



# COLEGIO DE POSTGRADUADOS

---

INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS  
CAMPUS MONTECILLO  
POSTGRADO DE FITOSANIDAD-FITOPATOLOGÍA

**EXTRACTOS VEGETALES Y *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL DE  
*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. EN FRUTOS DE PAPAYA  
MARADOL (*Carica papaya* L.) EN POSTCOSECHA**

NADIA LANDERO VALENZUELA

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

2013

La presente tesis titulada: **EXTRACTOS VEGETALES Y *Trichoderma* spp. EN EL CONTROL DE *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. EN FRUTOS DE PAPAYA MARADOL (*Carica papaya* L.) EN POSTCOSECHA**, realizada por la alumna **Nadia Landero Valenzuela**, bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para la obtención del grado de:

**DOCTORA EN CIENCIAS**

**POSTGRADO DE FITOSANIDAD-FITOPATOLOGÍA**

**CONSEJO PARTICULAR**

  
\_\_\_\_\_  
**CONSEJERO: DR. DANIEL NIETO ANGEL**

  
\_\_\_\_\_  
**ASESOR: DRA RAQUEL ALATORRE ROSAS**

  
\_\_\_\_\_  
**ASESOR: DR. DANIEL TÉLIZ ORTÍZ**

  
\_\_\_\_\_  
**ASESOR: DR. MARIO OROZCO SANTOS**

  
\_\_\_\_\_  
**ASESOR: DR. CARLOS FREDY ORTIZ GARCÍA**

**MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO. AGOSTO DEL 2013**

## A MI ESPOSO

Quien me dio la oportunidad de conocer el amor, quien me mira tiernamente y me calma.  
Te amo esposo mío, Francisco

## A MI HIJO

Y no temí a la muerte, sabiéndote todo mío, ansiosa de esperarte estuve, arrullándote con anticipación, contando con ese desbordante vínculo, que dios nos permitió tener. Ahora permíteme ser tu madre, permíteme ver tu vuelo, permíteme ser parte de tu felicidad, construir tu fortaleza. Esperemos ese momento, ahora solo como tu madre permíteme desvelar junto a tu cuna, derramar mi vida como un río, carcajearnos juntos por una travesura, trenzar tus brazos en mi cuello, mirarme tiernamente en tus grande ojos, y más que todo permíteme amarte solo por ser mi hijo. Amado hijo mío, Franco.

## AGRADECIMIENTOS

DIOS, solo tú has visto mi alma, solo tú conoces mi felicidad. Gracias por este momento llamado vida, que he tomado con sincero amor para llevarte siempre en mi corazón, haciendo todo pensando en ti. Ahora, gracias por este momento de felicidad, gracias por mi sueño.

A todos los contribuyentes ciudadanos, que sin saber apoyaron mi sueño, y que a través de la noble institución CONACYT pude ser parte de los miles de becarios que día a día colaboramos con el crecimiento de México.

AL COLEGIO DE POSTGRADUADOS, por darme la oportunidad de encontrarme en sus aulas, soñando con un mejor mañana, no solo para mí sino para todo aquel que pueda beneficiarse de nuestros logros, por muy pequeños o grandes que éstos sean. Gracias por la formación que hoy puedo tener, por la educación científica de la cual hoy puedo disfrutar, y por la pasión que pude aportar a mi trabajo.

AL FIDEICOMISO, por el valioso apoyo para poder finalizar apropiadamente mi tesis.

A mi consejero Dr. Daniel Nieto Angel, por su valioso apoyo para la elaboración de esta tesis, además por su linda amistad que como estudiantes nos hace más ligeros esos días de estrés y presión que en momentos vivimos. Gracias por las risas, regaños, consejos, y sobre todo por esta oportunidad de conocerlo.

A mis asesores: Dra. Raquel Alatorre Rosas, Dr. Daniel Téliz Ortíz, Dr. Mario Orozco y Dr. Carlos, Fredy Ortíz García, por permitirme poseer un atisbo de ese enorme mundo de conocimientos. Gracias por su valiosa colaboración en este tema que fue mi trabajo el cual desarrollé con pasión.

Al Dr. Cristian Nava por siempre estar dispuesto a apoyarme ya fuera con sus conocimientos o facilitándome algún servicio del laboratorio, además de hacerlo con todo el gusto y alegría.

A la maestra Viky, gran profesionalista que es como tener una enciclopedia humana de hongos fitopatógenos, en los laboratorios, siempre dispuesta a apoyar.

A todas aquellas bellas personas que pude conocer en esta institución, que me ofrecieron su amistad, con las cuáles reí, lloré, me divertí, platicué, y quizás hasta me desvelé, gracias por compartir estos momentos conmigo Berenice, Luis Alfonso, Edgar, Verito, Dagoberto, Paty, Lety, Miguel, Mary Carmen, Claudia, Tania, mi mejor amigo Paquito, y a todas aquellas personas que llenaron mi vida de alegría, y que por cuestión de espacio no puedo mencionarlas, pero siempre estarán en mi memoria con cariño.

#### AGRADECIMIENTOS ESPECIALES

Familia mía, gracias por darme las herramientas para ser la mujer que soy, para enseñarme a tener fortaleza, levantándome después de mis dolorosas caídas. Gracias por mis valores humanos que día a día necesito y aplico en mi vida. Madre, en especial gracias a ti, porque aprendí a admirar tu grandeza como mujer libre, porque te amo incondicionalmente. Aldo, recuerda las caídas son el camino al éxito, siempre lucha por lograr tus sueños, Dios nos formó como un milagro a cada uno de sus hijos. LOS AMO.

“Ciertos momentos son un trozo de felicidad terrenal como el beso esperado del ser amado, como el hijo que llega a iluminar tu vida, la culminación del sueño anhelado. O, solo este momento compartido contigo, porque Dios me lo ha regalado. Y hoy, siento un nuevo olor a rosas en mi alma forjada a cinceladas, será un atisbo de sabiduría, regalo dado por dioses?”

Nadia Lander

## Índice

1. Introducción.....	1
2. Objetivos.....	4
2.1 Objetivo general .....	4
2.2 Objetivos particulares .....	4
3. Capítulo I. Revisión de literatura.....	5
3.1 Importancia del cultivo de papaya.....	5
3.2 Pérdidas postcosecha en papaya ocasionadas por fitopatógenos.....	6
3.3 Clasificación taxonómica .....	7
3.4 Importancia de <i>Colletotrichum goeosporioides</i> como hongo fitopatógeno .....	7
3.5 Proceso de infección.....	8
3.6 Sintomatología.....	9
3.7 Control de <i>Colletotrichum goeosporioides</i> .....	10
3.8 Control biológico de fitopatógenos .....	10
3.9 Microorganismos con potencial antagonico .....	11
3.10 Criterios para un antagonista ideal .....	12
3.11 Control biológico de <i>Colletotrichum goeosporioides</i> .....	13
3.12 Control de <i>Colletotrichum</i> sp. con extractos vegetales .....	14
4. Capítulo II. Potencial antifúngico en postcosecha de seis extractos vegetales sobre <i>Colletotrichum goeosporioides</i> en papaya ( <i>Carica papaya</i> ).....	18
4.1 Resumen .....	18
4.2 Abstract.....	18
4.3 Introducción.....	19
4.4 Materiales y métodos.....	20
4.4.1 Origen de aislamientos .....	20
4.4.2 Identificación y prueba de patogenicidad de aislamientos de <i>Colletotrichum goeosporioides</i> .....	20
4.4.3 Obtención de extractos vegetales crudos.....	21
4.4.3.1 Extracto de ajo ( <i>Allium sativum</i> ) .....	21
4.4.3.2 Extracto de semillas, hojas y cáscara de limón ( <i>Citrus aurantifolia</i> ).....	22

4.4.3.3 Extracto de canela ( <i>Cinnamomum zeylanicum</i> ) .....	22
4.4.3.4 Extracto de neem ( <i>Azadirachta indica</i> ).....	22
4.4.4 Control de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> k con extractos vegetales .....	22
4.4.4.1 Crecimiento micelial radial .....	24
4.4.4.2 Germinación de esporas.....	24
4.4.4.3 Esporulación .....	24
4.4.5 Control de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> in vivo en frutos de papaya con extractos vegetales .....	24
4.4.5.1 Desinfestación del fruto.....	25
4.4.5.2 Severidad .....	25
4.4.5.3 Fitotoxicidad.....	25
4.4.6 Análisis estadístico .....	26
4.5 Resultados y discusión .....	26
4.5.1 Pruebas <i>in vitro</i> .....	26
4.5.1.1 Efecto de los extractos de ajo y limón mexicano .....	26
4.5.1.2 Efecto de extracto de canela .....	31
4.5.1.3 Efecto de extracto de semillas de neem.....	33
4.5.2 Pruebas <i>in vivo</i> .....	34
4.6 Conclusiones.....	39
5. Capítulo III. Control biológico de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> por <i>Trichoderma</i> spp. sobre frutos de papaya maradol en postcosecha .....	40
5.1 Resumen .....	40
5.2 Abstract.....	40
5.3 Introducción.....	41
5.4 Materiales y métodos.....	42
5.4.1 Empleo de <i>Trichoderma</i> spp. como agente de control biológico .....	42
5.4.2 Obtención de aislamientos y prueba de patogenicidad de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	42
5.4.3 Actividad antagónica de <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> in vitro .....	43



5.4.3.1 Porcentaje de colonización .....	43
5.4.3.2 Efecto inhibitorio .....	44
5.4.3.3 Esporulaci3n .....	44
5.4.3.4 Mecanismos de acci3n de <i>Trichoderma</i> sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	45
5.4.4 Actividad antag3nica de <i>Trichoderma</i> sp. sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides in vivo</i> .....	46
5.4.4.1 Prueba de efectividad de <i>Trichoderma</i> sobre el desarrollo de lesiones causadas por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en papaya en postcosecha .....	46
5.4.4.2 Evaluaci3n de la severidad sobre frutos de papaya .....	48
5.4.4.3 Evaluaci3n de fitotoxicidad sobre frutos de papaya.....	48
5.4.5 An3lisis estadístico .....	48
5.5 Resultados y discusi3n .....	48
5.5.1 Actividad antag3nica de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> medida <i>in vitro</i> .....	48
5.5.2 Actividad antag3nica de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides in vivo</i> .....	53
5.6 Conclusiones.....	58
6. Discusi3n general .....	58
7. Conclusiones generales .....	60
8. Literatura citada .....	61

## Índice de cuadros

<b>Cuadro 1</b> Extractos vegetales probados para el control <i>in vitro</i> de <i>C. gloeosporioides</i> en papaya en postcosecha. ....	23
<b>Cuadro 2</b> Evaluación para crecimiento micelial (C.M.), germinación (GERM) y esporulación (ESPOR) de <i>C. gloeosporioides</i> al aplicar extracto de ajo para su control. ....	27
<b>Cuadro 3</b> Evaluación para crecimiento micelial (C.M.), germinación (GERM) y esporulación (ESPOR) de <i>C. gloeosporioides</i> al aplicar extracto de cáscara de limón para su control. ....	28
<b>Cuadro 4</b> Evaluación para crecimiento micelial (C.M.), germinación (GERM) y esporulación (ESPOR) de <i>C. gloeosporioides</i> al aplicar extracto de hoja de limón para su control. ....	30
<b>Cuadro 5</b> Evaluación para crecimiento micelial (C.M.), germinación (GERM) y esporulación (ESPOR) de <i>C. gloeosporioides</i> al aplicar extracto de semilla de limón para su control. ....	31
<b>Cuadro 6</b> Evaluación para crecimiento micelial, germinación y esporulación de la cepa más patogénica seleccionada de <i>C. gloeosporioides</i> (OC14) al aplicar extracto de canela para su control. ....	32
<b>Cuadro 7</b> Evaluación para crecimiento micelial, germinación y esporulación de <i>C. gloeosporioides</i> al aplicar extracto de neem para su control. ....	34
<b>Cuadro 8</b> Evaluación de la variable severidad de antracnosis al aplicar diferentes concentraciones de extracto de ajo para su control. ....	35
<b>Cuadro 9</b> Evaluación de la variable severidad de antracnosis al aplicar diferentes concentraciones de extracto de canela para su control. ....	35
<b>Cuadro 10</b> Evaluación de la variable fitotoxicidad a los extractos de ajo y canela aplicados para el control de <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de papaya en postcosecha. ....	37
<b>Cuadro 11</b> Tratamientos y réplicas de diferentes especies de <i>Trichoderma</i> como control biológico de <i>C. gloeosporioides</i> . ....	47

<b>Cuadro 12</b> Porcentaje de colonización de <i>Trichoderma</i> spp. sobre <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	50
<b>Cuadro 13</b> Porcentaje de inhibición de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> por <i>Trichoderma</i> spp. ....	51
<b>Cuadro 14</b> Efectividad de <i>Trichoderma</i> en interacción con el tiempo, sobre el desarrollo de lesiones causadas por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> en papaya en postcosecha .....	55
<b>Cuadro 15</b> Evaluación de la fitotoxicidad de <i>Trichoderma</i> sobre frutos de papaya en postcosecha. ....	57

## Índice de figuras

- Figura 1.** Principales países productores de papaya en el mundo. FAOSTAT 2011 ..... 5
- Figura 2.** Efecto de diferentes dosis y tiempos de aplicación de extracto de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) en la severidad de la antracnosis sobre frutos de papaya en postcosecha. A) Dosis 0.0264% tiempo1, B) Dosis 0.054% tiempo 1, C) Dosis 0.0120% tiempo1, D) Dosis 0.0200% tiempo 1, E) Dosis 0.0300% tiempo 1, F) Dosis 0.0264% tiempo 2, G) Dosis 0.054% tiempo 1, H) Dosis 0.0120% tiempo2, I) Dosis 0.0200% tiempo 2, J) Dosis 0.0300% tiempo 2, K) Dosis 0.0264% tiempo 3, L) Dosis 0.054% tiempo 3, M) Dosis 0.0120% tiempo 3, N) Dosis 0.0200% tiempo 3, O) Dosis 0.0300% tiempo 3, P) Testigo absoluto y Q) Testigo químico (Imazalil). .....
- Figura 3.** Prueba de antagonismo de A) *Trichoderma viride*, B) *Trichoderma longibrachiatum*, C) *Trichoderma asperellum* cepa 1, D) *Trichoderma asperellum* cepa 2, E) *Trichoderma harzianum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y F) *Colletotrichum gloeosporioides*. Las flechas muestran el crecimiento de *Trichoderma*. ..... 49
- Figura 4.** Hifas de *Colletotrichum gloeosporioides* interactuando con A) *Trichoderma viride*, B) *Trichoderma longibrachiatum*, C) *Trichoderma asperellum*, cepa 1, D) *Trichoderma asperellum* cepa 2, E y F) *Trichoderma harzianum*. Flechas rojas indican hifas de *Colletotrichum*, Flechas negras indican hifas de *Trichoderma*. 52
- Figura 5.** Hifas de *Trichoderma* spp. fijada sobre *C. gloeosporioides*. Flecha muestra célula vacuolizada del patógeno. .... 53
- Figura 6.** Efectividad de *Trichoderma* sobre el desarrollo de lesiones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya en postcosecha..... 54

## 1. Introducción

Los frutos de papaya en postcosecha son altamente perecederos debido a su condición climática; sin embargo, bajo condiciones adecuadas de almacenamiento (10° C/90-95% HR) pueden conservar su calidad durante tres semanas (Kader, 1992). Contrariamente, las pudriciones debidas a diferentes patógenos son factores que pueden afectar la calidad postcosecha, tales como: *Phoma caricae-papayae* (Tarr) Punith., (1980), *Rhizopus stolonifer* Ehrenb. (Ex Fr.) Lind, *Alternaria alternata* (Fries) Keissler, *Lasiodiplodia theobromae* (Berk, y Curt.) v. Arx y *Fusarium* spp. (Benato *et al.*, 2001; Snowdon, 1990) y *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. agente casual de la antracnosis, la principal enfermedad postcosecha de la papaya (Macedo, 2004; Cappellini *et al.*, 1998; Guzmán, 1998; Dickman y Álvarez, 1983; Arias, 1992).

El desarrollo de la antracnosis en anaquel es favorecido por el mal manejo que se le da a la fruta antes, durante y después de la cosecha (Arauz y Mora, 1983). En la mayoría de los países productores de papaya la incidencia de las enfermedades postcosecha presenta valores altos cuando se aplican medidas de combate deficientes o nulas. Tal fue el caso de Brasil donde el 100% de los frutos presentó enfermedades fungosas, en comparación con valores del 25 al 50% en el caso de la fruta tratada con diversos productos fungicidas (Bolkan, 1976).

El método más empleado para el control de esta enfermedad es la aplicación de fungicidas sintéticos; sin embargo, el uso de químicos en la fruticultura ha sido restringido en muchos países (Serrano *et al.*, 2005, Dayan *et al.*, 2009). Así, los países consumidores demandan productos agrícolas sin residuos de pesticidas (Cutler y Cutler, 1999; Serrano *et al.*, 2005). Además, los pesticidas pueden afectar las poblaciones de diversos organismos benéficos, y sus formas tóxicas pueden persistir en el suelo (Hayes y Laws, 1991). Asimismo se puede incrementar la resistencia de patógenos hacia los químicos sintéticos (Cakir *et al.*, 2005; Ramezani, *et al.*, 2002).

Por lo anterior se requieren desarrollar nuevas tecnologías de preservación de papaya, las cuáles deben ser amigables con el medio ambiente y seguras para el humano (Duru *et al.*,

2003). A la fecha, se han desarrollado varias tecnologías naturales de empaque, en las cuales, los agentes antimicrobiales son incorporados en la superficie del empaque y liberados poco a poco dentro del mismo (Suppakul *et al.*, 2003). Entre las diversas alternativas el uso de productos de origen vegetal, el uso de aceites esenciales que son biodegradables ha llamado la atención de científicos alrededor del mundo. Los productos de origen vegetal además de ser económicos y seguros ambientalmente, han demostrado ser eficaces para el control de enfermedades postcosecha, por lo que se consideran candidatos ideales para su uso como agroquímicos (Macias *et al.*, 1997). Recientemente se encontró que los aceites esenciales de hierba de limón (*Cymbopogon citratus* Stapf) y canela (*Cinnamomum zeylanicum* J. Presl) tienen propiedades antifúngicas en contra de *Colletotrichum musae* (Berk. et Curt.) en bananas (Maqbool *et al.*, 2010). Uno de los compuestos azufrados ampliamente estudiados son los sulfuros orgánicos, los cuales se encuentran distribuidos en las especies de *Allium*, entre ellos se puede mencionar a la Alicina, este ha sido aislado en estado puro como un líquido incoloro que contiene aproximadamente un 40% de azufre en su molécula. Se ha demostrado también su actividad antibacteriana y antifúngica (Cavallito y Bailey, 1994; Bianchi *et al.*, 1997; Montes *et al.*, 1990; Reyes, 1996; Baños *et al.*, 2004). En un estudio en donde se empleó extracto de ajo (*Allium sativum* L.) *in vitro*, se encontró que este tuvo un amplio espectro de acción contra los 14 hongos que se probaron. Asimismo *C. gloeosporioides* fue controlado por este extracto, manteniendo sanos hasta un 65.2% de frutos de aguacate (Reyes, 1996). En estudios realizados por Baños *et al.*, (2004) se evidenció que extractos de ajo y eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill) redujeron la severidad de la antracnosis en frutos de papaya en un 45 y 41.7% respectivamente. Bianchi *et al.*, (1997) observaron que los extractos de bulbo de ajo inhibieron en un 80% el crecimiento micelial de *C. lindemuthianum* (Sacc. y Mag.).

El aceite esencial de limón (*Citrus lemon*) (L.) Burm. f. (pro. sp.) contiene diversos compuestos, entre ellos el Citral y el Limoneno, compuestos que pertenecen a la familia de los terpenos y se ha demostrado que tienen actividad fungitóxica (Misra *et al.*, 1988). Los extractos de hojas de limón y papaya han sido utilizados para el control de otros hongos

postcosecha, como son *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Pestalotiopsis* spp. y *Rhizopus* spp. Por ejemplo Bautista *et al.* (2002) observaron que el extracto de hoja de limón inhibió completamente el desarrollo de *C. gloeosporioides in vitro*. Otro cítrico utilizado para el control de este hongo fue la toronja, de la cual se emplearon las semillas, demostrándose una reducción significativa de la infección en *Passiflora mollissima* (Bailey) (Cáceres *et al.*, 1998).

Otra alternativa de control amigable con el ambiente es el uso de hongos antagonistas debido a que su acción puede ser aprovechada como una forma de control biológico de patógenos. Entre los microorganismos más importantes se encuentran los hongos de los géneros *Penicillium oxalicum* Corrie and Thom, *Gliocladium viride* Matruchot, *Gliocladium roseum* Bainier, *Trichoderma harzianum* Rifai y *Cladosporium* sp. (Fernández-Larrea, 2001).

*T. harzianum*, es el antagonista más utilizado para el control de enfermedades producidas por hongos fitopatógenos como *Phytophthora capsici* (Leo.), *Rhizoctonia solani* (Kühn), *Sclerotium rolfsii* (Sacc.), *A. alternata*, *Fusarium oxysporum* f.sp. *gladioli* (Sacc.), *Verticillium dahliae* (Kleb) y *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*. *Trichoderma* desplaza al hongo fitopatógeno: por competencia directa, espacio o nutrientes, parasitismo directo con metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se atribuyen cambios estructurales a nivel celular, tales como la desintegración del citoplasma y lisis celular (Ezziyyani *et al.*, 2005). De acuerdo a lo anterior, en el presente trabajo se propone evaluar el efecto que tienen diferentes extractos vegetales así como el hongo *Trichoderma* sp. sobre *C. gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya* L.) en postcosecha.

## 2. Objetivos

### 2.1 Objetivo general

Determinar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de extractos vegetales y *Trichoderma* en el control de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya en postcosecha.

### 2.2 Objetivos particulares

1. Evaluar el efecto de extractos vegetales crudos de semillas, hojas y cáscara de limón (*Citrus aurantifolia*); semillas de ajo (*Allium sativum*), canela (*Cinnamomun zeylanicum*) y neem (*Azadirachta indica*) en la germinación, crecimiento micelial y esporulación de aislamientos de *C. gloeosporioides*.
2. Determinar el efecto de los extractos vegetales crudos seleccionados en las pruebas *in vitro* sobre la severidad de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya en postcosecha.
3. Determinar la fitotoxicidad como respuesta a las aplicaciones de las alternativas de control en los frutos de papaya.
4. Evaluar el efecto *in vitro* de diferentes especies de *Trichoderma* spp. sobre el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.
5. Evaluar el efecto *in vivo* de diferentes especies de *Trichoderma* spp. en la severidad de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya en postcosecha.

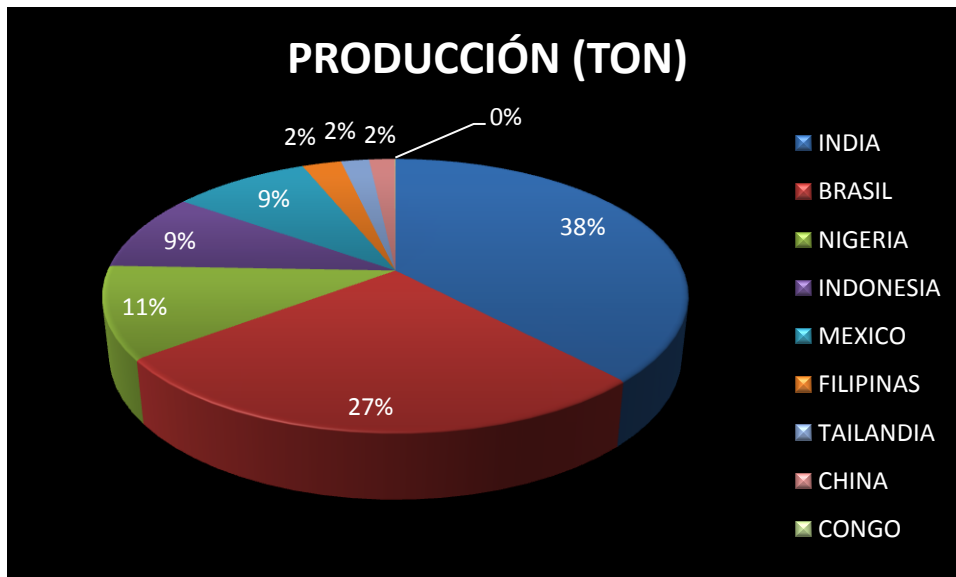


### 3. Capítulo I. Revisión de literatura

#### 3.1 Importancia del cultivo de papaya

El papayo es uno de los frutales más cultivados en los países tropicales debido a que es una planta de producción rápida y corto período de reembolso. Otro aspecto que ha contribuido a la expansión de este cultivo en los últimos años, ha sido el incremento de la demanda, motivada por su valor alimenticio (Ramos, 2002).

Su producción se ha extendido en diversos países tropicales y subtropicales del mundo, como son India, Brasil, Nigeria, Indonesia, México, Filipinas, Tailandia, China y Congo (Figura 1). En 2011, México ocupó el primer lugar como país exportador, seguido por Belice y Guatemala, y quinto como productor mundial (FAOSTAT, 2011).



**Figura 1.** Principales países productores de papaya en el mundo. FAOSTAT 2011

El fruto es muy susceptible a diversas enfermedades ocasionadas por hongos, entre ellos *C. gloeosporioides*, que provoca antracnosis en hojas y frutos, ocasionando elevadas pérdidas económicas. A nivel internacional las pérdidas postcosecha han sido reportadas desde un 1% hasta un 93%, dependiendo del manejo que se le dé a los frutos y a los procedimientos

de empaque y comercialización (Pantastico, 1979; Álvarez y Nishijima, 1987; Paull *et al.*, 1997).

### **3.2 Pérdidas postcosecha en papaya ocasionadas por fitopatógenos**

En general, en todos los países donde se cultiva la papaya existen elevadas pérdidas postcosechas debido al daño por numerosas enfermedades, o combinadas con manejo y empaque ineficiente de los frutos. Desde 1978, la Academia Nacional de Ciencia de los Estados Unidos estimó que el intervalo de pérdidas postcosecha de papaya en todo el mundo era de 40-100% (NAS, 1978).

De acuerdo a algunos reportes, Hawaii ha presentado pérdidas del 75% (Paul *et al.*, 1997), Brasil más del 50% (Bolkan *et al.*, 1976), Pakistán 35% (Pantastico, 1979), Costa Rica del 33% (Guzmán, 1998), Filipinas del 20-26%, y Taiwan 24% (Paul *et al.*, 1997).

En México no existen reportes sobre pérdidas postcosecha de papaya ocasionada por microorganismos; sin embargo, se sabe que en el Estado de Veracruz, específicamente en el municipio de Alto Lucero, las pérdidas varían en relación a la época del año. Por ejemplo, en los meses de febrero a mayo cuando la temperatura es elevada y las precipitaciones bajas, las pérdidas postcosecha oscilan entre 10 y 15%; por el contrario, en los meses de junio a septiembre, cuando la temperatura y precipitaciones son elevadas, las pérdidas son de hasta un 75%.

Los hongos del género *Colletotrichum* causantes de la antracnosis constituyen un interesante campo de estudio, y su ámbito más frecuente en que encuentra mayor riqueza, es el que tiene que ver con su papel de patógeno de plantas (Correa *et al.*, 2007). Este género es considerado como uno de los más importantes en la agricultura debido a la diversidad de especies vegetales que pueden ser afectadas y la magnitud de los daños ocasionados sobre las plantas (Femenía, 2007).

Entre las especies más agresivas pertenecientes a este género (Bailey and Jeger, 1992) se pueden destacar a *C. gloeosporioides*, éste es un patógeno de una amplia variedad de frutas; *C. acutatum* Simmonds patógeno de almendras, aguacates, mangos, melocotones cítricos, uvas y fresas; *C. coccodes* (Wallr.) Hughes, éste hongo ataca principalmente a pimientos, patatas y tomates; *C.kahawae* Waller y Bridge es el agente causal de la antracnosis de los

bananos y plátanos, así como otras especies con múltiples especies como *C. lindemuthianum* (Sacc. y Mag.), *C. capsici* (Sidow) Butler et Bisby, *C. dematium* (Pers.) Grove, *C. graminícola* (Ces.) Wils. y *C. truncatum* (Schwein.) v. Arx. .

### 3.3 Clasificación taxonómica

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

Reino: Mycetae o Fungi

División: Eumycota

Subdivisión: Deuteromycotina

Clase: Coelomycetes

Orden: Melanconiales

Género: *Colletotrichum*

Especie: *C. gloeosporioides*

### 3.4 Importancia de *Colletotrichum gloeosporioides* como hongo fitopatógeno

*C. gloeosporioides* es un patógeno de gran importancia ya que infecta un amplio rango de hospedantes (Manners *et al.*, 1992), entre ellos mango (*Mangifera indica* L.), papaya (*Carica papaya*), banano (*Musa paradisiaca* L.) Soja (*Glycine max* L.), chirimoya (*Annona cherimola* Mill.), flores como violetas (*Viola odorata* L.), orquídeas (*orchidaceae*) de diferentes géneros y especies, lluvia de oro (*Cassia fistula* L.), carambola (*Averrhoa carambola* L.), aguacate (*Persea americana* Mill.), Menta (*Menta piperita* L.), gandul (*Cajanus cajan* L.), la fresa (*Fragaria vesca* L.), la manzana (*Malus domestica* Borkh), la almendra (*Prunus dulcis* Mill.), la lenteja (*Lens culinaris* Medik), el algodón (*Gossipium hirsutum* L.), el café (*Coffea arabica* L.), entre otras plantas (Wajid Khan y Singh, 1974; Lenné, 1992), además es uno de los hongos más importantes causantes de pudriciones de los frutos en postcosecha (Bolkan *et al.*, 1976). Parte de su importancia radica en que afecta flores, frutos tanto en árboles en desarrollo como en producción, y los frutos pueden ser afectados en cualquier etapa de crecimiento. La antracnosis ocasionada por *C. gloeosporioides* es una enfermedad común y destructiva, tiene distribución mundial

especialmente en áreas húmedas y cálidas, en donde bajo condiciones favorables, los tejidos afectados se cubren con masas de esporas de color rosado (Menezes-Morales y Hanlin, 1996).

En un estudio realizado por Bolkan *et al.*, (1976) se reportó que *C. gloeosporioides* fue aislado de frutos de papaya inmaduros y maduros, en porcentajes de 40 y 89%, respectivamente, demostrando que este microorganismo está presente en las distintas etapas de desarrollo del fruto y en porcentajes considerables.

Desde el punto de vista económico, este hongo causa elevadas pérdidas al sector agrícola de todo el mundo (Martínez y Estrada, 1994; Cooke *et al.*, 2003; Leroux, 2003). La mayor incidencia de la enfermedad se presenta en las áreas tropicales y subtropicales del planeta, debido a las condiciones ambientales de estas regiones, con temperaturas que van desde medias a altas, lluvias frecuentes y una humedad relativa significativa, que favorecen la dispersión y el desarrollo del patógeno (Menezes-Morales y Hanlin, 1996).

### **3.5 Proceso de infección**

El proceso de infección de *C. gloeosporioides* se inicia con el contacto del hongo y el fruto, sin ser necesaria la presencia de una herida para facilitar la entrada del hongo. El inóculo puede tener su origen en plantas enfermas (hojas flores y frutos). Por medio de la lluvia (salpicadura) y el viento, las esporas son transportadas hasta los frutos que se encuentren en desarrollo (Chau y Álvarez, 1983). Uno de los conidios se establece en la superficie del fruto y germinan si la humedad relativa es cercana al 100% y si la temperatura oscila entre 25 y 29 °C, entonces el hongo produce una enzima llamada cutinasa, la cual es esencial en la penetración del tejido verde del fruto de papaya. Después de varias horas, el tubo germinativo se alarga y la punta se hincha para formar una estructura conocida como apresorio, el cual mantiene al hongo firmemente unido al fruto. El crecimiento fúngico se detiene y posiblemente una hifa subcuticular permanece temporalmente inactiva, hasta que el fruto madura (Binyamini y Schiffmann-Nadel, 1971; Dickman *et al.*, 1982; Coates y Gowanlock, 1993).

Por lo general, este microorganismo se adquiere cuando el fruto está en la fase inmadura, y permanece en forma quiescente o latente (inactivo por un tiempo, pero con capacidad de

reactivarse posteriormente unido a la epidermis por medio del apresorio y de la hifa subcuticular), y la reactivación se manifiesta principalmente en la etapa de postcosecha, cuando el fruto ingresa en la etapa climatérica o de maduración, es decir, cuando las condiciones de temperatura, humedad y nutrimentos son adecuadas para la germinación de esporas y el desarrollo micelial, ya que en esta etapa numerosas enzimas degradan los carbohidratos presentes en el fruto, transformándolos en azúcares sencillos y ácidos orgánicos, necesarios para la nutrición y desarrollo del hongo. De tal forma que las hifas subcuticulares que habían permanecido inactivas o quiescentes, vuelven a estimularse y se ramifican a través del tejido hospedero, al que invade rápidamente, produciendo los síntomas típicos de la antracnosis (Verhoeff, 1974; Dickman y Álvarez, 1983; Coates y Gowanlock, 1993).

### **3.6 Sintomatología**

La enfermedad causada por las diferentes especies del género *Colletotrichum* (teleomorfo *Glomerella*) se conoce comúnmente como antracnosis, y se manifiesta por la aparición de manchas oscuras en hojas y frutos, con formas redondeadas u ovaladas, con tamaños variables que pueden oscilar entre un diámetro de 1 ó 2 mm hasta 5 cm; en algunas ocasiones, las lesiones se presentan ligeramente sumidas o poseen un contorno levemente elevado (Morales, 1997).

En general, las lesiones producidas por la antracnosis se presentan con tonalidades negras o marrones; en otras ocasiones, la infección aparece con coloración que va del rojo ladrillo al púrpura, y posteriormente cambian hacia coloraciones pardas oscuras, hasta adquirir tonalidades muy negras. El nombre de antracnosis hace alusión al aspecto visual de las manchas necróticas hundidas. Es muy común observar en los centros de las lesiones más antiguas algunas masas de esporas de color rosa o salmón (Rivera, 1991).

En algunos vegetales, la enfermedad produce una disminución significativa del área foliar, que conlleva un debilitamiento de las plantas por reducción de la capacidad fotosintética. Los ataques a las inflorescencias y a los frutos en formación ocasionan su caída prematura, lo que conduce a una disminución de la productividad; los brotes tiernos y los tallos en formación de las plantas adultas y jóvenes son afectados drásticamente. El ataque ocasiona,

en muchos casos, la muerte del huésped; este hecho es muy importante en los viveros, donde se presentan pérdidas significativas de las plántulas destinadas al trasplante. Los efectos de la enfermedad se ven incrementados por la tendencia del patógeno a causar daños en los frutos durante los procesos de postcosecha; este estadio de la enfermedad afecta en gran medida a todos los frutos destinados a la exportación y aquéllos que son almacenados para su posterior comercialización o consumo (Castro y Restrepo, 2004).

### **3.7 Control de *Colletotrichum gloeosporioides***

Para prolongar la vida postcosecha de los productos hortofrutícolas se han implementado diferentes tecnologías. Actualmente las alternativas de control son variadas debido a que la estrategia más común, los pesticidas, han causado resistencia a éstos organismos patógenos (Sanders *et al.*, 2000). Las principales son el uso de aire caliente (Coates *et al.*, 1993; Nishijima *et al.*, 1992), tratamientos hidrotérmicos (Prusky *et al.*, 1999; Smoot y Seagall, 1963), atmósferas modificadas (Karabulut y Baikal, 2004), luz ultravioleta (Stevens *et al.*, 1997), extractos de plantas (Bautista-Baños *et al.*, 2003) y microorganismos como agentes de control biológico (Janisiewics y Korsten, 2002; Spadaro y Gullino, 2004; Wilson y Wisniewsky, 1989, Woodhead *et al.*, 1990). Las anteriores son alternativas al control químico, el cual no deja de ser una alternativa más y que bajo ciertas condiciones y aplicado oportuna y correctamente, su uso es justificado.

### **3.8 Control biológico de fitopatógenos**

El control biológico (CB), se define como cualquier condición o práctica por medio de la cual la sobrevivencia o actividad de un patógeno se reduce a través de la mediación de cualquier otro organismo, excepto el hombre, con disminución de la incidencia de la enfermedad (Garrett, 1965).

El uso de microorganismos para el control de enfermedades de plantas y de otros problemas microbiológicos que limitan la productividad ha recibido mayor atención (Lindow y Wilson, 1997). La mayoría de las enfermedades en campo han sido manejadas con plaguicidas químicos, los cuales se han aplicado al suelo, semillas, follaje y frutos. Debido a las consecuencias negativas sobre la salud humana y el ambiente (Kookana y Simpson,

2000) por las aplicaciones químicas, la residualidad (O'Keefe y Farrell, 2000) y el desarrollo de resistencia a plaguicidas (Fry y Milgroom, 1990; Ho, 2000), provocó la búsqueda de plaguicidas de remplazo con agentes biológicos, que puedan ser utilizados en el control. Los investigadores enfocan los trabajos a entender principalmente la ecología y epidemiología de los fitopatógenos, así como también de los microorganismos benéficos.

El control de fitopatógenos con microorganismos está bien documentado y no solo es de interés académico, sino también comercial (Wilson y Backman, 1998), siendo estos productos una alternativa viable de uso.

El control biológico involucra un conocimiento completo de los sistemas de cultivo, epidemiología de la enfermedad, la biología, ecología y dinámica de población de los antagonistas y la interacción entre todas las variables (Garrett, 1965; Deacon, 1991); además introduce solamente al antagonista cuando hay necesidad de una mayor efectividad y su población no necesita estar más grande que aquella que suprime adecuadamente el inóculo primario del patógeno o el progreso de la enfermedad (Berger, 1988).

### **3.9 Microorganismos con potencial antagónico**

Los hongos antagonista son microorganismos que producen compuestos antifúngicos que limitan severamente el crecimiento de los hongos como por ejemplo: *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp, *Streptomyces* sp, *Coniothyrium* sp, *P. oxalicum*, *Candida* sp y *Cladosporium* sp que compiten con los hongos patógenos *F. oxysporum* f.sp. *lycopersici*, *R. solani*, *Verticillium dahliae*, *Botrytis cinérea* Pers. y *A. alternata* por nutrientes y espacio (Serrano y Galindo, 2006).

Los hongos antagonistas son más numerosos que los que utilizan las bacterias, y cada aislado puede expresar uno o más de ellos en forma simultánea frente a un determinado patógeno. De ahí que es importante establecer cuantos y cuales mecanismos está expresando un hongo antagonista frente a un determinado fitopatógeno, y si tiene la capacidad de expresar esos mismos mecanismos frente a otros patógenos, hecho que está relacionado con la composición de la pared celular del fitopatógeno, y la inducción de la secreción de enzimas por parte del agente de control biológico para la degradación de esta estructura. En consecuencia, las alternativas son múltiples dado que la expresión de un

determinado mecanismo de control biológico puede tener como consecuencia un efecto biológico específico hasta un amplio espectro de acción cuando se expresa para controlar a más de un fitopatógeno. Estos análisis permiten explicar desde el punto de vista molecular, la eficiencia, especificidad, y amplio espectro de algunos antagonistas fúngicos con relación a otros (Serrano y Galindo, 2006), y a partir de estos antecedentes seleccionar a aquel o aquellos que sean más apropiados como son: *Trichoderma* sp, *Gliocladium* sp, *Streptomyces* sp, *Coniothyrium* sp, *P. oxalicum*, *Candida* sp y *Cladosporium* sp.

### **3.10 Criterios para un antagonista ideal**

Un antagonista potencial debería tener ciertas características deseables, que lo hacen un bioagente ideal (Wilson and Wisniewski, 1989; Barkai-Golan, 2001): El antagonista debería ser a) genéticamente estable; b) efectivo en bajas concentraciones; c) pocos requerimientos nutricionales; d) capaz de sobrevivir bajo condiciones ambientales adversas; e) efectivo en contra de un amplio rango de patógenos; f) resistente a plaguicidas; g) incapaz de producir metabolitos dañinos al ser humano; h) no patógeno al hospedero; i) preparaciones fácilmente almacenables y j) compatibles con otros tratamientos físicos y químicos. Además un antagonista microbiológico debería tener una ventaja adaptativa sobre un patógeno específico (Wilson y Wisniewsky, 1989), por ejemplo *R. stolonifer* es más sensible a bajas temperaturas que muchos otros patógenos. Además, para un control efectivo un antagonista microbial debería tener la habilidad de crecer, multiplicarse y suprimir a los patógenos a bajas temperaturas. Asimismo, para controlar enfermedades postcosecha a un nivel satisfactorio un antagonista debería tener la habilidad de sobrevivir bajo condiciones frías de almacenamiento (Lurie *et al.*, 1995). Considerando estos factores, el trabajo de investigación sobre el uso de antagonistas microbiales para el control de enfermedades postcosecha de frutas y vegetales ha sido reorientado en muchos países. Aún, si un antagonista tiene todas las características deseables el factor económico decide si será comercializado o no.



### 3.11 Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides*

El control biológico de antracnosis ha sido reportado en manzanas (Chand-Goyal y Spotts, 1996; Janiciewicz *et al.*, 2003), papaya (Gamagae *et al.*, 2004), aguacate (Korsten *et al.*, 1995) y mango (De Villiers y Korsten, 1996). La mayor parte de los experimentos de control biológico en enfermedades postcosecha se han realizado aplicando los antagonistas en condiciones controladas de humedad y temperatura. Pocos trabajos se han realizado con aplicación de microorganismos en condiciones de campo, en donde la efectividad de los antagonistas es afectada por otros factores, como cambios de temperatura, humedad, luz ultravioleta e interacción con otros microorganismos. Paradójicamente uno de los mayores obstáculos para el desarrollo del control biológico en postcosecha es su relativa inhabilidad para controlar infecciones establecidas en precosecha, como son las infecciones latentes (Spadaro y Gullino, 2004). La aplicación en campo de los agentes de control biológico puede propiciar la colonización de la superficie del fruto y prevenir el establecimiento de infecciones latentes en los frutos de la huerta productora (Ippolito y Nigro, 2000).

Juárez (2001) reportó una extensiva búsqueda de microorganismos antagonistas al agente causal de la antracnosis del mango, donde se aislaron 120 cepas (5 levaduras y 115 bacterias) de la filósfera de mango, de las cuales dos cepas (una bacteria y una levadura) fueron las que presentaron mayor actividad antagonista en ensayos *in vitro* contra *C. gloeosporioides*; dichas cepas fueron caracterizadas con mayor detalle (Patiño *et al.*, 2002) microscópica y bioquímicamente, identificándose a la bacteria *Bacillus subtilis* y la levadura *Rhodotorula minuta* Saito. La caracterización fue confirmada con técnicas de PCR, analizando RNA ribosomal. En bioensayos realizados *in vitro* la levadura *R. minuta* presentó principalmente el fenómeno de antagonismo por competencia y la bacteria *B. subtilis* por antibiosis (Allende *et al.*, 2001; Patiño *et al.*, 2002). De estas dos cepas antagonistas seleccionadas, se probaron formulaciones líquidas a una concentración de  $3 \times 10^8$  UFC/mL, asperjándolas cada 15 días durante los dos últimos meses previos a la cosecha de mango cultivar Keit. Las formulaciones de *R. minuta* o *B. subtilis* controlaron la antracnosis en niveles que fueron mejores o iguales que los alcanzados con la aplicación del fungicida químico comercial Mancozeb (Allende *et al.*, 2001). También para los dos microorganismos finalmente seleccionados se probaron medios de cultivo de interés

industrial usando materias primas de bajo costo y de disponibilidad comercial (Patiño-Vera *et al.*, 2002). Después de haber seleccionado el medio de cultivo se procedió a escalar el proceso de nivel matraz hasta un fermentador de 100 L, usando el criterio de potencia volumétrica constante. Las células viables obtenidas en el fermentador piloto superaron los valores que se habían obtenido en los matraces en agitación y en un tiempo menor (Patiño-Vera *et al.*, 2002)

Por su parte, Baños-Guevara *et al.* (2004) evaluaron los efectos de bacterias antagonistas y extractos de plantas con propiedades fungitoxicas sobre características físicas, químicas y fisiológicas de la papaya maradol inoculada con *C. gloeosporioides*. Se utilizaron tres aislamientos de *Bacillus firmus* Bredemann y Werner y cuatro de *Pseudomonas fluorescens* Migula, de los cuales solo dos de *B. firmus* redujeron *in vitro* el crecimiento de *C. gloeosporioides* en 75.3 y 69.2% en un lapso de 96 horas. Sin embargo, en postcosecha no ejercieron ningún control del hongo. Algunos ejemplos de microorganismos antagonistas utilizados exitosamente para controlar enfermedades en postcosecha son: *B. subtilis* contra *Alternaria citri* (Fr.) Keisll en naranja (Gutter y Litaver, 1953), *Monilia fruticola* (Winter) en durazno y chabacano (Pusey y Wilson, 1984), *Rhizopus* spp. en nectarina y ciruelo (Pusey *et al.*, 1986), y *C. gloeosporioides* en mango (Spalding, 1986). *Pseudomona syringae* restringió a *B. cinerea* y a *Penicillium expansum* Link en pera (Janisiewicz y Criof, 1992); *Trichoderma viridae* Pers. inhibió a *B. cinerea* y *P. expansum* en manzana (Schiels y Atwell, 1963); *Enterobacter cloacae* controló a *R. stolonifer* en durazno (Wisniewsky *et al.*, 1989).

Otros microorganismos que fueron exitosos para el control biológico de enfermedades postcosecha sobre diferentes especies frutales han sido *T. viride*, *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp. (Papavizas, 1985; Khetmalas *et al.*, 1984; Dennis, 1971).

### **3.12 Control de *Colletotrichum* sp. con extractos vegetales**

Una de las alternativas que se han estudiado con resultados prometedores, se basa en el hecho que las plantas elaboran metabolitos secundarios, con la finalidad de disminuir el ataque de parásitos y depredadores naturales. Estos compuestos se caracterizan por ser inocuos para el humano y se consideran como “fungicidas naturales” (Hopkins, 1999).

Así, por ejemplo, tenemos que aceites esenciales de diversas especies de plantas tienen propiedades antimicrobiales, afectando el desarrollo de hongos tanto *in vitro* como *in vivo* de productos hortícolas (Molina *et al.* 2010). Una de estas especies es *Thymus vulgaris* L. (Lamiales: lamiaceae), comúnmente conocida como tomillo, cuyo aceite esencial tiene actividad antibacteriana y antifúngica sobre varios microorganismos patógenos (Hammer *et al.*, 1999; Vanneste y Boyd, 2002; Rassooli y Mirmostafa, 2003; Yang y Clausen, 2007). Molina *et al.* (2010) encontró que este aceite a 0.15% y aceite esencial de limón mexicano a 0.14% redujeron la enfermedad en un 50%, comparado con el testigo que presentó 100% de infección cuando los frutos fueron inoculados después de la aplicación del tratamiento.

Extractos de eucalipto y cocoite (*Gliricidia sepium* Jacq. Kunth ex Walp.) fueron probados exitosamente contra *Colletotrichum* spp. y *R. solani* (Ramírez-Espinoza *et al.*, 1994; Rodríguez-Caballero y Velandia-Jiménez, 1992; Tansey y Appleton, 1975; Loaiza y Rivera, 2000).

Uno de los compuestos azufrados ampliamente estudiados son los sulfuros orgánicos, los cuales se encuentran ampliamente distribuidos en las especies de *Allium*. En el caso del ajo, el sabor se debe a la presencia de estos compuestos. Ellos son inmediatamente reconocidos por su olor pungente y sus propiedades lacrimógenas. Probablemente se encuentran en los tejidos intactos como aminoácidos sulfurados. Entre ellos se puede mencionar a la Aliína y Alicina. Este último ha sido aislado en estado puro como un líquido incoloro que contiene aproximadamente un 40% de azufre en su molécula. Se ha demostrado también su actividad antibacteriana y antifúngica (Cavallito y Bailey, 1994; Bianchi *et al.*, 1997; Montes *et al.*, 1990; Reyes, 1996; Baños, 2004).

Otras especies vegetales producen aceites esenciales los cuales juegan un papel importante en la introducción de los mecanismos de defensa del hospedero contra fitopatógenos (Mihaliak, *et al.*, 1991). Se ha demostrado que los aceites esenciales y sus compuestos tienen un efecto fungicida (Wilson, *et al.*, 1997; Gogoi *et al.*, 1997; Pitarokili *et al.*, 1999; Meepagala *et al.*, 2002), son inocuos para el medio ambiente y para los consumidores, sin embargo son efectivos para el control de enfermedades postcosecha.

El aceite esencial de limón (*C. lemon*) contiene diversos compuestos, entre ellos el Citral y el Limoneno, compuestos que pertenecen a la familia de los terpenos y ha demostrado que tienen actividad fungitóxica (Misra *et al.*, 1988).

En un estudio *in vitro* en donde se empleó extracto de ajo (*Allium sativum*), se encontró que este tuvo un amplio espectro de acción contra los 14 hongos probados. Asimismo *C. gloeosporioides* ha sido controlado con extracto de ajo, manteniendo sanos hasta un 65.2% de frutos de aguacate (Reyes, 1996). En estudios realizados por Baños *et al.*, (2004) se evidenció que extractos de ajo y eucalipto (*Eucalyptus globulus* Labill.) redujeron la severidad de la antracnosis en frutos de papaya en un 45 y 41.7% respectivamente. Bianchi *et al.*, (1997) observaron que los extractos de bulbo de ajo inhibieron en un 80% el crecimiento micelial de *C. lindemuthianum*. Los extractos de hojas de limón y papaya han sido utilizados para el control de otros hongos postcosecha, como son *Fusarium* spp., *Alternaria* spp., *Pestalotiopsis* spp. y *Rhizopus* spp. Por ejemplo Bautista *et al.* (2002) observó que el extracto de hoja de limón (*C. lemon*) inhibió completamente el desarrollo de *C. gloeosporioides in vitro* mientras que el extracto de hoja de *C. papaya* inhibió completamente las pudriciones en fruto de papaya. En Colombia se evaluó el efecto fungicida de *C. papaya* sobre *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, utilizando como adherente el aceite de ricino, los autores encontraron que hubo respuestas de sensibilidad al hongo (Marín *et al.*, 2006). Otro cítrico utilizado para el control de *C. gloeosporioides* fue toronja, del cual se emplearon las semillas, demostrándose una reducción significativa de la infección en *P. mollissima* (Cáceres *et al.*, 1998). Otros estudios han mostrado que *C. lemon* tiene efecto contra patógenos de frutas (Montes *et al.*, 1990).

La canela ha sido otras de las especies vegetales comprobadas con efecto antimicrobial (Alzamora *et al.*, 2003; Burt, 2004; Penalver *et al.*, 2005; Rodríguez *et al.*, 2008; Goñi *et al.*, 2009). Nikos (2007) encontró que frutos de tomate tratados con vapor de aceite de canela mantuvieron su firmeza durante la exposición, además los niveles de sólidos solubles totales fueron estimulados. El mismo autor (2009) encontró que el aceite de canela logró reducir el desarrollo de colonias de *C. coccodes*, *B. cinerea*, *Cladosporium herbarum* Pers., *R. stolonifer* y *Aspergillus niger*. La germinación conidial y el crecimiento micelial

también fueron inhibidos completamente usando extracto de la misma especie sobre *C. musae*, *Fusarium* sp. y *Lasiodiplodia theobromae* Pat. Griffon y Maubl. (Kyu *et al.*, 2007).

Ha sido documentado ampliamente el uso de extractos vegetales para el control de enfermedades postcosecha; sin embargo, la metodología empleada para la extracción de éstos resulta costosa y complicada, por lo cual el presente trabajo pretende mostrar metodologías más sencillas y accesibles a los productores, principalmente para los empaques, donde el uso de extractos vegetales sería más adecuado para disminuir el daño causado por *C. gloeosporioides*. Debido a que el uso de un producto contra este hongo se da en grandes cantidades en los empaques, es necesaria la sencillez en la metodología para la extracción de los extractos vegetales, lo que conllevaría a la adopción de la misma.

Es necesario continuar con la investigación en cuanto a este tema se refiere, debido a que aún se desconoce el efecto que otros extractos vegetales pudieran tener sobre el desarrollo del hongo en estudio; asimismo, es de interés conocer los diferentes metabolitos secundarios involucrados en el efecto antimicrobial, así como la posible mezcla con algún otro compuesto, y que tuviera un mayor efecto contra éste u otros microorganismos fitopatógenos.

*Trichoderma* spp. es comúnmente usado en el control de enfermedades, principalmente de suelo; sin embargo, poco conocimiento se tiene respecto al control de enfermedades que se presentan durante la postcosecha, por ello se evalúa el efecto tanto *in vitro* como *in vivo* de cinco cepas de este género sobre frutos de papaya. Muchos otros antagonistas pueden ser empleados sobre éste tipo de enfermedades de los frutos postcosecha, por lo cual se recomienda continuar con los estudios necesarios y pertinentes.

## 4. Capítulo II. Potencial antifúngico en postcosecha de seis extractos vegetales sobre *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya (*Carica papaya*)

### 4.1 Resumen

La actividad antifúngica de seis extractos vegetales fue evaluada *in vitro* e *in vivo* para controlar la antracnosis postcosecha en papaya. Extractos de ajo (*Allium sativum*) (concentraciones de 10 y 15 %) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*) (0,0050; 0,0100; 0,0150 %) suprimieron el crecimiento micelial (100 %), inhibieron la germinación (100 %) y la esporulación del hongo (100 %). El extracto de canela a dosis de 0,0054 % aplicada antes y al momento de la inoculación con *C. gloeosporioides* fue la dosis óptima para el control de la severidad (canela 97.22% de efectividad respecto al testigo absoluto) de la antracnosis en frutos de papaya artificialmente inoculados, a mayores dosis la severidad aumentó. La fitotoxicidad (Cambio de color en los frutos) fue mayor al aumentar las dosis (0,012 y 0.030%) de extracto de canela, encontrándose diferencia estadística significativa con los testigos absoluto y químico, las dosis de ajo no mostraron diferencias estadísticas significativas respecto al testigo absoluto. El extracto de canela mostró un efecto inhibitorio de *Colletotrichum gloeosporioides* cuando es aplicado en forma preventiva.

**Palabras claves:** ajo, canela, crecimiento micelial, fungicidas, *in vitro* e *in vivo*, limón, neem.

### 4.2 Abstract

Antifungal activity of six plant extracts was evaluated *in vitro* and *in vivo* for the control of postharvest anthracnose of papaya. Garlic (10 and 15% concentrated) and Cinnamon (0,0050, 0,0100, 0,0150 %) extracts suppressed *C. gloeosporioides* mycelial growth (100%), inhibited the spore germination (100%) and sporulation (100%). Cinnamon (*Cinnamomum zeylanicum*) extracts (0,0054%) applied before and at the same time of the inoculation of *C. gloeosporioides*, represent optimal doses to control anthracnose severity (cinnamon 97.22% effectiveness compared to absolute control) of the papaya fruit anthracnose artificially inoculated. However, phytotoxicity (color change of fruits) was greater increasing doses of cinnamon extract (0.0120 y 0.030%), showing statistically

significant difference with absolute and chemical control. Garlic doses showed no statistically significant difference compared with absolute control. The cinnamon extract showed an inhibitory effect of *Colletotrichum gloeosporioides* when applied preventively.

**Key words:** cinnamon, fungal growth, fungicides, garlic, *in vitro* and *in vivo*, lemon, neem.

### 4.3 Introducción

El fruto de papaya (*Carica papaya*) es muy susceptible a diversas enfermedades postcosecha por hongos como son *Cladosporium* sp, *Fusarium* sp., *Alternaria* sp. *Rhizopus* sp. (Cappellini, 1988; Vásquez-López *et al.*, 2012), *Phomopsis* sp., *Botriodiplodia* y *C. gloeosporioides*, este último es el más importante al causar pérdidas del 1 % hasta un 93 % (Paul *et al.*, 1997).

El control de la antracnosis se logra con fungicidas (Benomilo y Tiabendazol) (Sanders *et al.*, 2000; Tavares y de Souza, 2005; Liberato y Tatagiba, 2001). El uso continuo de estos compuestos trae consigo el desarrollo de resistencia en algunos hongos, por lo que su efectividad disminuye o se anula, tal es el caso de Benomilo (Liberato y Tatagiba, 2001) y Tiabendazol (Gutiérrez-Alonso, J. G. *et al.*, 2003; Gutiérrez-Alonso, O. y Gutiérrez-Alonso, J. G. 2003). Además, el uso de estos agentes en postcosecha se ha visto restringido debido a la posibilidad de que los humanos estén sometidos a una exposición directa a estos compuestos químicos y a los riesgos que esto implica (Tripathi y Dubey, 2004). Por otro lado, el consumo de frutas frescas se ha incrementado debido a la gran cantidad de nutrimentos que ayudan a mantener la salud humana (Spadaro y Gullino, 2004), por lo anterior es necesario contar con alternativas que reduzcan el uso de los fungicidas que se aplican a las frutas en postcosecha.

Las alternativas de control para *C. gloeosporioides* y otras especies son variadas. Las principales son el uso de aire caliente (Coates *et al.*, 1993), tratamientos hidrotérmicos (Prusky *et al.*, 1999), atmósferas modificadas (Karabulut y Baykal, 2004), luz ultravioleta (Stevens *et al.*, 1997), microorganismos como agentes de control biológico (Janisiewicz y Korsten, 2002; Spadaro y Gullino, 2004) y extractos de plantas (Bautista-Baños *et al.*, 2003).

Una de las alternativas prometedoras son las plantas que elaboran metabolitos secundarios, actúan como “fungicidas naturales” y son inocuos al humano (Hopkins, 1999).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de extractos vegetales para el control de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya en postcosecha.

#### **4.4 Materiales y métodos**

##### **4.4.1 Origen de aislamientos**

Frutos de papaya (*Carica papaya*) en etapa de madurez de consumo, uniformes en apariencia y tamaño, con síntomas típicos de “antracnosis” provenientes de Oaxaca y Veracruz fueron seleccionados en la Central de Abasto de la Ciudad de México. Los frutos fueron procesados para la obtención de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* en el laboratorio de enfermedades de frutos en postcosecha.

##### **4.4.2 Identificación y prueba de patogenicidad de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides***

Fragmentos de 5 x 5 mm, con 20% de tejido infectado y 80% de tejido sano se sembraron en 50 cajas de Petri con Papa Dextrosa Agar (PDA) y se incubaron a temperatura ambiental ( $26 \pm 2$  °C) durante 10 días. Una porción de micelio se transfirió a otra caja de Petri con PDA para purificar las cepas. Confirmada morfológicamente la identidad de *C. gloeosporioides* (Sutton 1992) se obtuvieron siete cepas plurispóricas (PVC16, PVC20, PVC28, PVC36, OC5, OC8 y OC14). Además del uso de claves morfológicas, la identificación del patógeno se confirmó mediante análisis moleculares. El método de extracción de ADN se adecuó de acuerdo a lo descrito por Doyle y Doyle (1990). Para la amplificación de la extracción por PCR las regiones ITS-5.8s fueron amplificadas con los iniciadores universales ITS2 e ITS5. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de reacción de 25µL. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador C-1000 Touch (BIO-RAD, Hercules, CA, EU) con el siguiente programa: 4 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 2 min a 52 °C y 1 min a 72 °C, y por último 10 min a 70 °C. Los productos de PCR obtenidos se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1%



teñido con bromuro de etidio (0.2 µg/µL). Los resultados observados se documentaron a través de fotografías para posteriormente ser analizados. La secuenciación del ADN se realizó con dos iniciadores (ITS2 e ITS5) en ambas direcciones para asegurarse de que no había lectura errónea. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y ambiental (LAMBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT). Las secuencias se compararon contra las que están en la base de datos GenBank (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA).

La patogenicidad de los aislamientos se verificó en frutos sanos de papaya, inoculados en heridas de 2mm de diámetro por 2 mm de profundidad causadas con un palillo de madera esterilizado, se les agregaron 20 µL de esporas del patógeno a una concentración de  $1 \times 10^6$  esporas/mL, lo anterior para reproducir la sintomatología y reaislar el hongo, con el fin de corroborar la patogenicidad de *C. gloeosporioides*. A los frutos testigo se les colocó PDA sin el hongo.

#### **4.4.3 Obtención de extractos vegetales crudos**

Las hojas y frutos de limón mexicano procedieron de Tecomán, Colima, el ajo y la corteza de canela se obtuvieron de un mercado, en Texcoco, México. El polvo de Neem fue proporcionado por el laboratorio de Insecticidas Vegetales del Colegio de Postgraduados.

##### **4.4.3.1 Extracto de ajo (*Allium sativum*)**

Semillas de ajo (600 g) se colocaron en 600 mL de etanol al 99 %. Se molió hasta que estuvo totalmente licuado, se permitió un reposo de 24 horas, y se filtró a través de un paño de tela previamente esterilizado. Posteriormente se concentró bajo flama directa hasta que todo el etanol fue evaporado (6 horas). El extracto así obtenido se resuspendió en 200 mL de agua destilada estéril (Wagner y Bladt, 1996). Este se conservó en refrigeración a 10°C, dentro de un frasco ámbar de vidrio.

#### **4.4.3.2 Extracto de semillas, hojas y cáscara de limón (*Citrus aurantifolia*)**

Semillas de limón (30g) fueron lavadas con agua corriente para eliminar las impurezas y residuos, después fueron maceradas y colocadas en un frasco de vidrio; se agregó éter de petróleo hasta cubrirlas, y se dejó en reposo durante tres días. El extracto fue filtrado, se dejó evaporar el solvente manteniéndolo bajo agitación; el extracto seco se resuspendió en 250 mL de agua con 15 gotas de Tween 20. Este fue el extracto al 100%, el cual se conservó en refrigeración a 10 °C para su posterior uso (Manici *et al.*, 1997). Para los extractos de cáscara (365 g) y hojas de limón (200 g) se repitió todo el procedimiento a excepción de la maceración.

#### **4.4.3.3 Extracto de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)**

Una mezcla de 50 g de corteza de canela con 200 mL de agua destilada se calentó a 100 °C por 2 h. El aceite esencial de la fase acuosa se extrajo con 200 mL de éter de petróleo, aplicado este proceso tres veces y se concentró a temperatura ambiental (26 ± 2 °C). El extracto volátil se mantuvo a 10 °C hasta su uso en los bioensayos (Wang *et al.*, 2009).

#### **4.4.3.4 Extracto de neem (*Azadirachta indica*)**

Polvo de semilla de neem se colocó en un frasco con 600 mL de metanol y se dejó en reposo durante 48 h. La mezcla se filtró con un paño de algodón esterilizado. El filtrado se concentró por agitación a temperatura ambiental (26 ± 2 °C). La mezcla se homogenizó con agua destilada estéril y 15 gotas de Tween 20®, este fue el extracto al 100% (Kosma *et al.*, 2011).

#### **4.4.4 Control *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides* con extractos vegetales**

Cien mL de PDA se mezclaron antes de su solidificación con cada una de las concentraciones de los extractos vegetales (Cuadro 1) y se vaciaron en cajas de Petri. Un disco de 5 mm de diámetro de PDA con micelio de cada una de las cepas de *C. gloeosporioides* se colocó en el centro de cada caja. Cada uno de los tratamientos tuvo tres repeticiones (Cuadro 1). El testigo químico fue Imazalil a 500 ppm.

**Cuadro 1** Extractos vegetales probados para el control *in vitro* de *C. gloeosporioides* en papaya en postcosecha.

Tratamiento	Especie vegetal	Órgano	Concentración (%)
1	<i>Allium sativum</i>	Semilla	5
2		Semilla	10
3		Semilla	15
4	<i>Citrus aurantifolia</i>	Semilla	5
5		Semilla	10
6		Semilla	15
7		Hoja	5
8		Hoja	10
9		Hoja	15
10		Cáscara	5
11		Cáscara	10
12		Cáscara	15
13	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Corteza	0,0005
14		Corteza	0,0015
15		Corteza	0,0025
16		Corteza	0,0050
17		Corteza	0,0100
18		Corteza	0,0150
19	<i>Azadirachta indica</i>	Semilla	0,0300
20		Semilla	0,0624
21		Semilla	0,1200
22	Testigo absoluto (solo PDA)	-	0
23	Testigo químico (PDA + Imazalil)	-	500 ppm

#### **4.4.4.1 Crecimiento micelial radial**

El diámetro ecuatorial del hongo se midió cada 24 h con un vernier digital hasta que el testigo absoluto cubrió la caja de Petri.

#### **4.4.4.2 Germinación de esporas**

Para determinar el efecto de los extractos sobre la germinación de esporas se utilizaron recipientes translúcidos de 300  $\mu\text{L}$  a los que se les agregaron 150  $\mu\text{L}$  de medio de cultivo PDA. Antes de que el PDA solidificara se mezcló con los extractos vegetales hasta lograr la homogenización de cada concentración (Cuadro 1). Posteriormente se colocaron 20  $\mu\text{L}$  de una suspensión de  $1 \times 10^6$  esporas por mL (20,000 esporas). Se evaluó la germinación a las 5, 10 y 15 h (datos son adimensionales, ya que fueron obtenidos del análisis del área bajo la curva del progreso del porcentaje de germinación) empleando un microscopio compuesto American Optical Microstar Microscope Model 1130 (Gutiérrez-Alonso, 2001). Una espora fue considerada germinada cuando el largo de su tubo germinativo alcanzó la mitad del diámetro de la espora (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003).

#### **4.4.4.3 Esporulación**

La concentración de conidios se determinó a los 10 días cuando se logró la máxima esporulación. Cada caja de Petri fue enjuagada con agua destilada estéril, la superficie fue raspada con una varilla de vidrio y filtrada a través de una malla de algodón estéril. Alícuotas de 0,5 mL de cada caja fueron transferidas a una cámara de Neubauer para contar los conidios.

#### **4.4.5 Control de *Colletotrichum gloeosporioides in vivo* en frutos de papaya con extractos vegetales**

Frutos sanos de papaya Maradol provenientes de Oaxaca, México se inocularon con la cepa OC14 que resultó ser la más patogénica (de acuerdo a una prueba de patogenicidad) del resto de las cepas. Se seleccionaron frutos de papayas con características similares de madurez y desinfestación.

#### **4.4.5.1 Desinfestación del fruto.**

Cada fruto fue desinfestado con hipoclorito de sodio al 2 % durante 3 minutos, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron a temperatura ambiental sobre papel secante. De manera paralela se preparó una suspensión de esporas de *C. gloeosporioides* a concentración de  $1 \times 10^6$  conidios/mL, y extractos de canela a 0,00264; 0,0054; 0,012; 0,020 y 0,030 % y ajo a 5,87; 11,74; 17,61; 23,48 y 29,35 %.

Las concentraciones de extractos de canela fueron asperjadas sobre 15 frutos (cinco concentraciones con tres repeticiones) 24 h antes de la inoculación con *C. gloeosporioides*, al mismo tiempo que la inoculación y 24 horas después de la inoculación, tres bloques fueron formados con 15 frutos cada uno para un total de 15 tratamientos, se incluyó un testigo químico (Imazalil) y uno absoluto (agua destilada estéril). Para los extractos de ajo se realizó el mismo procedimiento, sin la variación de los tiempos, presentándose un solo bloque con 15 frutos.

La inoculación de los frutos se realizó haciendo heridas de 2 mm de profundidad con palillos de madera estéril, sobre dicha herida se colocó con micropipeta 20  $\mu$ L de  $1 \times 10^6$  conidios/mL. El efecto de los extractos se comparó con el efecto del fungicida comercial (Imazalil). Los frutos fueron colocaron en cámara a temperatura de  $26 \pm 2$  °C. La severidad y fitotoxicidad fueron medidas cada 24 h.

#### **4.4.5.2 Severidad**

El diámetro de la lesión característica de antracnosis derivada de la inoculación se midió diariamente.

#### **4.4.5.3 Fitotoxicidad**

Los cambios de color en los frutos tratados con extractos vegetales en relación con los testigos se evaluaron con imágenes digitales con una cámara Kodak EasyShare Z712 IS de 7,1 megapíxeles (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). Las fotografías de 1024 x 768 píxeles a distancia de 1 metro se iluminaron con una lámpara fluorescente de 20 w. El ángulo entre la lente de la cámara y la fuente de la iluminación fue de aproximadamente 45°. La apertura del diafragma utilizada fue f/2,8 y la velocidad del obturador de 1/30 s

manteniendo estos parámetros constantes. Las imágenes se guardaron en formato JPEG. Las medias de RGB (red, green, blue) que conforman el color real del fruto de papaya, se analizaron estadísticamente mediante el software Adobe® Photoshop® CS5 versión 12.0.4 (Adobe System Incorporated, San José, California, USA). Los valores más cercanos a los del testigo absoluto corresponden a la coloración exigida en los mercados para la especie y variedad (Lúquez-Bibiloni y Aguilera-Radic, 2005).

#### **4.4.6 Análisis estadístico**

Los datos se sometieron a pruebas de normalidad (Shapiro Wilk) y homostacidad (Barret), aquellos que no cumplieron con estos supuestos (esporulación) fueron transformados mediante la fórmula  $x = y^{1/2}$ ; donde  $x$  = dato transformado,  $y$  = concentración de esporas. Para facilitar la interpretación de los resultados estos se mostraron como valores sin transformar. Los análisis de varianza y pruebas de separación múltiple de medias (Tukey,  $\alpha = 0,05$ ) así como el análisis de regresión lineal para determinar la concentración (*in vitro*) y dosis (*in vivo*) letal 50 (CL<sub>50</sub>) se hicieron con la ayuda del comando Solver de Microsoft® Office Excel, versión 2007 (Microsoft® Corporation, Redmond, WA, USA. La curva del progreso de la enfermedad se calculó por medio del método de los polígonos, y las áreas resultantes fueron sometidas a análisis de varianza y a pruebas de separación de medias mediante el programa Statistical Analysis System, versión 9 para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

### **4.5 Resultados y discusión**

#### **4.5.1 Pruebas *in vitro***

##### **4.5.1.1 Efecto de los extractos de ajo y limón mexicano**

Entre las cepas de Veracruz y de Oaxaca se observaron diferencias estadísticas altamente significativas entre los aislamientos tratados con extracto de ajo ( $p < 0,0001$ ), y a excepción del tratamiento al 5 % en todos los demás no hubo desarrollo de micelio. Los tratamientos en donde se utilizaron los extractos con algún órgano o parte de limón también presentaron diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,0001$ ), pero hubo desarrollo del hongo; en general, las concentraciones más altas correspondieron con un menor

crecimiento micelial para estos extractos (Cuadro 3-5). El ajo en concentraciones de 10 y 15 % igualó el efecto del testigo químico en la concentración utilizada (500 ppm). La CL<sub>50</sub> más baja (2,37 %) correspondió al ajo, mientras que la más alta (18,4 %) fue para los tratamientos con hoja de limón. En los tratamientos con extracto de semilla de limón no se pudo determinar la DL<sub>50</sub> por no mostrar diferencia estadística significativa ( $p > 0,05$ ).

**Cuadro 2** Evaluación para crecimiento micelial (C.M.), germinación (GERM) y esporulación (ESPOR) de *C. gloeosporioides* al aplicar extracto de ajo para su control.

PARÁMETROS VERACRUZ	AJO		
	C. M.*	GERM*	ESPOR (MEDIA DEL NO. DE ESPORAS)
5%	105,991 <sup>b</sup>	16,234 <sup>b</sup>	6,002 <sup>a</sup>
10%	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
15%	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>
IMAZALIL (500 ppm)	0 <sup>d</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>
TESTIGO ABSOLUTO	338,43 <sup>a</sup>	120,14 <sup>a</sup>	9,296 <sup>a</sup>
<i>p</i> -valor	<.0001	<.0001	<.0001
R <sup>2</sup>	0,99	0,95	0,82
DL50	2,37		
OAXACA			
5%	100,088 <sup>b</sup>	12,167 <sup>b</sup>	1,5155 <sup>b</sup>
10%	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
15%	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
IMAZALIL (500 ppm)	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>
TESTIGO ABSOLUTO	357,898 <sup>a</sup>	114,583 <sup>a</sup>	8,1150 <sup>a</sup>
<i>p</i> -valor	<.0001	<.0001	<.0001
R <sup>2</sup>	0,99	0,97	0,79
DL50	5,87		

\*Valores expresados son adimensionales, debido a que son el resultado de un análisis del área bajo la curva.

†Letras iguales en la misma columna significa que no hay diferencias estadísticas significativas (Tukey>0.05)

Baños-Guevara *et al.* (2004) realizó un estudio similar, en donde se emplearon 17 diferentes extractos vegetales, dentro de ellos de ajo, con el cual se mostró una inhibición

del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* de 54,34 %, seguido por la hierba santa con un 48,82 %.

**Cuadro 3** Evaluación para crecimiento micelial (C.M.), germinación (GERM) y esporulación (ESPOR) de *C. gloeosporioides* al aplicar extracto de cáscara de limón para su control.

PARÁMETROS	CÁSCARA DE LIMÓN		
	VERACRUZ	C. M.*	GERM*
5%	295,5 <sup>b</sup>	58,313 <sup>b</sup>	9,759 <sup>a</sup>
10%	198,44 <sup>c</sup>	34,667 <sup>c</sup>	10,698 <sup>a</sup>
15%	150,06 <sup>d</sup>	14,563 <sup>d</sup>	8,710 <sup>a</sup>
IMAZALIL (500 ppm)	0 <sup>e</sup>	0 <sup>e</sup>	0 <sup>b</sup>
TESTIGO ABSOLUTO	450,69 <sup>a</sup>	139,889 <sup>a</sup>	9,590 <sup>a</sup>
<i>p</i> -valor	<.0001	<.0001	0,8015
R <sup>2</sup>	0,95	0,99	0,68
DL50	16,34		
OAXACA			
5%	206,209 <sup>b</sup>	22,250 <sup>b</sup>	135,34 <sup>ba</sup>
10%	149,804 <sup>c</sup>	18,500 <sup>b</sup>	172,28 <sup>a</sup>
15%	96,633 <sup>d</sup>	3,583 <sup>c</sup>	84,06 <sup>b</sup>
IMAZALIL (500 ppm)	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>b</sup>
TESTIGO ABSOLUTO	299,637 <sup>a</sup>	119,208 <sup>a</sup>	184,50 <sup>a</sup>
<i>p</i> -valor	<.0001	<.0001	0,016
R <sup>2</sup>	0,97	0,99	0,35
DL50	10,649		

\*Valores expresados son adimensionales, debido a que son el resultado de un análisis del área bajo la curva.

†Letras iguales en la misma columna significa que no hay diferencias estadísticas significativas (Tukey>0.05)

Bosquez-Molina *et al.* (2010) realizaron un estudio con extracto de tomillo y limón mexicano sobre *C. gloeosporioides* y *R. stolonifer* en papaya, logrando los mejores resultados con el primero, ya que a una concentración de 0,06 % no se presentó crecimiento micelial, mientras que con aceite de limón mexicano se requirió de 0,085 % para lograr el mismo resultado. En el presente trabajo aún a la mayor concentración (15 %)



no se logró inhibir completamente el crecimiento de micelio, obteniéndose una  $CL_{50}$  de 16,34 %.

Los aislamientos de *C. gloeosporioides* provenientes de los estados de Veracruz y Oaxaca mostraron valores de germinación diferentes en función de las concentraciones evaluadas; en las de 10 y 15 % el extracto de ajo inhibió por completo la germinación de las esporas, seguida en efectividad por 5 % para el mismo extracto ( $p < 0,0001$ ). En el extracto de cáscara de limón las concentraciones mayores correspondieron con una menor germinación (Cuadro 2 y 3).

La esporulación de los aislamientos mostró diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,0001$ ) entre tratamientos para las diferentes concentraciones del extracto de ajo. La esporulación se inhibió a concentraciones de 10 y 15 %. Para el caso del limón, las concentraciones de extractos de las distintas partes u órganos no produjeron un efecto significativo ( $p > 0,05$ ), a excepción del empleo de cáscara de limón donde se encontraron diferencias estadísticas altamente significativas para al crecimiento micelial y germinación (Cuadros 3-5). Hernández-Albíter *et al.* (2007) encontraron que con el extracto de *C. aurantifolia* la germinación (69 %) presentó diferencia estadística significativa en comparación con el control.

**Cuadro 4** Evaluación para crecimiento micelial (C.M.), germinación (GERM) y esporulación (ESPOR) de *C. gloeosporioides* al aplicar extracto de hoja de limón para su control.

PARÁMETROS	HOJA DE LIMÓN		
	VERACRUZ	C. M*	GERM*
5%	178,84 <sup>b</sup>	77,22 <sup>a</sup>	10,895 <sup>a</sup>
10%	125,52 <sup>c</sup>	74,39 <sup>a</sup>	8,162 <sup>a</sup>
15%	110,79 <sup>c</sup>	71,11 <sup>a</sup>	12,445 <sup>a</sup>
IMAZALIL (500 ppm)	0 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
TESTIGO ABSOLUTO	250,22 <sup>a</sup>	47,78 <sup>a</sup>	6,187 <sup>a</sup>
<i>p</i> -valor	<.0001	0,2683	0,5577
R <sup>2</sup>	0,88	0,37	0,246
DL50	15,06		
OAXACA			
5%	193,564 <sup>b</sup>	47,583 <sup>bc</sup>	8,941 <sup>a</sup>
10%	156,781 <sup>c</sup>	57,37 <sup>ba</sup>	10,695 <sup>a</sup>
15%	128,398 <sup>d</sup>	35,08 <sup>c</sup>	9,002 <sup>a</sup>
IMAZALIL (500 ppm)	0 <sup>e</sup>	0 <sup>d</sup>	0 <sup>b</sup>
TESTIGO ABSOLUTO	240,686 <sup>a</sup>	75,29 <sup>a</sup>	12,47 <sup>a</sup>
<i>p</i> - valor	<.0001	<.0001	0,07
R <sup>2</sup>	0,9	0,86	0,62
DL50	18,4		

\*Valores expresados son adimensionales, debido a que son el resultado de un análisis del área bajo la curva.

†Letras iguales en la misma columna significa que no hay diferencias estadísticas significativas (Tukey>0.05)

La actividad inhibitoria de compuestos de ajo ha sido ampliamente investigada. Benkeblia (2004), encontró que el ajo tiene un efecto inhibitorio antifúngico muy marcado a medida que se aumentan las concentraciones (50-500 mL/1000 mL) sobre *Penicillium cyclopium* Westling y *F. oxysporum*. Kyung *et al.* (2002) también informaron que la alicina, compuesto azufrado del extracto de ajo mostró actividad antibacterial en contra de *Staphylococcus aureus* B33.

**Cuadro 5** Evaluación para crecimiento micelial (C.M.), germinación (GERM) y esporulación (ESPOR) de *C. gloeosporioides* al aplicar extracto de semilla de limón para su control.

PARÁMETROS	SEMILLA DE LIMÓN		
	VERACRUZ	C. M.*	GERM*
5%	228,44 <sup>a</sup>	107,33 <sup>a</sup>	8,459 <sup>a</sup>
10%	201,27 <sup>a</sup>	101,83 <sup>a</sup>	8,206 <sup>a</sup>
15%	204,32 <sup>a</sup>	66,28 <sup>a</sup>	8,704 <sup>a</sup>
IMAZALIL (500 ppm)	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
TESTIGO ABSOLUTO	230,52 <sup>a</sup>	91,94 <sup>a</sup>	10,155 <sup>a</sup>
<i>p</i> -valor	0,089	0,212	0,48
R <sup>2</sup>	0,28	0,33	0,41
DL50			
OAXACA			
5%	179,35 <sup>a</sup>	112,42 <sup>a</sup>	66,80 <sup>a</sup>
10%	185,38 <sup>a</sup>	134,38 <sup>a</sup>	97,78 <sup>a</sup>
15%	179,35 <sup>a</sup>	92,38 <sup>a</sup>	102,25 <sup>a</sup>
IMAZALIL (500 ppm)	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>	0 <sup>b</sup>
TESTIGO ABSOLUTO	202,77 <sup>a</sup>	150 <sup>a</sup>	113,03 <sup>a</sup>
<i>p</i> -valor	0,2	0,12	0,51
R <sup>2</sup>	0,19	0,48	0,25
DL50			

\*Valores expresados son adimensionales, debido a que son el resultado de un análisis del área bajo la curva.

<sup>†</sup>Letras iguales en la misma columna significa que no hay diferencias estadísticas significativas (Tukey>0.05)

#### 4.5.1.2 Efecto de extracto de canela

Para los tratamientos *in vitro* con canela, se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas ( $p < 0,0001$ ). No se observó crecimiento del hongo en las concentraciones desde 0,0050 hasta 0,0150 %, igualando lo anterior al testigo químico; la concentración de 0,0005 % presentó el mayor desarrollo. Caso similar fue para la variable esporulación, en donde la concentración de 0,0005 % mostró diferencia estadística significativa, obteniéndose el mayor valor de esporas, con concentraciones de 0.0050; 0,0100 y 0,0150 %

se obtuvieron los menores valores de esporas comparado con el testigo químico (Cuadro 6). Los resultados en un estudio realizado por Maqbool *et al.* (2011) fueron similares, al encontrarse que con la aplicación de aceite de canela a concentración de 0,4 % no se presentó crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* y *C. musae*, comparado con goma arábica y aceite de limoncillo (*Cymbopogon citratus* Stapf.). Por su parte, Maqbool *et al.* (2011) encontraron que la germinación de *C. gloeosporioides* fue inhibida en un 49,5% con aceite de canela al 0,4 %, mientras que cuando estuvo combinado con goma arábica la inhibición fue del 85 %. Este efecto inhibitorio puede estar relacionado con el componente Eugenol, que se encuentra en mayor porcentaje en esta especie (88,3 %) (Combrinck *et al.*, 2011). Por su parte, otro autor encontró este componente en un porcentaje de 74.92% (Tzortzakis, 2009). El cinamaldehido también es considerado como uno de los componentes de la canela con actividad antifúngica, por ejemplo Sivakumar *et al.* (2002) encontraron que este compuesto a 30 ppm inhibió la germinación conidial y el crecimiento micelial de *B. theobromae*, *C. gloeosporioides* y *Gliocephalotrichum microchlamydosporum* (J.A. Mey) B.J. Wiley y E.G. Simmons.

**Cuadro 6** Evaluación para crecimiento micelial, germinación y esporulación de la cepa más patogénica seleccionada de *C. gloeosporioides* (OC14) al aplicar extracto de canela para su control

Parámetros	Crecimiento micelial*	Germinación*	Esporulación (medias del número de conidios)**
0,0005 (%)	75,3183 <sup>b</sup>	10,45 <sup>b</sup>	6,87 <sup>b†</sup>
0,0015 (%)	62,1867 <sup>c</sup>	20,698 <sup>b</sup>	5,2234 <sup>c</sup>
0,0025 (%)	46,0050 <sup>d</sup>	0 <sup>c</sup>	5,768 <sup>d</sup>
0,0050 (%)	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>e</sup>
0,0100 (%)	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>e</sup>
0,0150 (%)	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>e</sup>
Imazalil (500 ppm)	0 <sup>e</sup>	0 <sup>c</sup>	0 <sup>e</sup>

<i>p</i> -valor	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,99	0,82	0,87
DL <sub>50</sub>	0.00264%		

\*Valores son adimensionales, ya que fueron obtenidos de un análisis de varianza del área bajo la curva.

\*\* Letras iguales en una misma columna indican que no hubo diferencias estadísticas significativas (Tukey > 0,05).

† Valores fueron transformados con la fórmula  $x = y^{1/2}$

#### 4.5.1.3 Efecto de extracto de semillas de neem

El extracto de neem resultó en diferencias estadísticas significativas ( $p < 0,0001$ ) con respecto a los controles. Cuando se empleó la concentración de 0,0300 % la germinación y el crecimiento micelial mostraron los valores más bajos comparado con las demás concentraciones, donde se obtuvieron valores mayores (Cuadro 7). Los resultados anteriores discreparon de los encontrados por Amadioha (2000), quien mencionó que extracto de semillas de neem inhibió el crecimiento del patógeno *Pyricularia oryzae* Cav. en medio de cultivo, reduciendo el crecimiento radial en un 83,6 %, siendo comparable a un testigo comercial (Carbendazim 0,1 %); también difirieron de los obtenidos por Niaz *et al.* (2008) y Wang *et al.* (2009); esta diferencia en los resultados podría atribuirse a los diferentes métodos de extracción. Por ejemplo, diferentes solventes usados para la extracción pueden resultar en diferentes niveles de actividad antifúngica *in vitro*, como también, los extractos crudos de distintas especies de plantas pueden exhibir diferentes niveles de actividad en contra de *C. gloeosporioides* (Bussaman *et al.*, 2012). Incluso extractos de semillas de neem recolectadas de distintas localidades pueden presentar diferentes propiedades antifúngicas (Niaz *et al.*, 2008).

**Cuadro 7** Evaluación para crecimiento micelial, germinación y esporulación de *C. gloeosporioides* al aplicar extracto de neem para su control.

Parámetros	Crecimiento micelial*	Germinación*	Esporulación (medias de números de conidios)
Veracruz			
0,0300 (%)	99,59 <sup>b</sup>	58,667 <sup>b**</sup>	9,65 a
0,0624 (%)	137,28 <sup>b</sup>	66,333 <sup>b</sup>	8,67 a
0,1200 (%)	124,26 <sup>b</sup>	56,333 <sup>b</sup>	8.02 a
Imazalil (500 ppm)	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 b
Testigo absoluto	218,45 <sup>a</sup>	134,333 <sup>a</sup>	9.34 a
<i>p</i> -valor	< 0,0001	< 0,0001	<0,0001
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,85	0,94	0.87
DL <sub>50</sub>	0,0996%		
Oaxaca			
0,0300 (%)	91,3 <sup>b</sup>	70,567 <sup>b</sup>	8.76 a
0,0624 (%)	112,4 <sup>b</sup>	66,54 <sup>b</sup>	9.84 a
0,1200 (%)	98,5 <sup>b</sup>	52,945 <sup>b</sup>	9.23 a
Imazalil (500 ppm)	0 <sup>c</sup>	0 <sup>c</sup>	0 b
Testigo absoluto	194,5 <sup>a</sup>	206,87 <sup>a</sup>	8.87a
<i>p</i> -valor	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,9	0,96	0.9
DL <sub>50</sub>	0,1005%		

\*Valores son adimensionales, ya que fueron obtenidos de un análisis de varianza del área bajo la curva.

\*\* Letras iguales en una misma columna indican que no hubo diferencias estadísticas significativas (Tukey > 0,05).

#### 4.5.2 Pruebas *in vivo*

Las pruebas *in vivo* para el extracto de ajo en relación a la severidad, no mostraron diferencias estadísticas entre tratamientos. Puede observarse que la diferencia solo se

mostró con Imazalil, siendo efectivo en contra de *C. gloeosporioides*, mientras que para los demás tratamientos se obtuvo un grupo homogéneo (Cuadro 8).

**Cuadro 8** Evaluación de la variable severidad de antracnosis al aplicar diferentes concentraciones de extracto de ajo para su control.

Extracto	Parámetros	Severidad* <sup>†</sup>
Ajo	5,87 (%)	55,85 <sup>a</sup>
	11,74 (%)	52,83 <sup>a</sup>
	17,61 (%)	57,41 <sup>a</sup>
	23,48 (%)	44,57 <sup>a</sup>
	29,35 (%)	51,85 <sup>a</sup>
	Imazalil	12,05 <sup>b</sup>
	Testigo absoluto	52,67 <sup>a</sup>
	<i>p</i> -valor	0,28
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,35	

\* Letras iguales en la misma columna indican que no hubo diferencias estadísticas significativas (Tukey > 0,05).

**Cuadro 9** Evaluación de la variable severidad de antracnosis al aplicar diferentes concentraciones de extracto de canela para su control.

Extracto	Parámetros	Severidad* <sup>†</sup>
Canela	T1 <sub>D26</sub>	16,119 <sup>fg</sup>
	T1 <sub>D54</sub>	12,386 <sup>g</sup>
	T1 <sub>D120</sub>	8,950 <sup>g</sup>
	T1 <sub>D200</sub>	14,359 <sup>fg</sup>
	T1 <sub>D300</sub>	20,598 <sup>fged</sup>
	T2 <sub>D26</sub>	40,161 <sup>bedc</sup>
	T2 <sub>D54</sub>	1,350 <sup>g</sup>
	T2 <sub>D120</sub>	18,893 <sup>fge</sup>
	T2 <sub>D200</sub>	47,131 <sup>bac</sup>

T2 <sub>D300</sub>	23,990 <sup>fgedc</sup>
T3 <sub>D26</sub>	40,451 <sup>bedc</sup>
T3 <sub>D54</sub>	41,094 <sup>bedc</sup>
T3 <sub>D120</sub>	41,403 <sup>bedc</sup>
T3 <sub>D200</sub>	43,904 <sup>bdc</sup>
T3 <sub>D300</sub>	67,989 <sup>a</sup>
Testigo químico	12.45 <sup>g</sup>
Testigo absoluto	48,555 <sup>ba</sup>
<i>p</i> -valor	< 0,0001
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,83

†Valores son adimensionales, ya que fueron obtenidos de un análisis de varianza del área bajo la curva  
T1 = aplicación de canela 24 h antes de la inoculación de esporas de *C. gloeosporioides*. T2 = aplicación de canela e inoculación de esporas de *C. gloeosporioides* al mismo tiempo. T3 = aplicación de canela 24 h después de la inoculación de esporas *C. gloeosporioides*.

De manera contrastante al comportamiento *in vitro*, las dosis más altas de extracto de ajo no mostraron un mayor control sobre *C. gloeosporioides*. Lo anterior podría deberse a un posible fenómeno de toxicidad en el fruto que tendría como consecuencia el incremento de la severidad de la enfermedad, lo cual es consistente con el trabajo de Zoffoli *et al.* (2008), que señalan la aparición de un desorden en frutos de uva tratados con compuestos azufrados. En los frutos de ajo se han encontrado compuestos que contienen azufre (Ichikawa *et al.*, 2006), por lo cual es posible que estos causen eventualmente alguna fitotoxicidad a dosis elevadas. Sin embargo, dicho fenómeno no se manifestó en el color del fruto (Cuadro 9), ni se ha señalado en la producción de gas etileno, maduración o firmeza que se han publicado en trabajos similares (Baños-Guevara *et al.*, 2004), por lo cual es necesario estudiar los cambios bioquímicos que sufre el fruto después de la aplicación de extractos de ajo.



**Cuadro 10** Evaluación de la variable fitotoxicidad a los extractos de ajo y canela aplicados para el control de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya en postcosecha.

Extracto	Parámetros	Media de RGB* <sup>†</sup>
Ajo	5,87 (%)	43,80 <sup>a</sup>
	11,74 (%)	88,49 <sup>a</sup>
	17,61 (%)	89,10 <sup>a</sup>
	23,48 (%)	75,15 <sup>a</sup>
	29,35 (%)	80,80 <sup>a</sup>
	Imazalil	84,50 <sup>a</sup>
	Testigo absoluto	93,35 <sup>a</sup>
	<i>p</i> -valor	0,3378
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,44	
Canela	0,00264 (%)	138,788 <sup>a</sup>
	0,0054 (%)	137,284 <sup>a</sup>
	0,012 (%)	128,879 <sup>c</sup>
	0,020 (%)	132,281 <sup>bc</sup>
	0,030 (%)	111,903 <sup>c</sup>
	Imazalil	133,450 <sup>ba</sup>
	Testigo absoluto	134,287 <sup>ba</sup>
	<i>p</i> -valor	< 0,0001
<i>R</i> <sup>2</sup>	0,80	

\*Letras iguales en superíndices indican que no hubo diferencias estadísticas significativas (Tukey > 0,05).

<sup>†</sup>Los valores más cercanos a los obtenidos para el testigo absoluto corresponden a la coloración normalmente exigida en los mercados para la especie y variedad, mientras que los más alejados podrían indicar fitotoxicidad.

Los datos de severidad en los frutos tratados con extractos de canela mostraron diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos ( $p < 0,0001$ ). El tiempo 1 muestra la menor severidad con todas las concentraciones, lo que indica que el extracto de canela inhibe el desarrollo del hongo, tal como sucedió en la prueba *in vitro*. El tiempo 2 con la dosis 0,0054 % (T<sub>2D54</sub>) mostró el menor promedio de severidad (aplicación de canela e inoculación de esporas de *C. gloeosporioides* al mismo tiempo) comparado con el resto de

los tratamientos, mientras que la media de severidad más grande fue para el tratamiento de tiempo 3 con una dosis de 0,030 %, superando al testigo absoluto (Cuadro 9, Figura 2).



**Figura 2.** Efecto de diferentes dosis y tiempos de aplicación de extracto de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) en la severidad de la antracnosis sobre frutos de papaya en postcosecha. A) Dosis 00264% tiempo1, B) Dosis 0054% tiempo 1, C) Dosis 0.0120% tiempo1, D) Dosis 0.0200% tiempo 1, E) Dosis 0.0300% tiempo 1, F) Dosis 00264% tiempo2, G) Dosis 0054% tiempo 1, H) Dosis 0.0120% tiempo2, I) Dosis 0.0200% tiempo 2, J) Dosis 0.0300% tiempo 2, K) Dosis 00264% tiempo 3, L) Dosis 0054% tiempo 3, M) Dosis 0.0120% tiempo 3, N) Dosis 0.0200% tiempo 3, O) Dosis 0.0300% tiempo 3, P) Testigo absoluto y Q) Testigo químico (Imazalil).

El fenómeno anterior indicó que la efectividad de los extractos de canela se incrementa si estos son aplicados de manera preventiva, antes de la llegada de las esporas a la superficie del fruto. La dosis de 0,020 y 0,030 % mostraron los valores de severidad más altos, y en estas mismas dosis también se pudo apreciar una alteración en los valores medios de RGB (Cuadro 10), lo cual indicó que esa dosis podría tener un efecto perjudicial sobre la fisiología del fruto ocasionando un incremento en la severidad de la enfermedad, lo que se vio soportado por las diferencias de color observadas en los frutos tratados con esas mismas dosis.

Maqbool *et al.* (2011) encontró diferentes efectos fungicidas al aplicar aceite de canela comparado con *Cymbopogon citratus*, goma arábica y sus combinaciones sobre *C. gloeosporioides* en papaya. Con canela a concentración de 0,4 % combinado con goma arábica 10 %, se obtuvo el más alto efecto fungicida, retardando la aparición de los síntomas además de que se mantuvo la calidad de los frutos durante el almacenamiento (13 °C, 80 % HR). Los síntomas se presentaron levemente después de mantenerse las papayas 5 días a temperatura 25 °C (60 % HR).

#### **4.6 Conclusiones**

Los extractos ensayados de ajo y canela mostraron efectividad en contra del patógeno en los ensayos *in vitro*. El extracto de ajo *in vivo* no mostró fitotoxicidad ni efectividad en contra de *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de papaya en postcosecha, mientras que el de canela tuvo una efectividad de 97.22% a una dosis de 0.0054%, superando al testigo químico; sin embargo, a dosis mayores a 0.0120% presenta fitotoxicidad.

## **5. Capítulo III. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* por *Trichoderma* spp. sobre frutos de papaya maradol en postcosecha.**

### **5.1 Resumen**

La papaya es uno de los principales frutales cultivados en el mundo, éste es afectado por diversos organismos postcosecha, entre ellos, el principal es *Colletotrichum gloeosporioides*. En el presente trabajo se evaluó la capacidad antagónica de 5 cepas de *Trichoderma* en contra de *C. gloeosporioides* mediante pruebas *in vitro* e *in vivo*. Todas las cepas provocaron una inhibición mayor al 50%, pero menor al 60%. La colonización mayor fue de un 87.45% por *Trichoderma longibrachiatum*. En pruebas para determinar el mecanismo de acción se observó micoparasitismo de las diferentes cepas sobre el patógeno; principalmente se observó a *Trichoderma harzianum* penetrando el micelio. La evaluación de la severidad mostró que fue la interacción de las cepas con los diferentes tiempos lo que influenció el tamaño de la lesión, notándose la mayor reducción (77.40%) cuando se inoculó *Trichoderma viride* 24 hrs antes que al patógeno. Las cepas antagonistas no causaron fitotoxicidad en los frutos de papaya.

**Palabras claves:** *in vitro*, *in vivo*, colonización, inhibición, fitotoxicidad.

### **5.2 Abstract**

Papaya is one of the main fruits grown in the world. It is affected by several postharvest microbes, including the main *Colletotrichum gloeosporioides*. In this study was evaluated the antagonistic capacity of five strains of *Trichoderma* against *Colletotrichum gloeosporioides*, affecting postharvest fruits of papaya, through *in vitro* and *in vivo* test. All strains caused an inhibition greater than 50%, but less than 60%. The largest colonization was 87.45% by *Trichoderma longibrachiatum*. In tests to determine the mechanism of action, mycoparasitism was observed by each of the strains on the pathogen, *Trichoderma harzianum* was mainly observed penetrating mycelium. Severity assessment showed that strain interaction at different time influenced the size of the lesion. Noticed the greatest

reduction (77.40%) when inoculated *Trichoderma viride* 24hr before the pathogen. Antagonistic strains caused no phytotoxicity on papaya fruits.

**Key words:** *in vitro*, *in vivo*, colonization, inhibition, fitotoxicity.

### 5.3 Introducción

Los pesticidas sintetizados químicamente se han utilizado con mucho éxito para el control de las enfermedades en las plantas; sin embargo, en años recientes la excesiva contaminación debido al uso extensivo de estos compuestos ha traído como consecuencia serios problemas ambientales y sociales (Wijesinghe *et al.*, 2011); a pesar de esto, los plaguicidas son necesarios para mantener la producción de alimentos considerando que la población en el mundo se incrementa a una tasa media de 1.1% cada año (Wang y Liu, 2007), este crecimiento demanda un aumento en la producción de los cultivos; sin embargo, la superficie de suelo destinada a estos es cada vez más limitada (Wijesinghe *et al.*, 2011). Para mantener la productividad, fue necesario producir en el año 2000, tres millones de toneladas de ingredientes activos (Tilman *et al.*, 2002). Brasil es el tercer consumidor más importante de plaguicidas a nivel mundial, tan solo en el año 2001 se aplicaron 300 millones de toneladas de productos formulados, ocupando el octavo lugar a nivel mundial en uso de plaguicidas por hectárea (Fairbanks, 2001). En este país se reportan oficialmente 5000 casos anualmente de envenenamiento por exposición a plaguicidas, siendo esta la primera causa de muertes por intoxicaciones (SINITOX, 2004). La falta de un sistema de regulación efectiva, deficiencias en el etiquetado de los productos, analfabetismo e insuficiente conocimiento acerca de los riesgos así como el alto costo de los equipos de protección son las causas de las altas tasas de exposición a pesticidas en los países en desarrollo (Maumbe y Swinton, 2003). Con esta problemática de fondo se han desarrollado diversas alternativas de control de enfermedades que reduzcan el riesgo a la salud humana, contaminación ambiental y que disminuyan el riesgo de residuos químicos peligrosos a lo largo de la cadena de producción y comercialización de alimentos (Singh *et al.*, 2007). El control biológico de enfermedades de frutos ha mostrado ser prometedor en años recientes. Los antagonistas han sido empleados en frutos de uva (Bulit y LaFon, 1972, Dubos, 1984),

fresas (Tronsmo, 1977, Güedez *et al.*, 2009), piña (Lim y Rohrbach, 1980), cítricos (Singh, 1980), manzanas, banano (Golam e Ilagh, 1999). Un organismo ampliamente usado para el biocontrol de las enfermedades de las plantas es el hongo del género *Trichoderma* que ha sido usado de manera comercial en contra de patógenos de plantas. Los mecanismos responsables de la actividad antimicrobiana de *Trichoderma* son el parasitismo y competencia por espacio y nutrientes (Sivakumar, 2001), adicionalmente este género de hongo es capaz de sintetizar diferentes compuestos antagonistas como son proteínas, enzimas y antibióticos lo cual incrementa la capacidad de control de hongos fitopatógenos (Al-Taweil *et al.*, 2009). Estudios recientes muestran que durante el proceso de micoparasitismo *Trichoderma* secreta numerosas enzimas líticas, como son celulasas, quitinasas y glucanasas capaces de degradar la pared celular de los hongos hospederos y los genes que codifican para estas enzimas son activados en presencia de micelio o filtrados de medio del cultivo de hongos fitopatógenos (Vinale *et al.*, 2008). Por ello el objetivo del presente trabajo es evaluar el efecto *in vitro* e *in vivo* que tienen cinco especies de *Trichoderma* sp. sobre *C. gloeosporioides*.

## **5.4 Materiales y métodos**

### **5.4.1 Empleo de *Trichoderma* spp. como agente de control biológico**

Las especies de *T. viride*, *T. longibrachiatum*, *T. asperellum*, *T. harzianum* fueron proporcionadas por la CEPLAC (Comissao Executiva do Plano da Lavoura Cacaueira, por sus siglas en Portugués).

Las cepas fueron transferidas a cultivo de PDA, las cuales después de la esporulación en este medio fueron conservadas en el ultracongelador para su posterior uso. Asimismo se hizo una identificación molecular con la finalidad de confirmar la especie.

### **5.4.2 Obtención de aislamientos y prueba de patogenicidad de *Colletotrichum gloeosporioides***

Se obtuvieron frutos de papaya con síntomas de “antracnosis” provenientes de Oaxaca y Veracruz, dos de los Estados con las mayores producciones a nivel nacional de esta especie vegetal (SAGARPA, 2010). Una vez en el laboratorio, se tomaron fragmentos del tejido

enfermo de un tamaño aproximado de 5X5 mm, tratando de involucrar tejido infectado (20%) y tejido sano (80%); posterior a esto se sembraron en cajas de Petri con Papa-Dextrosa-Agar (PDA) (Cedeño *et al.*, 1993; Dhyngra y Sinclair, 1995) y se incubaron a temperatura ambiente ( $26\pm 2$  °C) durante 10 días, posteriormente, una porción de tejido micelial se transfirió a otra caja de Petri con PDA con la finalidad de obtener cepas puras esporuladas. Una vez confirmada la identidad de *C. gloeosporioides*, usando claves taxonómicas para identificación de hongos de Sutton (1992), se obtuvieron siete cepas plurispóricas (PVC28, PVC20, PVC16, PVC36, OC5, OC8 y OC14), se inocularon frutos sanos de papaya para reproducir la sintomatología y realizar nuevamente el aislamiento, con el fin de corroborar la patogenicidad de *C. gloeosporioides* según los Postulados de Koch, se contó con frutos testigos, a los cuales se les colocó PDA sin el hongo. Con la finalidad de evitar pérdida de patogenicidad del organismo se mantuvo una cepa madre, de la cual se obtuvo el micelio para inocular frutos sanos de papaya y hacer reaislamientos los cuales fueron empleados para los bioensayos. Además del uso de claves morfológicas, la identificación del patógeno se confirmó mediante análisis moleculares, para lo cual se utilizó un kit de extracción de ADN, utilizando primers genéricos, cuyos productos fueron amplificados por PCR y separados en un gel de agarosa, finalmente enviados para su secuenciación. Las secuencias fueron comparadas en la base de datos Gen-Bank. Después de llevar a cabo la prueba de patogenicidad, se seleccionó la cepa más patogénica (OC14) para aplicar los tratamientos.

### **5.4.3 Actividad antagonica de *Trichoderma sp.* sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro***

#### **5.4.3.1 Porcentaje de colonización**

Para evaluar la actividad antagonica de *Trichoderma spp.* se utilizó la técnica de Cherif y Benhamou (1990). Para cada tratamiento (cada cepa un tratamiento con cuatro repeticiones), se depositó en un extremo de cajas Petri con 15 mL de PDA un disco de 5 mm de diámetro con micelio activo tomado de la periferia de colonias fungosas de 10 días de edad de *C. gloeosporioides*, y se dejaron desarrollar durante 1 día por su crecimiento

lento. Posteriormente, en el otro extremo de la caja se depositaron discos de 5 mm de *Trichoderma* spp. de colonias con un desarrollo de 5 días, incubándose a  $26^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}$ . Se obtuvieron medidas cada 24 h del crecimiento micelial para determinar el porcentaje de crecimiento micelial de *Trichoderma* sp. (Guédez *et al.*, 2009). Lo anterior distribuido bajo un diseño completamente al azar, repitiendo el experimento tres veces con 24 hrs de diferencia entre cada uno, los datos presentados son medias obtenidas. Valores superiores al 50% de colonización se consideraron efectivos.

Fórmula para obtener el porcentaje de colonización de *Trichoderma* sp. sobre *C. gloeosporioides*

$$C = \frac{DTP}{DE} (100)$$

C= Porcentaje de colonización

DTP= Distancia recorrida por la colonia de *Trichoderma* sp. sobre la colonia del patógeno en el eje que separa ambas colonias.

DE= Distancia entre ambos puntos de siembra (4 cm)

(Rollan *et al.*, 1999)

#### **5.4.3.2 Efecto inhibitorio**

Para medir el efecto inhibitorio del hongo antagónico hacia el patógeno, se midió el crecimiento de estos últimos. El porcentaje de inhibición se estimó con base en la diferencia obtenida entre el crecimiento del patógeno confrontado con la cepa antagónica y el crecimiento de la cepa sin antagonista (Testigo).

#### **5.4.3.3 Esporulación**

A los 7 días, cuando el hongo logró su esporulación total se determinó la concentración de conidios. Para colectarlos, cada caja de petri con los diferentes tratamientos, fueron enjuagadas con agua destilada estéril, la superficie fue raspada con una varilla de vidrio y filtrada a través de una malla de algodón estéril. Alícuotas de 0,5 mL de cada suspensión de



conidio fueron transferidas a una cámara de Neubauer para realizar el recuento de los conidios.

#### **5.4.3.4 Mecanismo de acción de *Trichoderma* sobre *Colletotrichum gloeosporioides***

Para conocer los efectos que causan las cinco cepas de *Trichoderma* hacia *C. gloeosporioides* se empleó la técnica de microcultivos de Riddel descrita por Paul (1999). Esta técnica consiste en colocar dentro de una caja de Petri una varilla de vidrio en forma de “V” y sobre ella, un portaobjetos estéril, sobre el cual se dispuso un disco de PDA de 10 mm de diámetro.

La disposición de cada hongo se realizó en dos puntos cardinales. Después de colocar el micelio de ambos hongos sobre el PDA (Con una diferencia de 24 hr, primero se colocó con ayuda de una aguja estéril a *Trichoderma*, el cual tiene un crecimiento el doble de rápido que *C. gloeosporioides*), y se colocó un cubreobjeto estéril. Con la finalidad de mantener la humedad dentro de la caja de Petri, se adicionaron 10 mL de glicerol al 10%.

Cuando el disco de agar fue cubierto con el crecimiento de ambos hongos, el glicerol fue sustituido por formaldehído al 10% durante 24 hrs para fijar las estructuras fúngicas. Posteriormente, el portaobjetos fue retirado de la caja de Petri para preparar los frotis. El cubreobjetos fue colocado en otro portaobjetos limpio y provisto de una gota de colorante conocido como “azul de algodón”. El siguiente paso consistió en retirar el disco de agar del portaobjetos original, y después de colocar una gota del colorante y colocar un cubreobjetos limpio. Una vez eliminado el exceso de colorante, las preparaciones fueron selladas y evaluadas microscópicamente, para determinar el mecanismo de acción empleado por las cepas de *Trichoderma*.

#### **5.4.4 Actividad antagónica de *Trichoderma* sp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides* in vivo**

##### **5.4.4.1 Prueba de efectividad de *Trichoderma* sobre el desarrollo de lesiones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya en postcosecha**

Se utilizaron frutos de papaya (Variedad Maradol), los cuales fueron obtenidos de un productor con un manejo adecuado del cultivo en el Estado de Oaxaca, México. Se seleccionaron frutos sanos sin daños físicos o signos y síntomas aparentes de la enfermedad. De las 7 cepas obtenidas se seleccionó la más patogénica para llevar a cabo las pruebas (OC14).

Cada fruto fue desinfectado con hipoclorito de sodio al 2% durante 3 minutos, frotándolos suavemente para evitar dañar la epidermis, posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y se dejaron secar a temperatura ambiente sobre papel secante.

La efectividad de los tratamientos con las diferentes especies de *Trichoderma* sp. (cepas sin diferencias estadísticas significativas en pruebas *in vitro*) sobre el desarrollo de las lesiones causadas por el patógeno fue probada agregando el agente biológico a las 24 hr antes que *Colletotrichum*, a las 0 y 24 hr después de inocularlo sobre las heridas causadas al fruto usando palillos de madera previamente esterilizados. En esta prueba se agregaron 20 µL de cada una de las especies de *Trichoderma* sp. a una concentración de  $1 \times 10^6$  (20 000 esporas por 20 µL) por herida (cuatro heridas por fruto) (2 mm de profundidad por 2 mm de diámetro). Una gota de tamaño similar fue también aplicada en los testigos comercial y absoluto con agua destilada estéril. El patógeno fue inoculado de acuerdo a los tiempos mencionados anteriormente para *Trichoderma* sp. Los tratamientos fueron incubados en cámaras húmedas (contenedores plásticos cerrados), un fruto por contenedor, a  $26 \pm 2^\circ\text{C}$  con humedad relativa de 95%. El diseño experimental usado en la prueba fue completamente aleatorizado con nueve repeticiones (tres por frutos), con tres bloques del experimento, con una diferencia de 24 hrs cada uno, los datos presentados aquí son un promedio. Los tratamientos experimentales fueron 17 (Cuadro 11), cada una de las cinco cepas por tres tiempos mencionados anteriormente, así como los dos controles (Imazalil y absoluto), depositando agua destilada estéril sobre la herida para el testigo absoluto.

**Cuadro 11** Tratamientos y réplicas de diferentes especies de *Trichoderma* como control biológico de *C. gloeosporioides*.

<b>Tratamientos</b>	<b>Repeticiones</b>
<b>T1C10</b>	9
<b>T1C8</b>	9
<b>T1C7</b>	9
<b>T1C5</b>	9
<b>T1C1</b>	9
<b>T2C10</b>	9
<b>T2C8</b>	9
<b>T2C7</b>	9
<b>T2C5</b>	9
<b>T2C1</b>	9
<b>T3C10</b>	9
<b>T3C8</b>	9
<b>T3C7</b>	9
<b>T3C5</b>	9
<b>T3C1</b>	9
<b>Testigo absoluto</b>	9
<b>Imazalil</b>	9

T1=24 hr antes del patógeno, T2=al mismo tiempo que el patógeno, T3=24 hr después que el patógeno, C1=*Trichoderma viride*, C5= *Trichoderma longibrachiatum*, C7=*Trichoderma asperellum* cepa 1, C8=*Trichoderma asperellum* Cepa 2, C10=*Trichoderma harzianum*.

#### **5.4.4.2. Evaluación de la severidad sobre frutos de papaya**

Fue evaluada midiendo el diámetro de la lesión causada por el patógeno que formó alrededor de las heridas hechas sobre la superficie de los frutos, esto se llevó a cabo cada 24 hrs después de la inoculación.

#### **5.4.4.3. Evaluación de fitotoxicidad sobre frutos de papaya**

Se determinó mediante los cambios de color en los frutos tratados en relación con los testigos, para lo cual se utilizaron imágenes digitales de los frutos tratados con extractos vegetales. Para la digitalización de las fotos se utilizó una cámara Kodak Z712 IS de 7,1 megapíxeles. Las fotografías se tomaron a un tamaño de 1024 x 768 píxeles a una distancia de un metro, iluminadas con una lámpara fluorescente de 20 watts. La apertura del diafragma utilizada fue de f/2,8 y la velocidad del obturador fue de 1/30 s manteniendo estos parámetros constantes. Las imágenes fueron guardadas en un formato tipo jpeg. El ángulo entre la lente de la cámara y la fuente de la iluminación fue de aproximadamente 45°. Se obtuvieron valores de los parámetros de color RGB (red, green y blue) mediante el software Photoshop que fueron analizados estadísticamente. Se analizaron imágenes de 40 x 40 píxeles por cada tratamiento (Lúquez y Aguilera, 2005).

#### **5.4.5 Análisis estadístico**

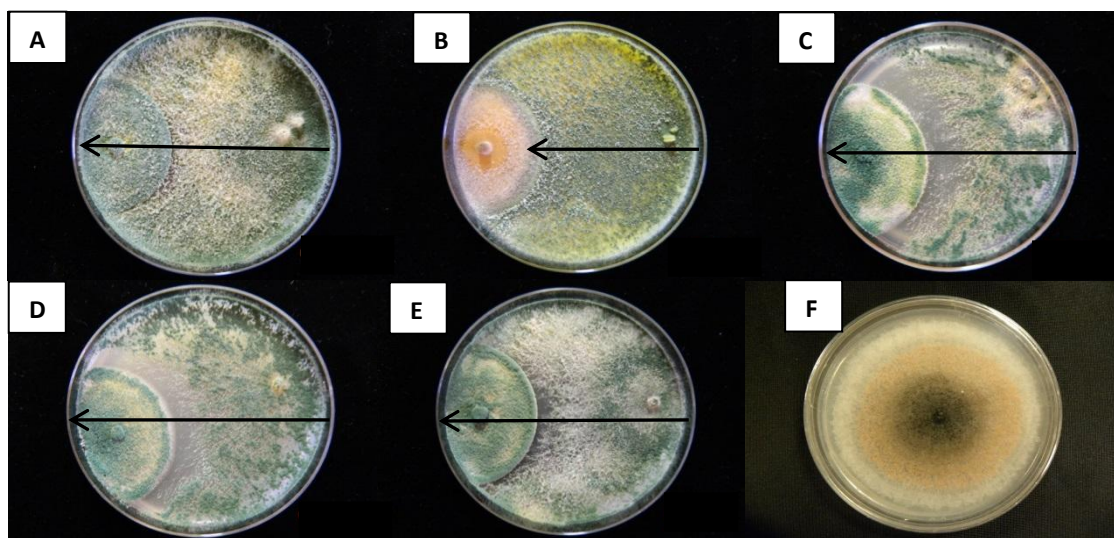
Los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas de normalidad (Shapiro Wilk) y homocedasticidad (Barret), transformándolos cuando fue necesario ( $\sqrt{2}$ ). A los mismos, se les realizaron análisis de varianza y pruebas de separación múltiple de medias (Tukey, 0,05). Asimismo, se obtuvo el área bajo la curva de la enfermedad a los datos obtenidos de los experimentos *in vivo*.

### **5.5 Resultados y discusión**

#### **5.5.1 Actividad antagónica de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides* *in vitro***

Las mediciones de cada una de las cepas de *Trichoderma* se dejaron de realizar hasta los 10 días de incubación, tiempo en el que *C. gloeosporioides* cubrió completamente la placa

de Petri, como se observa en la figura 1. La colonización de ninguna de las cepas presentó un porcentaje inferior al límite de efectividad (50%) establecido como umbral de efectividad. El aislamiento con el menor nivel de actividad colonizadora correspondió a la especie *T. asperellum* cepa 2 (7.80); otros autores reportan a esta especie como biocontroladora de patógenos *in vitro*, deteniendo el crecimiento micelial de *Pythium myriotylum* Drechsler (Mbarga *et al.*, 2012). *T. longibrachiatum* presentó el mayor valor de colonización (9.35) (Cuadro 12); sin embargo, al final de la prueba se observa que este antagonista no logró cubrir completamente al hongo patógeno (Figura 3 B), a diferencia de lo que sucedió con el resto de las cepas, que se nota cubrieron la superficie de *C. gloeosporioides* en su totalidad (Figura 3 A, C, D y E). Esto indica que *T. longibrachiatum* tienen un desarrollo más rápido que las otras especies, pero al entrar en contacto con este patógeno su desarrollo se vuelve lento, el resultado de este antagonista es inmediatamente seguido por *T. harzianum*.



**Figura 3.** Prueba de antagonismo de A) *Trichoderma viride*, B) *Trichoderma longibrachiatum*, C) *Trichoderma asperellum* cepa 1, D) *Trichoderma asperellum* cepa 2, E) *Trichoderma harzianum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides* y F) *Colletotrichum gloeosporioides*. Las flechas muestran el crecimiento de *Trichoderma*.

Por su parte, Wijeratnam *et al.* (2008) reporta a *T. harzianum* como biocontrolador de *Botriodiplodya theobromae* y *C. gloeosporioides in vitro*. Guédez *et al.* (2009) demostró que debido a la rapidez del crecimiento y a la capacidad para reducir el crecimiento de *R. stolonifer*, *Mucor* spp., *P. digitatum*, *R. solani*, *Aspergillus niger* y *Pythium* spp. en frutos de fresa, este hongo se considera un controlador biológico efectivo en enfermedades postcosecha de la fresa.

**Cuadro 12** Porcentaje de colonización de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides*

Tratamiento	Colonización*
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	9.3520 <sup>a**</sup>
<i>Trichoderma harzianum</i>	9.1195 <sup>a</sup>
<i>Trichoderma asperellum</i> cepa 1	7.9695 <sup>b</sup>
<i>Trichoderma asperellum</i> cepa 2	7.8043 <sup>b</sup>

\*Se muestran datos transformados con  $\sqrt{2}$

\*\* Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

Las cepas 1 y 2 de *T. asperellum* tuvieron un comportamiento similar entre ellas al desarrollarse sobre el patógeno, no presentándose diferencia estadística significativa, de igual manera su morfología se observa con las mismas características (Figura 3).

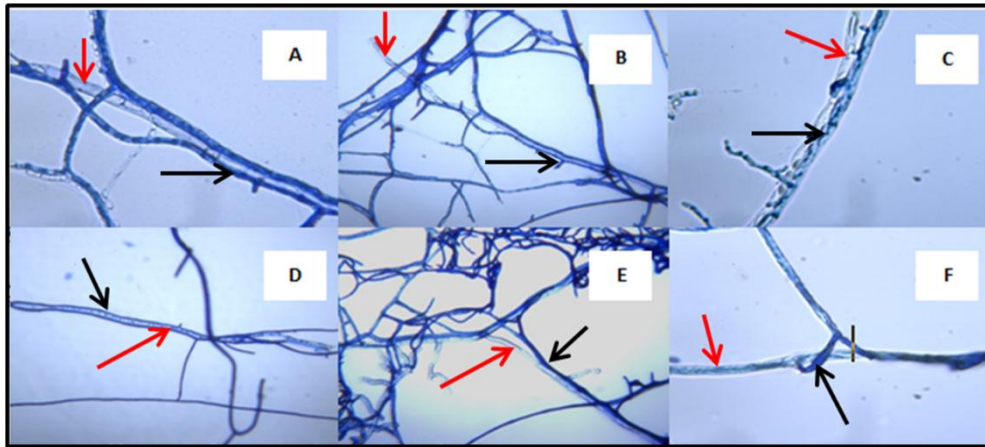
La **inhibición** de *C. gloeosporioides* por parte de las cepas de *Trichoderma* desarrollándose en cultivos duales no mostró diferencias estadísticamente significativas (Cuadro 13). Esta fue mayor al 50% para cada una de las cepas estudiadas, observándose la más alta inhibición por *T. longibrachiatum* y la menor por *T. harzianum*; lo contrario fue reportado por Golam e Ilag (1999) quien menciona que el mayor halo de inhibición fue dado por *T. harzianum* seguido por *T. viride*. Por su parte, Sousa Rocha y Oliveira (1998) encontraron que el mismo patógeno fue inhibido en un 100% por *Trichoderma koningii*.

**Cuadro 13** Porcentaje de inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* por *Trichoderma* spp.

Tratamiento	Inhibición (%)*
<i>Colletotrichum-T. longibrachiatum</i>	55.820 <sup>a</sup>
<i>Colletotrichum-T. viride</i>	55.416 <sup>a</sup>
<i>Colletotrichum-T. asperellum</i> cepa 2	55.312 <sup>a</sup>
<i>Colletotrichum-T. asperellum</i> cepa 1	55.289 <sup>a</sup>
<i>Colletotrichum-T. harzianum</i>	53.264 <sup>a</sup>
Testigo	0.00 <sup>b</sup>

\*Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

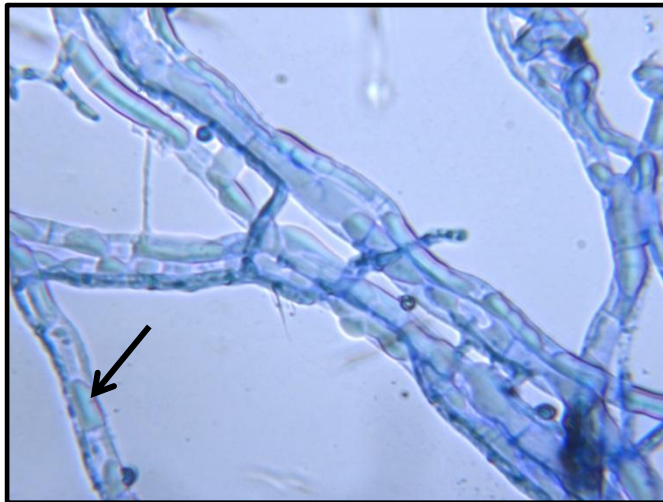
*T. longibrachiatum* se confirma como la especie con un valor mayor de efectividad sobre *C. gloeosporioides in vitro* (cuadro 13). El criterio para seleccionar las mejores cepas fue considerar el mayor porcentaje de colonización e inhibición; sin embargo, debido a que en este último no se notaron diferencias estadísticas significativas, se emplearon todas para las cepas para las pruebas *in vivo*.



**Figura 4.** Hifas de *Colletotrichum gloeosporioides* interactuando con A) *Trichoderma viride*, B) *Trichoderma longibrachiatum*, C) *Trichoderma asperellum*, cepa 1, D) *Trichoderma asperellum* cepa 2, E y F) *Trichoderma harzianum*. Flechas rojas indican hifas de *Colletotrichum*, Flechas negras indican hifas de *Trichoderma*.

En lo que respecta al antagonismo e interacción de hifas se realizaron observaciones de los microcultivos duales bajo un microscopio compuesto American Optical Microstar Microscope Model 1130 (Figura 4). Se observa que cada una de las cepas de *Trichoderma* presentaron tendencia al micoparasitismo hacia el micelio del hongo patógeno, en particular para el caso de *T. harzianum* causó el daño más drástico, observándose invasión del micelio de *C. gloeosporioides* (Figura 4 F). Elad (2000) comprobó que entre los mecanismos de acción de esta especie sobre *B. cinerea* son competencia, restricción de enzimas del patógeno y resistencia inducida. El resto de los antagonistas se encontraron fijados en forma paralela al micelio del patógeno, causando ruptura de las membranas, por lo que se notó vacuolización en los diferentes segmentos de las hifas (Figura 5). Golam e Ilag (1999) mencionan que las especies de *T. harzianum* y *T. viride* también se encuentran adheridas paralelamente, además de enrollarse alrededor de *L. theobromae*.

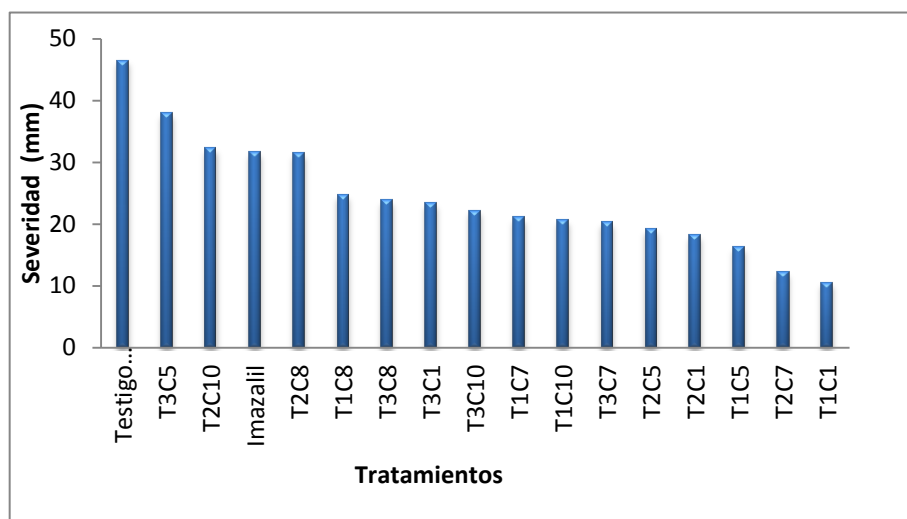




**Figura 5.** Hifas de *Trichoderma* spp. fijadas sobre *C. gloeosporioides*. Flecha muestra célula vacuolizada del patógeno.

### **5.5.2 Actividad antagonista de *Trichoderma* spp. sobre *Colletotrichum gloeosporioides* *in vivo***

Aunque ninguna especie de *Trichoderma* fue capaz de inhibir completamente el desarrollo del hongo en las lesiones en frutos de papaya inoculados artificialmente en tres diferentes tiempos (T1= 24 horas antes de inocular el patógeno, T2= al mismo tiempo que el patógeno, y T3= 24 horas después de inocular el patógeno), lograron reducir la severidad en los diferentes tiempos de inoculación (Figura 6). Lo mismo es reportado por Golam e Ilag (1999), encontrando que *T. viride* y *T. harzianum* no controlaron completamente el desarrollo de *L. theobromae* en frutos de banana, pero si hubo una reducción hasta del 65.06% por parte de *T. viride*.



**Figura 6.** Efectividad de *Trichoderma* sobre el desarrollo de lesiones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya en postcosecha

La reducción en el diámetro de la lesión fue más eficiente cuando se inoculó a *T. viride* 24 hrs antes de inocular al patógeno, mientras que el mayor valor se obtuvo cuando se inoculó a *T. longibrachiatum* 24 hrs después que *C. gloeosporioides* (Cuadro 14). Las diferencias estadísticas significativas se presentaron principalmente entre los tratamientos T1C1 y T2C7 respecto al testigo absoluto. Otros autores han encontrado que al inocular antes al antagonista se obtienen mejores resultados, que cuando se aplica simultáneamente o después que el patógeno (Golam e Ilag, 1999).

**Cuadro 14** Efectividad de *Trichoderma* en interacción con el tiempo, sobre el desarrollo de lesiones causadas por *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya en postcosecha

<b>Tratamiento</b>	<b>Media severidad*</b>
Testigo absoluto	46.436 a
T3C5	37.900 ba
T2C10	32.170 bac
Imazalil	31.656 bac
T2C8	31.390 bdac
T1C8	24.665 bdec
T3C8	23.865 bdec
T3C1	23.284 bdec
T3C10	22.150 dec
T1C7	20.990 dec
T1C10	20.628 dec
T3C7	20.305 dec
T2C5	19.115 dec
T2C1	18.196 dec
T1C5	16.248 de
T2C7	12.223 e
T1C1	10.495 e

\*Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05).

T1=24 hr antes del patógeno, T2=al mismo tiempo que el patógeno, T3=24 hr después que el patógeno, C1=*Trichoderma viride*, C5= *Trichoderma longibrachiatum*, C7=*Trichoderma asperellum* Cepa 1, C8=*Trichoderma asperellum* Cepa 2, C10=*Trichoderma harzianum*.

Puede observarse que el valor de la lesión no depende por separado de la cepa o del tiempo de inoculación, sino más bien de la interacción que existe entre ambos, como sucede con los últimos dos tratamientos (cuadro 14), en los cuales ni las cepas ni el tiempo de inoculación son los mismos, presentándose lo mismo con los demás tratamientos donde tampoco hay diferencia estadística significativa, a diferencia de los tratamientos T1C8, T2C8 y T3C8 donde al parecer hay una influencia por parte de *T.asperellum* cepa 2 sobre el desarrollo de la lesión; este mismo antagonista ha sido estudiado sobre *Thielaviopsis paradoxa* (De Seynes Hohn) en piña, controlando efectivamente el crecimiento del patógeno, teniendo un efecto fungicida (Wijesinghe *et al.*, 2010), sucediendo lo contrario en el presente trabajo, donde los tratamientos mencionados anteriormente igualaron al testigo absoluto. Díaz y Vila (1990) no encontraron reducción en el desarrollo de la lesión cuando *T. viride* y *P. digitatum* fueron inoculados simultáneamente sobre naranjas, mientras que, a medida que aumentaba el tiempo de inoculación del patógeno, las lesiones se reducían; el presente trabajo no concuerda con esto, ya que no hay diferencia para todos los tratamientos en el desarrollo de la lesión cuando el antagonista se inoculó antes, al mismo tiempo o después que el patógeno (Cuadro 14). La mayor reducción de la lesión fue dada por *T. viride* inoculada 24 hrs antes que *C. gloeosporioides* (77.40%), mientras que la menor fue para *T. longibrachiatum* aplicado 24 hrs después que el patógeno (18.38%). Ello nos indica que *T. viride* como biocontrolador debe ser aplicado en precosecha para disminuir pérdidas durante el transporte y en los sitios de venta. Piotrowska y Dorszewski (1996) reportan a *T. viride* como uno de los antagonistas más efectivos entre otras especies, en contra de *A. alternata* sobre papa, mejorado únicamente por *T. koningii*. Esta efectividad de *T. viride* fue confirmada por Nallathambi *et al.* (2009), quien encontró que el aislamiento *T.v-CIAH240* de *T. viride* fue superior en efectividad al resto de los aislamientos. Imazalil aplicado a 500 ppm no redujo notablemente el tamaño de la lesión, aplicándolo 24 horas antes de la inoculación de *C. gloeosporioides*.

**Cuadro 15** Evaluación de la fitotoxicidad de *Trichoderma* sobre frutos de papaya en postcosecha.

<b>Tratamientos</b>	<b>Medias de RGB</b>
<i>Trichoderma viride</i>	147.631 a
<b>Testigo absoluto</b>	133.694 ba
<i>Trichoderma harzianum</i>	131.215 ba
<i>Trichoderma asperellum</i> Cepa 2	124.234 ba
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	123.446 ba
<b>Imazalil</b>	121.955 ba
<i>Trichoderma asperellum</i> Cepa 1	115.436 b

\*Medias seguidas con la misma letra son estadísticamente iguales (Tukey 0.05)

Considerando que el valor obtenido para los frutos empleados como testigo absoluto representa la coloración adecuada para la especie de papaya variedad maradol, no existe diferencia estadística significativa con las diferentes cepas inoculadas. Se observa que el efecto de *T. viride* y *T. asperellum* cepa 1 causó diferencia estadística significativa entre ellas (0.0021); sin embargo, con el testigo absoluto no existe ésta. El testigo comercial (Imazalil) tampoco causó fitotoxicidad (evaluación del color) sobre los frutos de papaya (Cuadro 15). Resultados contrarios fueron reportados por Marfori *et al.* (2003) quien encontró que Trichosetina producida por *T. harzianum* en cultivo dual con *Catharanthus roseus* L. inhibió el desarrollo de raíces de diferentes especies de plantas, además las células de raíces tratadas con este metabolito murieron.

## 5.6 Conclusiones

Las cepas con mayor colonización sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* fueron *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma harzianum*, mientras que para la variable inhibición, no se obtuvo diferencia estadística significativa. En lo que respecta al mecanismo de acción de las cepas de antagonistas, todas mostraron micoparasitismo hacia el patógeno. A nivel *in vivo* los tratamientos T2C7 y T1C1 fueron los más efectivos con la eficiencia más alta del 77.40%. No se observó diferencia estadística significativa en cuanto a la fitotoxicidad por ninguno de los tratamientos evaluado.

## 6. Discusión general

En el presente trabajo se pretendió demostrar la posibilidad de alternativas a los productos químicos para el manejo postcosecha de la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de papaya en postcosecha. Diversos ensayos tanto *in vitro* como *in vivo* fueron realizados empleando extractos vegetales y *Trichoderma*. Los resultados obtenidos por los extractos vegetales demostraron que existen especies que tienen potencial para el control de este patógeno, tal como fue demostrado en el ensayo con canela, la cual fue efectiva *in vitro* e *in vivo*, en los primeros ensayos no se presentó crecimiento del hongo a una concentración de 0.0150%, mientras que en *in vivo* cuando el extracto fue asperjado antes de la inoculación del patógeno se muestra la menor severidad para las heridas. Maqbool *et al* (2011) encontró que canela a una concentración de 0.4% con goma arábiga al 10% tuvo el efecto fungicida más alto, retardando la aparición de los síntomas, por su parte Tzortzakis (2009) demostró que esta misma especie detuvo el desarrollo micelial cuando se empleó a 500 ppm sobre *Colletotrichum*, esta misma concentración detuvo el desarrollo de la lesión de antracnosis sobre frutos de tomate. Esta especie vegetal ha sido extensamente estudiada sobre el desarrollo de otros microorganismos como son *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus*, *Aspergillus ochraceus*, *Penicillium* sp., *Penicillium roqueforti*, *Penicillium patulum*, and *Penicillium citrinum*, así como *Lactobacillus* sp., *Bacillus thermoacidurans*, *Salmonella* sp., *Corynebacterium michiganense*, *Pseudomonas striafaciens*, *Clostridium botulinum*, *Alternaria* sp., *Aspergillus* sp., *Cunninghamella* sp., *Fusarium* sp., *Mucor* sp., and *Penicillium* sp. (Azzouz

and Bullerman, 1982; Conner and Beuchat, 1984; Suksrikarm, 1987; Burt, 2004). Además este aceite es empleado como sustancia conservadora y saborizante natural que no son dañinas cuando son consumidas en productos alimenticios, por lo cual podría considerarse su uso como una alternativa de control para *Colletotrichum* sobre frutos en postcosecha. El control biológico en postcosecha es otra de las opciones atractivas que se presentan como alternativa al uso de químicos sintéticos. Al respecto de *Trichoderma* sp., en este trabajo las pruebas *in vitro* mostraron que todas las cepas ensayadas presentaron micoparasitismo hacia el micelio del hongo patógeno, la especie que arrojó la menor colonización fue *Trichoderma asperellum* cepa 2, aunque otros autores la reportan como una especie biocontroladora de patógenos *in vitro*, deteniendo el crecimiento micelial de *Pythium myriotylum* (Mbarga *et al.*, 2012); la especie que presentó el mayor valor de colonización fue *Trichoderma longibrachiatum* (9.35); sin embargo, al final de la prueba se observa que este antagonista no logró cubrir completamente al hongo patógeno, a diferencia de lo que sucedió con el resto de las cepas, que se nota cubrieron la superficie de *C. gloeosporioides* en su totalidad. Esto indica que *T. longibrachiatum* tienen un desarrollo más rápido que las otras especies, pero al entrar en contacto con este patógeno su desarrollo se vuelve lento, el resultado de este antagonista es inmediatamente seguido por *T. harzianum*. Wijeratnam *et al.* (2008) reporta a *T. harzianum* como biocontrolador de *Botriodiplodya theobromae* y *C. gloeosporioides in vitro*. Guédez *et al.* (2009) demostró que debido a la rapidez del crecimiento y a la capacidad para reducir el crecimiento de *R. stolonifer*, *Mucor spp.*, *P. digitatum*, *R. solani*, *Aspergillus niger* y *Pythium spp.* en frutos de fresa, este hongo se considera un controlador biológico efectivo en enfermedades postcosecha de la fresa. La reducción en el diámetro de la lesión fue más eficiente cuando se inoculó a *T. viride* 24 hrs antes de inocular al patógeno, mientras que el mayor valor se obtuvo cuando se inoculó a *T. longibrachiatum* 24 hrs después que *C. gloeosporioides* (Cuadro 14). Las diferencias estadísticas significativas se presentaron principalmente entre los tratamientos T1C1 y T2C7 respecto al testigo absoluto. Otros autores han encontrado que al inocular antes al antagonista se obtienen mejores resultados, que cuando se aplica simultáneamente o después que el patógeno (Golam e Ilag, 1999).

*Trichoderma* ha sido empleado en diversos frutos durante la postcosecha como son manzana, fresa, cítricos y banana (Elad, 1994; Aranguren *et al.*, 1994; Pajmo *et al.*, 1995; Sastrachidayat, 1995; Golam *et al.*, 1998; Lakshmi *et al.*, 2004), ha sido aplicado mezclándolo con fungicidas con la finalidad de controlar completamente el patógeno objetivo, mejorando no solo la eficacia en el control, sino también disminuyendo el uso de fungicidas. Las aplicaciones de mezcla de *Trichoderma harzianum* con fungicidas fueron efectivas para el control de moho gris en tomate, calabaza, pepino, uvas y banana (Elad y Zimand, 1992; Meszka y Bielenin, 2004; Devi y Arumugam, 2005). Kumar *et al.* (2005) también ha documentado la efectividad de un uso integrado de bioagentes y fungicidas sobre pudrición negra (*Alternaria alternata*) en mango.

## 7. Conclusiones generales

Los extractos ensayados mostraron efectividad en contra del patógeno en los análisis *in vitro*. El extracto de ajo *in vivo* no mostró fitotoxicidad ni efectividad en contra de *Colletotrichum gloeosporioides* sobre frutos de papaya en postcosecha, mientras que el de canela tuvo una efectividad de 97.22% a una dosis de 0.0054%, superando al testigo químico, sin embargo, a dosis mayores a 0.0120% presenta fitotoxicidad.

En cuanto a control biológico se refiere, las cepas con mayor colonización sobre *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* fueron *Trichoderma longibrachiatum* y *Trichoderma harzianum*, mientras que para la variable inhibición, no se obtuvo diferencia estadística significativa. En lo que respecta al mecanismo de acción de las cepas de antagonistas, todas mostraron micoparasitismo hacia el patógeno. A nivel *in vivo* los tratamientos T2C7 y T1C1 fueron los más efectivos con la eficiencia más alta del 77.40%. No se observó diferencia estadística significativa en cuanto a la fitotoxicidad por ninguno de los tratamientos evaluados.



## 8. Literatura citada

- Allende, R., Juárez, C., García, R., Carrillo, A., Patiño, M., y Galindo, E. 2001. *Rodhotorula minuta* agente de control biológico, potencial contra *Colletotrichum gloeosporioides* en mango. Brazilian Phytopathology. Pp. 461-462.
- Al-Taweil, H. I., Osman, M. B., Aidil, A. H., and Wan-Yussof, W. M. 2009. Optimizing of *Trichoderma viride* cultivation in submerged state fermentation. American Journal Applied Science (6):1277-1281.
- Álvarez, A. M. and Nishijima, W. T. 1987. Postharvest diseases of papaya. Plant Disease 71:682-686.
- Alzamora, S. M., López-Malo, A., Guerrero, S., and Palou, E. 2003. Plant antimicrobials combined with conventional preservatives for fruit products. In S. Roller (Ed.), Natural Antimicrobials for the Minimal Processing of Foods. pp. 235–249. Cambridge: Woodhead Publishing Ltd.
- Amadioha, A.C. 2000. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachta indica*. Crop Protection 19: 287-290.
- Arauz, F. L.; Mora, D. 1983. Evaluación preliminar de los problemas postcosecha en seis frutas tropicales de Costa Rica. Agronomía Costaricense 7(1/2):43-53.
- Arias, C. 1992. Programa de pérdidas postcosecha de frutales en los países menos desarrollados de la FAO. Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y Alimentación. Italia. 183 p.
- Azzouz, M.A., Bullerman, L.B., 1982. Comparative antimycotic effects of selected herbs, spices, plant components and commercial antifungal agents. Journal of Food Protection 45, 1298– 1301.
- Bailey, J.A. and Jeger, J.M. 1992. *Colletotrichum*: Biology, pathology and control. CAB Berliin, Stuttgart: J. Cramer in der Gebr. Borntraeger Science Publiserhs. Pp. 139.
- Baños-Guevara, P.E., Zavaleta-Mejía, E., Colinas-León, M.T. Luna-Romero, I. y Gutiérrez-Alonso, J.G. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya maradol Roja y fisiología postcosecha de frutos infectados. Revista Mexicana de Fitopatología 2:198-205.

- Barkai-Golan, R., 2001. Postharvest Diseases of Fruit and Vegetables: Development and Control. Elsevier Sciences, Amsterdam, The Netherlands.
- Bautista-Baños, S.; Barrera- Necha, L. L.; Bravo Luna, L. and Bermúde Torres, K. 2002. Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruit after storage. *Revista Mexicana de Fitopatología* 20: 8-12.
- Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E. and Wilson, C. L. 2003. Effect of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides* anthracnose level and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22: 1087-1092.
- Benato, E.A., Cia, P., Souza, N.L., 2001. Manejo de doenças de frutas pos-colheita. *Revisao Anual de Patologia de Plantas* 9: 403–440.
- Benkeblia, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). *Technol.* 37:263-268.
- Berger, R.D. 1988. Experimental techniques in plant diseases epidemiology. En: Kranz, J. y Rotem, J. (Eds). The analysis of effects of control measures on the development of epidemics. P.p. 137-152. Berlin: Springer-Verlag.
- Bianchi, A., Zambonelli, A., Daulerio, A.Z., and Bellesia, F. 1997. Ultrastructural studies of the effects of *Allium sativum* on phytopathogenic fungi *in vitro*. *Plant Disease* 81:1241-1246.
- Binyamini, N. and Schiffmann-Nadel, M. 1971. Latent infection in avocado fruit due *Colletotrichum gloeosporioides*. *Phytopathology* 62:592-594.
- Bolkan, H. A., Cupertino, F. P., Dianese, J. C. and Takatsu, A. 1976. Fungi associated with pre and post-harvest fruit rots on papaya and their control in central Brazil. *Plant Disease Reporter* 60:605-609.
- Bosquez-Molina, E., Ronquillo-De Jesús, E., Bautista-Baños, S., Verde-Calvo, J., Morales, and López, J. 2010. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. *Postharvest Biology and Technology* 57:132-137.
- Bulit, J. and LaFont, R. 1972. Biologie de *Botrytis cinerea* Perss et le developpement de la pourriture grese de la vigne. *Rev. Zool. Agric. Patol. Veg.* 71:1-10.

- Burt, S. 2004. Essential oils: Their antibacterial properties and potential applications in foods – A review. *International Journal of Food Microbiology* 94(3): 223–253.
- Bussaman, Prapassorn; Namsena, Piyarat; Rattanasena, Paweena and Chandrapatya, Angsuman. 2012. Effect of crude leaf extracts on *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. *Psyche*. Vol 2012:Article ID 309046. 6 p.
- Cáceres, M.I., Martínez, E. and Torres, F. 1998. Efecto del tiabendazol y extracto de semilla de toronja en el control de enfermedades de curuba en pre y postcosecha en Nuevo Colón (Boyaca). *Fitopatología Colombiana* 22: 35-38.
- Cakir, A., Kordali, S., Kilic, H., and Kaya, E. 2005. Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochemical Systematics and Ecology* 33: 245–256.
- Cappellini, R.A., Cepones, M.J. and Lightner, G.W. 1998. Disorders in apricot and papayas shipment to the New York market, 1972-1985. *Plant Disease* 72:366-368.
- Castro, B. y Restrepo, L. 2004. Efectos de tratamientos postcosecha sobre la prolongación de la maduración del baby banano (*Musa accuminata*). pp. 273- 274. *Memorias XVI Reunión Internacional Acorbat*. Oxaca, México.
- Cavallito, C.J. and Bailey, H.J. 1994. Allicin, the antibacterial principle of *Allium sativum*. I. Isolation, physical properties and antibacterial action. *J. American Chemistry Society* 66:1950.
- Cedeño, L., Mohali, S., y Palacios, P.E. 1993. Antracnosis causada por dos cepas de *Glomerella cingulata* en frutos de parchita. *Fitopatología Venezolana* 6:30-33.
- Chand-Goyal, T., and Spotts, R.A. 1996. Postharvest biological control of blue mold of apple and brown rot of sweet cherry by natural saprophytic yeast alone or in combination with low doses of fungicides. *Biological Control* 6:253-259.
- Chau, K. F. and Álvarez, A. M. 1983. A histological study of anthracnose in *Carica papaya*. *Phytopatology* 73:113-116.
- Chérif M. and Benhamou N., 1990. Cytochemical aspects of chitin breakdown during the parasitic action of a *Trichoderma* sp. on *Fusarium oxysporum* f.sp. *radicis lycopersici* *Phytopathology* 80: 1406-1414.

- Coates, L.M.; Johnson, G.I. and Cooke, A.W. 1993. Postharvest disease control in mangoes using high humidity hot air and fungicide treatments. *Annals of Applied Biology* 123(2):441-448.
- Coates, L.M. and Gowanlock, D. 1993 Infection process of *Colletotrichum* species in tropical and subtropical fruits. Proceedings in an international Conference held at Chiang Mai Thailand. Australian Centre for international agricultural research (ACIAR) 30:162-168.
- Combrinck, S.; Regnier, T. and Kamatou, G.P.P. 2011. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. *Industrial Crops and Products* 33(2):344-349.
- Conner, D.E., Beuchat, L.R., 1984. Effect of essential oils plants on growth of food spoilage yeasts. *Journal of Food Science* 49, 429– 434.
- Cooke, D.E.L., Young, V., Birch, P.R.J., Toth, R., Gourlay, F., Day, J.P., Camagie, S.F. and Duncan, J.M. 2003. Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995-1997). *Plant Pathology* 52:181-192.
- Correa, G. L., Lavalett, M.P. and Afanador, L. 2007. Use of multivariate methods for grouping strains of *Colletotrichum* spp. Based on Cultural and Morphological Characters. *Rev. Fac. Nal. Agro. Medellín* 60(1):3671-3690.
- Cutler, H. G., and Cutler, S. J. 1999. Biological active natural products: Agrochemicals (pp. 299). Boca Raton, USA: CRC Press.
- Dayan, F.E., Cantrell, C.L. and Duke, S.O., 2009. Natural products in crop protection. *Bioorg. Med. Chem.* 17: 4022–4034.
- Deacon, J.W. 1991. Significance of ecology in the development of biocontrol agents against soil-borne plant pathogens. *Biocontrol Science Technology* 1:5-20.
- Dennis C. and Webster J., 1971. Antagonistic properties of species group of *Trichoderma*, Production 1. Production of non-volatile antibiotics. *Trans. Brit. Myco. Soc.* 57: 25-39.
- De Villiers, E. A., and Korsten, L. 1996. Alternative strategies for control of mango fruit diseases S.A. *Mango Growers Association yearbook* 16: 61-64.

- Devi, A.N., Arumugam, T., 2005. Studies on the shelf life and quality of Rasthali banana as affected by post harvest treatments. *Orissa J. Hortic.* 33, 3–6.
- Dhyngra, O.D. and Sinclair, B.J. 1995. *Basic Plant Pathology Methods*. CRC. Press. 434 p.
- Diaz, A. B. and Vila, A. R. 1990. Biological control of *Penicillium digitatum* by *Trichoderma viride* on postharvest citrus fruits. *International Journal of Food Microbiology* 11:179-184.
- Dickman, M.B. and Alvarez, A.M. 1983. Latent infection of papaya caused by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Disease* 67:748-750.
- Dickman, M. B., Patil, S. S. and Kolatukkudi, P. E. 1982. Purification, Characterization and role in infection of an extracellular cutinolytic enzyme from *Colletotrichum gloeosporioides* on *Carica papaya*. *Physiological Plant Pathology* 20:333-347.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of Plant DNA from fresh tissue. *Focus* 12:13-15.
- Dubos, B. 1984. Biocontrol of *Botrytis cinerea* on grapevines by antagonistic strain of *Trichoderma harzianum*, p. 26-32. In: M.J. Klub and C.A. Reedy (ed.). *Current perspectives in microbiol ecology*. Amer. Soc. Microbial., Washington, D.C.
- Duru, M. E., Cakir, A., Kordali, S., Zengin, H., Harnandar, M., Izumi, S., 2003. Antifungal activities of the leaves of three Pistacia species grown in Turkey. *Fitoterapia* 74: 170–176.
- Eckert J W., Sievert, J R., and Ratnayake, M. 1994. Reduction of imazalil effectiveness against citrus green mold in California packinghouses by resistant biotypes of *Penicillium digitatum*. *Plant Disease* 78: 791–794.
- Elad, Y., Zimand, G., 1992. Integration of biological and chemical control for grey mould. In: Verhoeff, K., Malathrakis, N.E., Williams, B. (Eds.), *Proceedings of the 10th International Botrytis Symposium*, Heraklion, Crete, Greece, 5–10-April, 1992, pp. 272–276.
- Elad, Y. 2000. Biological control of foliar pathogens by means of *Trichoderma harzianum* and potential modes of action. *Crop Protection* 19:709-714.
- Ezziyyani, M; Requena, M. E. y Candela M. E. 2005. Producción de proteínas- PR en la inducción de resistencia a *Phytophthora capsici* en plantas de pimiento (*Capsicum annum L.*) tratadas con *Trichoderma harzianum*. *Anales de Biología* 27:143-153.

- Fairbanks, M. 2001. Defensivos agrícolas ampliam o mercado. Rev. Quim. Deriv. 398: 398–403.
- FAOSTAT, 2011. Recuperado el 11 de mayo del 2013, de <http://faostat3.fao.org/home/index.html#DOWNLOAD>
- Femenía, M. 2007. Caracterización química de cepas de hongos del género *Colletotrichum*: Síntesis de gloeosporiol. Diseño y síntesis de modelo de agentes fungicidas, Tesis de grado, Universidad de Cádiz, Facultad de Ciencias, Departamentos de química orgánica, España.
- Fernández-Larrea, V. O. 2001. Microorganismos antagonistas para el control Fitosanitario Avances en el Fomento de Productos Fitosanitarios No-Sintéticos. Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) 62: 96 -100.
- Friedman, B. A. 1960. Market diseases of fresh fruits and vegetables. Economic Botany 14:145.
- Fry, W.E. and Milgroom, M.G. 1990. Managing resistance to agrochemicals. En: Green, M.B., Lebaron, H.M y Moberg, W.K. (Eds). Population biology and management of fungicide resistance. P.p. 275-285. Washington: American Chemical Society.
- Gamagae, S. U., Sivakumar, D., y Wijesundera, R.L.C. 2004. Evaluation of postharvest application of sodium bicarbonate incorporated wax formulation and *Candida oleophila* for the control of antracnose of papaya. Crop Protection 23: 575-579.
- Garret, S.D. 1965. Ecology of soli-borne plant pathogens. Prelude to biological control. En: Baker, K.F. y Snyder, W.C. (Eds.) Toward biological control of soil-borne plant pathogens (pp. 4-17). California: University California Press.
- Gogoi, R., Baruah, P. and Nath, S. C. 1997. Antifungal activity of the essential oil of *Litsea cubeba* Pers. J. Essential Oils Res. 9:213-215.
- Golam, M. and Ilag, L. L. 1999. Potential for Biocontrol of *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griff. y Maubl. in Banana Fruits by *Trichoderma* Species. Biological Control 15: 235–240.
- Goñi, P., López, P., Sánchez, C., Gómez-Lus, R., Becerril, R. and Nerín C. 2009. Antimicrobial activity in the vapour phase of a combination of cinnamon and clove essential oils. Food Chemistry 116: 982-989.

- Guédez, C., Cañizales, L., Castillo, C. y Olivar, R. 2009. Efecto antagónico de *Trichoderma harzianum* sobre algunos hongos patógenos postcosecha de la fresa (*Fragaria* sp). Revista de la Sociedad Venezolana de Microbiología 29: 34-38.
- Gutiérrez-Alonso, Juan Gabriel; Gutiérrez-Alonso, Omar; Nieto-Ángel, Daniel; Téliz-Ortiz, Daniel; Zavaleta-Mejía, Emma; Delgadillo-Sánchez, Felipe y Vaquera-Huerto, Humberto. 2003. Resistencia a Benomil y Tiabendazol en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. obtenidos de mango (*Mangifera indica* L.) en cinco regiones de México. Revista Mexicana de Fitopatología 21(3):260-266.
- Gutiérrez-Alonso, Omar y Gutiérrez-Alonso, Juan Gabriel. 2003. Evaluación de resistencia a Benomil, Thiabendazol y Azoxystrobin para el control de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en postcosecha. Revista Mexicana de Fitopatología 21(2):228-232.
- Guzmán, D. 1998. Guía para el cultivo de la papaya (*Carica papaya*). Sistema unificado de información institucional. Ministerio de Agricultura y Ganadería. San José, Costa Rica. 26 p.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, V. 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86:985–990.
- Harbone, J. B. 1991. *Phytochemical methods*. Londres: Chapman y Hall . Manici, M., Lazzeri, L., y Palmieri, S. 1997. *In vitro* fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. Journal Agriculture and Food Chemistry 45: 2768-2773.
- Hayes, W. J., and Laws, E. R. 1991. Handbook of pesticides toxicology, Vol. 1 (pp. 55–56) New York, USA: Academic Press.
- Hernández-Albiter, R.C., L.L. Barrera-Necha, S. Bautista-Baños and L. Bravo-Luna. 2007. Antifungal Potential of Crude Plant Extracts on Conidial Germination of two isolates of *Colletotrichum gloeosporioides*. Revista Mexicana de Fitopatología 25: 180-185.

- Ho, C.C. 2000. Spider-mite problems and control in Taiwan. *Experimental and Applied Acarology* 24: 453-462.
- Hopkins, W. G. 1999. *Introduction to the plant physiology*. John Wiley and Sons. 2a Edición. USA. 512 p.
- Ichikawa, Makoto; Ide, Nagatoshi; Yoshida, Jiro; Yamaguchi, Hiroyuki and Ono, Kazuhisa. 2006. Determination of seven organosulfur compounds in garlic by highperformance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54(5):1535-1540.
- Ippolito, A. and Nigro, F., 2000. Impact of preharvest application of biological control agent on postharvest diseases of fresh fruit and vegetables. *Crop Protection* 19:610-619.
- Janisiewicz, W. J. and Criof, A.M. 1992. Control of storage rots on various pears cultivars with a saprophytic strain of *Pseudomonas syringae*. *Plant Disease* 76: 555-560.
- Janisiewicz, W. J. and Korsten, L. 2002. Biological control of postharvest disease of fruits. *Annual Review of Phytopathology* 40: 411-441.
- Janisiewicz, W. J., Leverentz, B., Conway, W.S., Saftner, R.A., Reed, A.N., and Camp, M.J. 2003. Control of bitter rot and blue mold of apple integrating heat and antagonistic treatments on 1-MCP treated fruits stored under controlled atmosphere conditions. *Postharvest Biology and Technology* 20: 129-143.
- Kader, A.A., 1992. *Postharvest Technology of Horticultural Crops*. Division of Agriculture and Natural Resources, Oakland.
- Karabulut, O.A., y Baykal, N. 2004. Integrated control of postharvest disease of peaches with a yeast, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Protection* 23: 431-435.
- Khetmalas, M.B.; Hasabnis, S.N.; Sardeshpande, J.S. and Diwakar, M.P. 1984. Soil fungi antagonistic to plant pathogens. *Current Science* 53:862-863.
- Kookana, R.S. and Simpson, B.W. 2000. Pesticide fat in farming systems: Research and monitoring. *Communications in Soil Science and Plant Analysis* 31:1641-1659.
- Korsten, L., De Jager, G.S., De Villiers, E.E., Lourens, A., Kotzé, J.M., and Wehner, F.C. 1995. Evaluation of bacterial epiphytes isolated from avocado leaf and fruits surfaces for biocontrol of avocado. *Postharvest Disease* 79: 1149-1156.



- Kosma, P., Ambang, Z., Begoude, B.A.D., Ten Hoopen, G.M., Kuate, J. and Akoa A. 2011. Assessment of nematicidal properties and phytochemical screening of neem seed formulations using *Radopholus similis*, parasitic nematode of plantain in Cameroon. *Crop Protection* 30:733-738.
- Kumar, M.K.P., Nargund, V.B., Basha, C.R.J., 2005. Effect of novel treatments on post harvest diseases of mango (*Mangifera indica* L.). *Mysore J. Agric. Sci.* 39, 474–479.
- Kyu, K. W. N., Jitareerat, P., Kanlajanarat, S. and Sangchote, S. 2007. Effects of cinnamon extract, chitosan coating, hot water treatment and their combinations on crown rot disease and quality of banana fruit. *Postharvest Biology and Technology* (45): 333-340.
- Kyung, K. H., Kim, M. H., Park, M. S., and Kim, Y. E. 2002. Alliinase-independent inhibition of *Staphylococcus aureus* B33 by heated garlic. *Journal of Food Science* 67:780-785.
- Lenné, J. M. 1992. *Colletotrichum* diseases of legumes. En: Bailey, J. A. y M. J. Jeger. 1992. *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. British Society for Plant Pathology (Ed.) UK. 134-165 pp.
- Leroux, P. 2003. Mode of action of agrochemicals towards plant pathogens. *Comptes Rendus biologies* 326:9-21.
- Liberato, J.R. y Tatagiba, J.S. 2001. Evaluación de fungicidas *in vitro* y en postcosecha para el control de la antracnosis y de la pudrición peduncular en frutos de papaya. *Resumen Fitopatología* 27:409-414.
- Lim, TK and Rohrbach, KG., 1980. Role of *Penicillium funiculosum* strains in the development of pineapple fruit diseases. *Phytopathology* 70:663-665.
- Lindow, S.E. and Wilson, M. 1997. Biological control of foliar pathogens with bacterial biocontrol agents. *Applied Environmental Microbiology* 63:1-9.
- Loaiza, J.E. y Rivera, G. 2000. Potencial biocida de extractos de *Gliricida psepium* contra patógenos del cultivo de la papaya. *Agronomía Costarricense* 1:29-36.
- Lúquez, B.C.V. y Aguilera, R.J.M. 2005. Mensura digitalizada de la evolución del color en aceitunas según el grado de madurez del fruto. *Rev. FCA UNCuyo* 2: 33-40.

- Lurie, S., Droby, S., Chalupowicz, L. and Chalutz, E., 1995. Efficacy of *Candida oleophila* strain 182 in preventing *Penicillium expansum* infection of nectarine fruit. *Phytoparasitica* 23: 231–234.
- Macedo, T. G. 2004. Controle químico e hidrotérmico da antracnose em frutos de mamoeiro (*Carica papaya*) na pos-colheita. In: Silva, K.S., T.N. Hojo, O. L. Lemos, 2006. Patogenicidade causada pelo fungo *Colletotrichum gloeosporioides* em diferentes espécies frutíferas. *Revista Brasileira de Fruticultura* 28:131-133.
- Macias, F. A., Castellano, D., Oliva, R. M., Cross, P., and Torres, A. 1997. Potential use of allelopathic agents as natural agrochemicals. *Proceedings of Brighton Crop Protection Conference—Weeds* (pp. 33–38). Brighton, UK.
- Maqbool, M., Ali, A., Ramachandran, S., Smith, D.R., Alderson, P.G. 2010. Control of postharvest anthracnose of banana using a new edible composite coating. *Crop Prot.* 29:1136–1141.
- Maqbool, Mehdi , Ali, Asgar, Alderson, G., Muda Mohamed, M., Siddiqui, Y., and Zahid,N. 2011. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. *Postharvest Biology and Technology* 62:71-76.
- Manici, L. M.; Lazzeri, L. and Palmieri, S.. 1997. In vitro fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzymederived products toward plant pathogenic fungi. *Journal Agricultural and Food Chemistry* 45(7):2768-2773.
- Manner, J.M., Masel, A., Braithwhite, K.S., and Irwin, J.A.G. 1992. Molecular analysis of *Colletotrichum gloeosporioides* pathogenic on the tropical pasture legume *Sthylasantos*. P.p. 250-268. In: J.A. Bailey and M.J. Jegers (eds) *Colletotrichum; Biology, pathology and control*. British society for plant pathology. C.A.B. International. London, England. 388 p.
- Marfori, C.E., Kajiyama, I.S., Fukusaki, I.E. and Kobayashi, A. 2003. Phytotoxicity of the tetramic acid metabolite trichosetin. *Phytochemistry* 62:715–721
- Marín, B., Villadiego, M. y Barrera, J. 2006. Evaluación de extractos vegetales para el control de *Mycosphaerella fijiensis* en Plátano Harton (Musa ABB) en cordoba-Colombia. XVII Reuniao Internacional de Associacao para a Cooperacao nas

- Pesquisas sobre Banano no Caribe na America Tropical. ACORBAT. Joinville, Santa Catalina, Brasil. 560-571 p.
- Martínez B.R. y Estrada, N. L. 1994. Importancia de la antracnosis *Colletotrichum gloeosporioides* y la roña *Sphaceloma persea* en la producción de aguacate en Michoacán. Facultad de Agrobiología U.M.S.N.H. documento inédito. 8 p.
- Maumbe, B. M., and Swinton, S. M. 2003. Hidden health costs of pesticide use in Zimbabwe's smallholder cotton growers. Soc. Sci. Med. 57: 559-1571.
- Mbarga, J.B.; Martijn, G.T.H.; Kuate, J.; Adiobo, A.; Ngonkeu, M.E.L.; Ambang, Z.D.; Ako, A.; Tondje, P.R.; and Begoude, B.A.D. 2012. *Trichoderma asperellum*: A potential biocontrol agent for *Pythium myriotylum* causal agent of cocoyam (*Xanthosoma sagittifolium*) root rot disease in Cameroon. Crop Protection 36:18-22.
- Meepagala, K. M.; Sturtz, G. and Wedge, D. E. 2002. Antifungal constituents of the essential oil fraction of *Artemisia dracuncululus* L. var. *dracuncululus*. J. Agric. Food. Chem. 50:6989-6992.
- Menezes-Morales, J. and Hanlin, R. T. 1996. Appressoria of brazilian isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) Sacc. Causal agent of anthracnoses disease. Revista de Microbiología 27: 247-251.
- Meszka, B., Bielenin, A., 2004. Possibilities of integrated grey mould control on strawberry plantations in Poland. IOBC/wprs Bull. 27, 41-45.
- Mihaliak, C.A.; Gershenzo, J. and Croteau, R. 1991. Lack of rapid monoterpene turnover in rooted plants, implication for theories of plant chemical defense. Oecologia 87:373-376.
- Misra, N. Batra, S. and Mishra, D. 1988. Fungitoxic Properties of the Essential Oil of *Citrus limon* (L.) Burm. Against a Few Dermatophytes. Mycoses 7:380-382.
- Molina, B.E, Ronquillo, E. J., Bautista, B. S., J.R. Verde, C. J.R. and Morales, L. J. 2010. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. Postharvest Biology and Technology 57:132-137.

- Montes, B.R.; Sandoval, G.G. y Orozco, R.C. 1990. Extractos vegetales inhibidores de la germinación de urediosporas de *Uromyces phaseoli* var. *Typica* Arth. Y su espectro de acción antiesporulante. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8: 64-67.
- Morales, G.J.L. 1997. Enfermedades del fruto de aguacate, dinámica, efectos en postcosecha y control. IV curso de aprobación fitosanitario en el manejo del aguacate. Memoria. Facultad de agrobiología "Presidente Juárez". 386 p.
- Nallathambi, P.; Umamaheswari, C.; Thakore, B.B.L. and More, T.A. 2009. Post-harvest management of ber (*Ziziphus mauritiana* Lamk) fruit rot (*Alternaria alternata* Fr. Keissler) using *Trichoderma* species, fungicides and their combinations. *Crop Protection* 28:525–532
- NAS, National Academy of Sciences. 1978. Postharvest food losses in developing countries. Board on sciences and technology for international development. Washington D.C. U.S.A. 202 p.
- Niaz, Ishrat; Sitara, Uzma; Kazmi, S.A.R. and Qadri, Shahabudin. 2008. Comparison of antifungal properties of neem seed oil collected from different parts of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany* 40(1):403-408.
- Nikos, G. T. 2007. Maintaining postharvest quality of fresh produce with volatile compounds. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 8: 111–116.
- Nikos, G. T. 2009. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10:97-102.
- Nishijima, K. A., Miura, C.K., and Armstrong, J.W. 1992. Effect forced hot air treatment of papaya fruit on fruit quality and incidence of postharvest disease. *Plant Disease* 76:723-727.
- O'Keefe, M. and Farrell, F. 2000. The importance of chemical residues as a food safety issues. *Irish Journal of Agricultural and Food Researches* 39:257-264.
- Pantastico, E.B. 1979. Fisiología de la postrecolección. Manejo y utilización de frutas y hortalizas tropicales y subtropicales. Ed. Continental. México. 529 p.
- Papavizas, G.C. 1985. *Trichoderma* and *Gliocladium*. Biology, ecology and potential for biocontrol. En: *Annual Review Phytopathology* 23: 23-54.

- Patiño, V. M., Allende, R., Ortíz, M., García, R., Carrillo, A., Jiménez, B., Alviter, B., y Galindo, E. 2002. Identificación y caracterización de microorganismos con potencial de antagonismo contra *Colletotrichum gloeosporioides* causante de antracnosis en mango. Memoria del IX Congreso Nacional de Biotecnología y Bioingeniería, Veracruz, Ver. México.
- Paul, R. E., Nishijima, W. Reyes and Cabaletto, C. 1997. Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya L*): Postharvest Biology and Technology 11: 165-179.
- Paul, B. 1999. Suppression of *Botrytis cinerea* causing the grey mould diseases of grapevine by an aggressive micoparasite *Phytium radiousum*. FEMS Microbiology Letters 176: 25-30.
- Penalver, P., Huerta, B., Borge, C., Astorga, R., Romero, R., and Perea, A. 2005. Antimicrobial activity of five essential oils against origin strains of the Enterobacteriaceae family. APMIS 113(1): 1–6.
- Piotrowska, S.B and Dorszewski, J. 1996. Relationship between Potato pathogen and *Trichoderma* spp. and *Gliocladium roseum*. Phytopathologia –Polonica 11:97-101.
- Pitarokili, D.; Tzakou, O., Couladis, M. and Verykokidou, E. 1999. Composition and antifungal activity of the essential oil of *Salvia pomifera* subsp. *calycina* growing wild in Greece. J. Essential Oil Res. 11:655-659.
- Plascencia-Jatomea, M., Viniegra, G., Olayo, R., Castillo-Ortega, M.M., and Shirai, K. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. Macromolecular Bioscience 3:582-586.
- Prusky, D. 1996. Pathogen quiescence in postharvest diseases. Annual Review Phytopathology 34:413-434.
- Prusky, D., Fuchs, Y., Kobilier, I., Roth, I., Weksler, A., Shalom, Y., Fallik, E., Zauberman, G., Pesis, E., Akerman, M., Ykutiely, O., Weisblum, A., Regev, R., and Artes, L. 1999. Effect of hot water brushing, Prochloraz treatment and waxing on the incidence of black spot decay caused by *Alternaria alternata* in mangoes fruits. Postharvest Biology and Technology 15: 165-174.

- Pusey, P.L., and Wilson, C.L. 1984. Postharvest biological control of stone fruit brown rot by *Bacillus subtilis*. *Plant Disease* 78: 753-756.
- Pusey, P.L., Wilson, C.L., Hochkiss, M.W. and Francin, J.D. 1986. Compatibility *Bacillus subtilis* for postharvest control of peach brown rot with commercial fruit waxes dicloran and cold storage conditions. *Plant Disease* 70: 587-590.
- Ramezani, H., Singh, H. P., Batish, D. R., Kohli, R. K., and Dargan, J. S. 2002. Fungicidal effect of volatile oils from *Eucalyptus citriodora* and its major constituent citronellal. *New Zealand Plant Protection* 55: 327–330.
- Ramírez-Espinoza, W., Rodríguez-Álvarez, A., y Velandia-Jiménez. 1994. El efecto del extracto de eucalipto en el control de *Fusarium oxysporum* en clavel. Tesis de ingeniero agrónomo. Facultad de ciencias agropecuarias. Universidad pedagógica de Colombia. Tunja, Colombia. 80 p.
- Ramos, R.R. 2002. Curso Internacional de Papaya. Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. Guatemala, Guatemala. 52 p.
- Rassooli, I. and Mirmostafa, S.A. 2003. Bacterial susceptibility to and chemical composition of essential oils from *Thymus kotschyanus* and *Thymus persicus*. *J. Agric. Food Chem.* 51: 2200–2205.
- Reyes, A.J.C. 1996. Aplicación de productos alternativos para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de aguacate “Rincoatl”. Fundación Salvador Sánchez Colín CICTAMEX. México. Pp. 37-41.
- Rivera, G. 1991. Descripción y combate de las principales enfermedades de papaya. *In: Fruticultura especial fascículo 3 piña y papaya*. San José, Costa Rica.
- Rodríguez-Caballero, J.O., y Velandia-Jiménez, M. 1992. Evaluación del extracto de diez especies de plantas medicinales por su eficiencia en el control de la antracnosis de la curuba (*Colletotrichum* spp.) bajo condiciones de laboratorio. *Fitopatología Colombiana* 21:73-78.
- Rodriguez, A., Nerin, C. and Batlle, R. 2008. New cinnamon-based active paper packaging against *Rhizopus stolonifer* food spoilage. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56(15): 6364–6369.

- Rollan, M.C., Nico, A.I. y Monaco, C. 1999. Efecto de la temperatura sobre la interacción *in vitro* entre especies de *Trichoderma* y *Sclerotinia sclerotium*, *S. minor* y *S. Rolfsii*. Investigación Agraria, Producción y Protección Vegetal 14:33-48.
- SAGARPA, 2010. [www.sagarpa.gob.mx](http://www.sagarpa.gob.mx). Citada el 10 marzo del 2013
- Sanders, G.M., Korsten, L. and Wehner, F.C. 2000. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in south Africa. European Journal of Plant Pathology 106: 745-762.
- Schilders, J.K. and Atwell, E. K. 1963. Effect of a mold. *Trichoderma viridae* on decay birch by four storage-rot fungi. Forest Products Journal 13:264-265.
- Serrano, M., Martinez-Romero, D., Castillo, S., Guillen, F. and Valero, D. 2005. The use of the natural antifungal compounds improves the beneficial effect of MAP in sweet cherry storage. Innovative Food Science and Emerging Technologies 6: 115–123.
- Serrano-Carreón, L. y Galindo-Fentanes, E. 2006. Control biológico de fitopatógenos: un reto multidisciplinario. In: Memorias del XVII Curso Nacional de Control Biológico. Manzanillo, Colima. pp. 173-197.
- Singh, S.P. 1980. Biological control of insect pests of citrus. Biological Control Insect Pests Weeds. 237 pp.
- Singh, H. B., Singh, A., and Srivastava, S. 2007. Effect of substrates on growth and shelflife of *Trichoderma harzianum* and its use in biocontrol of diseases. Bio-re. Tec 98: 470-473.
- SINITOX. (2004). Sistema Nacional de Informacoes Toxicofarmacológicas. Recuperado el 2013 de marzo de 08, de Estatística Anual de casos de intoxicação e envenenamento: [<http://www.fiocruz.br/sinitox>].
- Sivakumar, S. 2001. Alternative methods to control postharvest diseases of Rambutan. University of Colombo. Sri Lanka: University of Colombo.
- Sivakumar, D.; Wilson-Wijeratnam, R.S.; Wijesunderab, R.L.C. and Abeyesekerea, M. 2002. Control of postharvest diseases of rambutan using cinnamaldehyde. Crop Protection 21(9):847-852.
- Smoot, J. J. and Segall, R. H. 1963. Hot water as a postharvest control of mango anthracnose. Plant Disease Reporter 49: 739-742.

- Snowdon, A. L. 1990. A colour atlas of postharvest diseases and disorders of fruits and vegetables. Vol. 1. General introduction and fruits. CRC press. Inc. Inglaterra. 302 p.
- Sousa Rocha, J.R., and Oliveira, N.T. 1998. *In vitro* antagonistic potential of *Trichoderma* spp. against *Colletotrichum gloeosporioides* agent of antracnose in the passion fruit (Passiflora). Boletín Micológico 13:103-110.
- Spadaro, D., and Gullino, M. L. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit disease. International Journal of Food Microbiology 91: 185-194.
- Spalding, D. H. 1986. Evaluation of various treatments for control of postharvest decay of Florida mangoes. Proceedings of the Florida State Horticultural Society 99: 97-99.
- Stevens, C.V., Khan, A., Lu, J.Y., Wilson, C.L. Pusey, P. L., Igwegbe, E.C.K., Kabwe, K., Mafolo, Y., Liu J., Chalutz, E. and Droby, S. 1997. Integration of ultraviolet light with yeast treatment for control of postharvest storage rot of fruits and vegetables. Biological Control 10: 98-103.
- Suppakul, P., Miltz, J., Sonneveld, K., and Bigger, S.W., 2003. Active packaging technologies with an emphasis on antimicrobial packaging and its applications. J. Food Sci. 68: 408–420.
- Suksrikarm, B., 1987. Herb and Spice. Amorn Printing, Thailand.
- Sutton, B C. *The Coelomycetes: Fungi Imperfecti with Picnidia, Acervuli and Stromata.* 1992. Commonwealth Mycological Institute.
- Tansey, M.R. and Appleton, J.A. 1975. Inhibition of fungal growth by garlic extract. Micología 67: 409-413.
- Tavares, G. M. e Souza, P. E. 2005. Efeito de fungicidas no controle in vitro de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). Ciência e Agrotecnologia 20(1):52-59.
- Tilman, D., Cassman, K. G., Matson, P. A., Naylor, R., and Polasky, S. 2002. Agricultural sustainability and intensive production practices. Nature 418: 671–677.



- Tripathi, P. and Dubey, N. K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 32:235–245.
- Tronsmo, A. and Dennis, C. 1977. The use of *Trichoderma* species to control strawberry fruit rots. *Neth. J. Plant Pathol.* 83:449-455.
- Tzortzakis, Nikos G. 2009. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science y Emerging Technologies* 10(1):97-102.
- Vanneste, J.L. and Boyd, R.J., 2002. Inhibition of *Erwinia amylovora* and potential antagonistic bacteria by essential oils and natural compounds. *Acta Horticulturae* 590: 315–317.
- Vásquez-López, Alfonso; Hernández-Castro, Elías; Mora-Aguilera, J. Antonio; Nava Díaz, Cristian y Sánchez-García, Francisco. 2012. Etiología y epidemiología de la necrosis de flores y frutos juveniles del papayo (*Carica papaya* L.) en Guerrero, México. *Agrociencia* 46(8):757-767.
- Verhoeff, K. 1974. Latent infection by fungi. *Annual Review of Phytopathology* 12:99-100.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E. L., Marra, R., Woo, S. L., and Lorito, M. 2008. *Trichoderma*–plant–pathogen interactions. *Soil Biology and Biochemistry* 40: 1-10.
- Wagner, H. and Bladt, S. 1996. *Plant Drug Analysis* Springer Verlag. Berlin. 384 p.
- Wajid, K. M. and Singh, R. K. 1974 Anthracnose of arhar incited by *Colletotrichum truncatum*. *Indian Phytopathology* 27: 622-624.
- Wang, R., Wang, R. and Yang, B. 2009. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 10:289-292.
- Wang, C. J. and Liu, Z. Q. 2007. Foliar uptake of pesticides—Present status and future challenge. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 87: 1-8.
- Wijeratnam S. W. and Weerasinghea, Y. D. 2008. Host Specificity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *Botryodiplodia theobromae* Isolates from Mango, Papaya and Rambutan and their Response to *Trichoderma harzianum*. Conference on

- International Research on Food Security, Natural Resource Management and Rural Development. University of Hohenheim, October 7-9, 2008.
- Wijesinghe, C. J., Wilson-Wijeratnam, R. S., Samarasekara, J. K., and Wijesundera, R. L. 2010. Biological control of *Thielaviopsis paradoxa* on pineapple by an isolate of *Trichoderma asperellum*
- Wijesinghe, C. J., Wilson-Wijeratnam, R. S., Samarasekara, J. K., and Wijesundera, R. L. 2011. Development of a formulation of *Trichoderma asperellum* to control black rot disease on pineapple caused by (*Thielaviopsis paradoxa*). Crop Protection 30: 300-306.
- Wilson, C. L. and Wisniewsky, M.E. 1989. Biological control of postharvest disease of fruits or vegetables: an emerging technology. Annual Review of Phytopathology 27:425-441.
- Wilson, C. L.; Solar, J. M.; El Ghaouth, A. and Wisniewski, M.E. 1997. Rapid Evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. Plant Disease 81: 204-210.
- Wilson, M. and Backman, P.A. 1998. Handbook of pest management. Ed: Rubozan, J.R. (Ed) Biological control of plant pathogens. P.p. 309-335. New York: Marcel-Dekker.
- Wisniewsky, M., Wilson, C.L., and Hershberger, W. 1989. Characterization of inhibition of *Rhizopus stolonifer* germination and growth by *Enterobacter cloacae*. Canadian Journal of Botany 67:2317-2323.
- Woodhead, S.H., OLeary, A. L., OLeary, D. J., and Rabatin, S.C. 1990. Discovery, development and registration of a biocontrol agent from an industrial perspective. Canadian Journal of Plant Pathology 12:328-331.
- Yang, V.W., and Clausen, C.A., 2007. Antifungal effect of essential oils on southern yellow pine. Int. Biodeter. Biodegrad 59:302–306.
- Zoffoli, J.P., Latorre, B.A. and Naranjo, P. 2008. Hairline, a postharvest cracking disorder in table grapes induced by sulfur dioxide. Postharvest Biol. Technol. 547(1):90-97.