R; Ebenezar, E. y Seetharaman, K. (2008). Use of plant extact and biocontrol agents for the management of brown spot disease in rice. *Revista Biocontrol*, vol. 53:555-567.

Hernández, A; Bautista, S; Velázquez, M. y Hernández, A. (2007a). Uso de microorganismos antagonistas en el control de enfermedades postcosecha en frutos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 25(001):66-74.

Hernández A, Bautista S y Velázquez M. (2007b) Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Revista de Fitotecnia Mexicana*, vol. 30(2):119-123.

Hernández, D; Garza, M. y Guzmán, E. (2011). Competitividad de la fresa mexicana de exportación a EE.UU: Un modelo de equilibrio parcial. Revista de *Globalización, competitividad y gobernabilidad*, vol. 5(3)102-114.

Hernández, A. y Hansen, A. (2011). Uso de plaguicidas en dos zonas agrícolas de México y evaluación de la contaminación de agua y sedimentos. Revista Internacional de Contaminación Ambiental, vol. 27(2): 115-127.

Herrero, V. (2000). Alteración de rutas metabólicas y promoción de defensas endógenas en *Lycopericum esculentum* Mill. Y *Capsicum annum* L. inducidas por la aplicación de nuevos reguladores de crecimiento. Tesis de grado de Doctor en Ciencias Químicas de la Universidad Jaume.

Holz, G; Coertze, S. y Williamson, B. (2007). The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. *In* Elad. Y; Williamson, B; Tudzynski, P. y Denle, N. *Botrytis:*biology, pathology and control. Springer, USA, pp:9-27

INFOAGRO-2012. Cultivo de fresa. Disponible en:
http://www.infoagro.com/frutas/fresas_invernaderos.htm

Irianda, P. (2010). Capacidad antimicrobiana y antioxidante de extractos de orégano obtenidos mediante fluidos supercríticos. Tesis de grado, Universidad Politécnica de Valéncia. España. Disponible en: http://hdl.handle.net/10251/13703

Jasso de Rodríguez, D; Rodríguez, R; Hernández, F; Aguilar, C; Sáenz, A; Villarreal J. and Moreno L. (2011). In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan Desert plants against postharvest fruit fungi. Journal Industrial Crops and Products, vol. 34:960– 966

Kliebenstein, D; Rowe, H. y Denby, K. (2005) Secondary metabolites influence *Arabidopsis*/*Botrytis* interactions: variation in host production and pathogen sensitivity. *The Plant Journal* vol. 44:25-36.

King, B; Waxman, K; Nenni, N; Walker, L; Bergstrom, G. y Gibson, D. (2011). Arsenal of plant cell wall degrading enzymes reflects host preference among plant pathogenic fungi. *Biotechnology for biofuels journal*, vol. 4(1):1-14.

Kumar, V. y McConchie, R. (2010). Involvement of antifungal compounds from rockmelon fruit rind (*Cucumis melo* L.) in resistance against the fruit rot pathogen *Fusarium oxysporum* f. sp. *Melonis*. *European Journal Plant Pathology*, Vol. 126:531-540.

Lauwerys, R. (2004). Control biológico. Herramientas y enfoques. Enciclopedia de salud y seguridad en el trabajo. www.insht.es/InshtWeb/Contenidos/.../tomo1/27.pdf

Lizarraga, E. y Abdala, L. (2004). Compuestos fenólicos mayoritarios en *Satureja boliviana* (Benth.) Briq. (Lamiaceae). *Acta Farmaceutica Bonaerense*, vol. 23(2):198-200.

López, A; Vélez, M; Sánchez, M; Bonilla, C. y Gallo, P. (2006). Evaluación de extractos vegetales para el manejo de hongos patógenos en banano y fresa almacenados. *Acta agronómica*, vol. 55(4):39-44.

Madriz, K. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. *Revista Manejo Integrado de Plagas*, vol. 63:22-32.

Maestro, R. León, R. y Ruíz, V. (1993). Los compuestos fenólicos en la autodefensa de los vegetales. *Revista Grasas y Aceites*, vol. 44(6):365-369.

Márquez, R; De la Rosa, C. y Mercado, A. (2007). Actividad antifúngica del extracto total en etanol de la hojas frescas de *Pendilanthus tithymaliodes* L Poit (ultimorrial). *Sccientia et Technica*, vol. 8(033):155-159.

Martínez-Bolaños, M; Nieto-Angel, D; Téliz-Ortiz, D; Rodríguez-Alcazar, J; Martínez-Damian, M; Vaquera-Huerta, H. y Carillo Mendoza, O. (2008). Comparación cualitativa de fresas (*Fragaria* x *ananassa* Duch.) de cultivares mexicanos y estadounidenses. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, vol. 14(2): 113-119.

Mazid, M; Khan, T. y Mohammad, F. (2011). Role of secondary metabolites in defense mechanisms of plants. Journal Biology and Medicine, vol. 3(2):232-249 Special Issue.

Medina, R. y Aguirre, M. (2007). El sistema fresa en México y Michoacán. En Berdegué, A. J. y Sanclemente, X. Ed. Gobierno del estado de Michoacán, Secretaria de Desarrollo Agropecuario-SEDECO y Consejo Estatal de la Fresa –COEFREM). La fresa en Michoacán: los retos del mercado (p. 21-30). México.

Mendoza, B; Moreno, M; Weil, M. y Elango, F. (2007). Evaluación del efecto de extractos vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de *Phytophthora palmivora* Butl. y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. *Revista Tierra tropical*, vol. 3(1):81-89.

Molina, V. (2010). Análisis de la capacidad antimicrobiana q inmunomoduladora de polifenoles glicosilados de especies vegetales mediterráneas: caracterización de su actividad *in vitro* e *in vivo*. Aplicaciones en alimentación funcional. Resumen. *Federación Española de Industrias de la Alimentación y Bebidas*. Instituto de Biología Molecular y Celular- Universidad Miguel Hernández. Valencia. http://www.fiab.es/es/innovacion/innov_paginaMaster.asp?tipo=220&id=1930

Montes, R; Cruz, V; Martínez, G; Sandoval, G; García, R; Zilch, S; Bravo, L; Bermúdez, K; Flores, H. y Carvajal, M. (2000). Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. *Revista Mexicana de Fitopatología*, vol. 18(002):125-131.

Montes, R. (2009). Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología*, vol. 29:73-82.

Murillo, W. y Salazar, D. (2011). Tendencias verdes en la agricultura para el manejo y control de plagas. *Revista Tumbaga*, vol. 6:63-92.

Murphy, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Journal Clinical Microbiology*, vol. 12(4):564.

Organización de las Naciones Unidad para la Alimentación y la Agricultura. (FAO). Producción de mundial de fresa, datos 2010 y 2012. Disponible en: http://faostat.fao.org/site/339/default.aspx

Ortega, G: (2009). Agroecología vs agricultura convencional. Documento de trabajo no. 128b. Base de investigaciones sociales. ISSN 1810-584X.

Ortega, N; Benitez, N. y Cabezas, F. (2011). Actividad antibacterial y composición cualitativa de propóleos provenientes de dos zonas climáticas del departamento del Cauca. Revista de Bioagronomía, vol. 9(1):8-16.

Pérez, M; Flores, P; García, V. y Lozano, V. (1995). Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y efecto de las enfermedades en frijol (*Phaseolus vulgaris* L) en Marín, Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Fitopatologia*, vol. 13:1-9.

Pichardo, B. (2006). La revolución verde en México. *Revista Agrária*, vol. 4:40-68.

RAPAL Uruguay. (2010). Contaminación y eutrofización del agua. Impactos del modelo de agricultura industrial. Ed. RAPAL Uruguay, pp.36

Ramírez, J. y Lacasaña, M. (2001). Plaguicidas: clasificación, uso, toxicología y medición de la exposición. Archivos de Prevención y Riesgos Laborales, vol. 4(2):67-75.

Rangel, D; García, I; Velasco, J; Buitragro, D. y Velazco, E. (2001). Actividad antimicrobiana de los extractos etanólico, acetónico y acuoso de *Baccharis nítida* (Ruis et Pavon) Pers. *Facultad de farmacia*, vol. 42(2):43-46.

Rivera, F. (2011). Propiedades antioxidantes de extractos metanólicos de fruto de fresa de variedades nacionales y extranjeras. Tesis de grado sin publicación, CIIDIR-IPN-Unidad Michoacán, México.

Secretaria del Medio Ambiente y Recursos Naturales (SEMARNAT).degradación de suelos en México 2009. Disponible en:
http://app1.semarnat.gob.mx/dgeia/resumen_2009/index.html

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera (SIAP) producción de fresa en México 2012. Disponible en:
http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=348

Sepúlveda, G; Porta, H. y Rocha, M. (2003). La participación de los metabolitos secundarios en la defensa de las plantas. *Revista mexicana de fitopatología*, vol. 21(003):355-363.

Stauffer, A; Orrego, A. y Aquino, A. (2000). Selección de extracto vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. *Ciencia y tecnología*, vol. 1(2):29-33.

Ullio, L. y Macarthur, E. (2004). Strawberry disease control guide. *Journal NSW Agriculture*, vol. 3:236-244.

Van Baarlen, P; Legendre, L; y Van Kan, J. (2004). Plant defence compounds against *Botrytis* infection. In: Elad, Y; Williamson, B; Tudzynski, P. y Delen, N. *Botrytis*: *Biology, pathology and control*, pp 143-161, Ed. Springer, Dordrecht, The Netherlands.

Wilson, C; Solar, J; El Ghaouth, A. y Wisniewski, M. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Journal Plant Disease*, vol. 81(2):204-210.