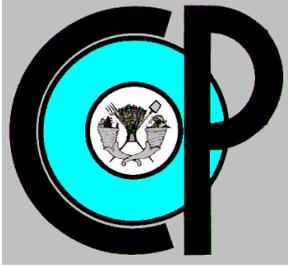


COLEGIO DE POSTGRADUADOS



INSTITUCIÓN DE ENSEÑANZA E INVESTIGACIÓN EN CIENCIAS AGRÍCOLAS

CAMPUS MONTECILLO

PROGRAMA DE POSTGRADO EN FITOSANIDAD

FITOPATOLOGÍA

CARACTERIZACIÓN DE *Colletotrichum* spp. EN FRUTOS DE PAPAYA CV. 'MARADOL' DE DIFERENTES ESTADOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA Y SU CONTROL POSTCOSECHA

ALMA ADELA LIRA VARGAS

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL
PARA OBTENER EL GRADO DE:

DOCTORA EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MÉXICO

2017

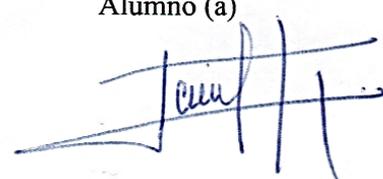
CARTA DE CONSENTIMIENTO DE USO DE LOS DERECHOS DE AUTOR Y DE LAS REGALIAS COMERCIALES DE PRODUCTOS DE INVESTIGACION

En adición al beneficio ético, moral y académico que he obtenido durante mis estudios en el Colegio de Postgraduados, el que suscribe Alma Adela Lira Vargas, Alumno (a) de esta Institución, estoy de acuerdo en ser partícipe de las regalías económicas y/o académicas, de procedencia nacional e internacional, que se deriven del trabajo de investigación que realicé en esta institución, bajo la dirección del Profesor Dr Daniel Nieto Angel, por lo que otorgo los derechos de autor de mi tesis Caracterización de Colletotrichum spp. en frutos de papaya cv. 'Maradol' de diferentes estados de la República Mexicana y su control postcosecha

y de los producto de dicha investigación al Colegio de Postgraduados. Las patentes y secretos industriales que se puedan derivar serán registrados a nombre el colegio de Postgraduados y las regalías económicas que se deriven serán distribuidas entre la Institución, El Consejero o Director de Tesis y el que suscribe, de acuerdo a las negociaciones entre las tres partes, por ello me comprometo a no realizar ninguna acción que dañe el proceso de explotación comercial de dichos productos a favor de esta Institución.

Montecillo, Mpio. de Texcoco, Edo. de México, a 23 de Noviembre de 2017


Firma del
Alumno (a)


Dr. Daniel Nieto Angel
Vo. Bo. del Consejero o Director de Tesis

La presente tesis titulada: Caracterización de *Colletotrichum* spp en frutos de papaya cv. 'Maradol' de diferentes estados de la República Mexicana y su control postcosecha

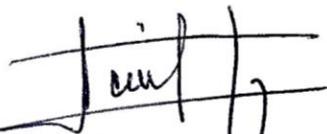
realizada por el (la) alumno (a): Alma Adela Lira Vargas

bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

DOCTORA EN CIENCIAS
FITOSANIDAD
FITOPATOLOGÍA

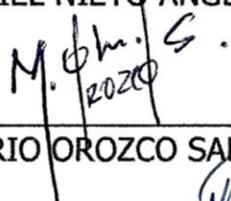
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



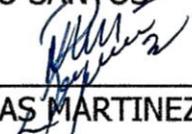
DR. DANIEL NIETO ÁNGEL

ASESOR



DR. MARIO OROZCO SANTOS

ASESORA



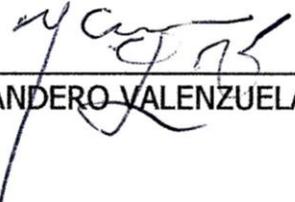
DRA. REYNA I. ROJAS MARTINEZ

ASESORA



DRA. MA. ANDREA TREJO MÁRQUEZ

ASESORA



DRA. NADIA LANDERO VALENZUELA

Montecillo, Texcoco, Estado de México, noviembre de 2017

CARACTERIZACIÓN DE *Colletotrichum* spp. EN FRUTOS DE PAPAYA CV. ‘MARADOL’ DE DIFERENTES ESTADOS DE LA REPÚBLICA MEXICANA Y SU CONTROL POSTCOSECHA

Alma Adela Lira Vargas, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2017

RESUMEN

La papaya (*Carica papaya* L.) es una fruta altamente perecedera, por lo que el control de la maduración es esencial para aumentar la vida útil, así como disminuir los síntomas de la antracnosis y teniendo en cuenta los recientes avances taxonómicos en la sistemática del género *Colletotrichum*, este trabajo se dividió en cinco fases con los siguientes objetivos: 1ra. fase, caracterizar molecular, morfológica y patogénicamente diferentes especies de *Colletotrichum* spp. en frutos de papaya cv. Maradol de diferentes estados de la República Mexicana, 2da: determinar la composición fitoquímica del extracto etílico vegetal de hojas de guayaba (*Psidium guajava*), así como la evaluación de la efectividad biológica *in vitro* sobre seis especies de *Colletotrichum* para el manejo de la antracnosis en frutos de papaya cv. Maradol, 3ra: evaluar el efecto de un recubrimiento comestible a base de carboximetilcelulosa 0.5 % adicionado con extracto etanólico de hoja de guayaba (*Psidium guajava*) sobre la calidad y el control de tres especies de *Colletotrichum* spp. en papaya cv. Maradol, 4ta: evaluar la actividad antifúngica de cinco plantas medicinales de uso frecuente en Brasil (*Annona muricata*, *Azadirachta indica*, *Baccharis trimera*, *Guarea trichilioides*, *Zingiber officinale*) de forma *in vitro* sobre *Colletotrichum* sp. para el control de la antracnosis en frutos de papaya y 5ta: evaluar los tratamientos: agentes de control biológico (*Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*), químico (azoxistrobin, cloruro de calcio, fosfito de potasio) y extractos vegetales (extracto comercial de jengibre y de guanábana), en la calidad y control de antracnosis en frutos de papaya cv. Sunrise.

En la metodología de la 1er fase se utilizaron muestras de material enfermo que se colectaron de 23 municipios de 10 estados productores. El aislamiento de *Colletotrichum* spp. se realizó con el método monospórico y de cámara húmeda, posteriormente se hizo una extracción de ADN genómico, amplificación de Reacción en Cadena de Polimerasa con región Espacio de transcripción interna y genes que codificaron para Actina, secuenciación en MacroGen y un análisis filogenético mediante un alineamiento multilocus con dos genes combinados (ITS y ACT) usando el programa SeaView. La

caracterización morfológica (coloración de las cepas, aspecto, crecimiento del micelio, forma y tamaño de conidios, tasa de esporulación) y prueba de patogenicidad (crecimiento miceliar de cepa en frutos de papaya) se llevó a cabo con seis aislamientos que resultaron diferentes en su identificación con ACT (*C. cliviae*: V22, *C. truncatum*: Co19, *C. brevisporum*: T15, *C. karstii*: M15, *C. aenigma*: V39, *C. gloeosporioides*: G15). En la 2da fase la obtención de los extractos se utilizaron hojas de guayaba silvestre cv ‘Criolla’ y se empleó el método de extracción asistida por ultrasonido de baja frecuencia; la identificación de flavonoides en los extractos se hizo por cromatografía de líquidos de alta resolución y electroforesis capilar; y para la evaluación de su actividad antifúngica se realizó por el método de microdilución-difusión en agar, probando cinco concentraciones del extracto etílico: 100, 150, 200, 250 y 300 ppm de extracto para seis especies de *Colletotrichum* (*C. aenigma*, *C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii* y *C. truncatum*) previamente aisladas e identificadas de frutos de papaya cv ‘Maradol’. En la 3er fase se utilizaron papayas cv. Maradol que fueron lavadas con agua y jabón, desinfestadas con hipoclorito de sodio al 2%, enjuagadas, secadas, inoculadas con 50 µL de una suspensión de esporas de *Colletotrichum* spp. (6×10^5 esporas/mL) de cada cepa estudiada (*C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, y *C. brevisporum*) en una zona específica del fruto (cinco zonas por fruto y se trabajó con cuatro frutos por tratamiento), incubados (en cámara húmeda 24 h a 25°C), cabe aclarar que la inoculación e incubación solo se realizó en frutos asignados para la prueba de severidad. Las papayas fueron sometidas a diversos tratamientos [1: sin recubrimiento (SR), 2: con recubrimiento sin adición de extracto (CR), 3: con recubrimiento y adición de extracto (CRE)] por inmersión durante tres min, secadas y almacenadas (15°C por 12 d), evaluando cada dos días parámetros de calidad (color, sólidos solubles totales, acidez titulable, vitamina C, firmeza, pérdida de peso), respiración y efecto antifúngico contra la antracnosis (índice de severidad). En la 4ta fase la obtención de extractos se realizó con hojas de plantas (*Annona muricata*, *Azadirachta indica*, *Baccharis trimera*, *Guarea trichilioides* y *Zingiber officinale*) y se obtuvieron por el método de maceración y su actividad antifúngica se realizó con el método de microdilución-difusión en agar, probando cinco concentraciones del extracto (0, 50, 100, 150 y 200 ppm) contra *Colletotrichum* sp. En la 5ta fase el estudio tuvo dos partes: en la primera se seleccionaron los tres mejores tratamientos, uno de cada tipo (biológico, químico, extracto vegetal) en función de su efecto antifúngico sobre *Colletotrichum* sp. y en la segunda se evaluó el efecto postcosecha que cada tratamiento seleccionado sobre los parámetros de calidad [pérdida

de peso, color, firmeza, sólidos solubles totales (SST), pH, acidez titulable (AT), contenido de ácido ascórbico (AA)].

Con los resultados de la 1ra fase se determinó que la principal especie asociada a la antracnosis en papaya fue *C. brevisporum* con una frecuencia del 60% en los aislados evaluados. En la 2da fase los resultados mostraron que el extracto de guayaba principalmente presentó los polifenoles: florizidina, epicatequina, quercitina, catequina y ácido ascórbico. En la actividad antifúngica se mostró que, a mayor concentración del extracto, mayor fue el efecto inhibitorio y que la concentración de 300 ppm fue la óptima para controlar el 100% de crecimiento de las seis especies evaluadas, además de que se tuvo efecto significativo entre cada especie evaluada. En la 3ra fase los resultados mostraron que las papayas CR tuvieron significancia en los parámetros evaluados (color, sólidos solubles totales, acidez titulable, vitamina C, pérdida de peso, firmeza y respiración) con respecto a los no recubiertos (SR), en el índice de severidad también se mostró diferencia significativa, pero fue aún mayor en recubrimientos con la adición de extracto (CRE). En la 4ta fase el extracto de hojas de guanábana (*A. muricata*) presentó el mayor contenido de fenoles y provocó la mayor actividad antimicrobiana sobre *Colletotrichum* sp., a una concentración de 200 ppm de este mismo extracto ya que se obtuvo el 100% de inhibición del mismo hongo. En la 5ta fase como resultado de la primera fase se obtuvo que los tres mejores métodos de cada tipo para el control de antracnosis fueron: *T. longibrachiatum*, cloruro de calcio y extracto comercial de jengibre, con los que se disminuyó un 67, 42 y 60% menor índice de severidad, respectivamente con respecto al control.

Palabras clave: *Colletotrichum gloeosporioides*, Extracto vegetal, Recubrimiento biodegradable, Polifenoles, Flavonoides.

CHARACTERIZATION OF *Colletotrichum* spp. IN FRUITS OF PAPAYA CV. 'MARADOL' FROM DIFFERENT STATES OF THE MEXICAN REPUBLIC AND POST-HARVEST CONTROL

Alma Adela Lira Vargas, Dra.
Colegio de Postgraduados, 2017

ABSTRACT

The papaya (*Carica papaya* L.) is a highly perishable fruit, so the control of maturation is essential to increase the shelf life, as well as decrease the symptoms of anthracnose and taking into account the recent taxonomic advances in the systematics of the genus *Colletotrichum*, this work was divided into five phases with the following goals: 1st. phase, characterize molecularly, morphologically and pathogenically different species of *Colletotrichum* spp. isolated from fruits of papaya cv. Maradol, harvested from different states of the Mexican Republic, 2nd, determine the phytochemical composition of the vegetable ethyl extract of guava leaves (*Psidium guajava*), as well as the evaluation of the *in vitro* biological effectiveness on six species of *Colletotrichum* for the management of anthracnose in papaya fruits cv. Maradol, 3rd, evaluate the effect of an edible coating based on 0.5% carboxymethylcellulose added with ethanolic extract of guava leaf (*Psidium guajava*) on the quality and control of three species of *Colletotrichum* spp. in papaya cv. Maradol, 4th: to evaluate the antifungal activity of five medicinal plants frequently used in Brazil (*Annona muricata*, *Azadirachta indica*, *Baccharis trimera*, *Guarea trichilioides*, *Zingiber officinale*) *in vitro* on *Colletotrichum* sp. for the control of anthracnose in papaya, and 5th, fruits evaluate the treatments: biological control agents (*Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*), chemical (azoxystrobin, calcium chloride, potassium phosphite) and plant extracts (commercial extract of ginger and guanábana), in the quality and control of anthracnose in fruits of papaya cv. Sunrise.

In the methodology of the 1st phase, samples of diseased material were used and collected from 23 municipalities in 10 producing states. The isolation of *Colletotrichum* spp. was performed with the monosporic and wet-chamber method, then an extraction of genomic DNA was carried out, Polymerase Chain Reaction amplification with region of Internal Transcription Space and genes that codified for Actin, sequencing in MacroGen and a phylogenetic analysis through an alignment multilocus with two genes combined (ITS and ACT) using the SeaView program. The morphological characterization (coloration of the strains, appearance, growth of the mycelium, shape and size of conidia, sporulation

rate) and pathogenicity test (mycelial growth of strain in papaya fruits) was carried out with six isolations that were different in their identification with ACT (*C. cliviae*: V22, *C. truncatum*: Co19, *C. brevisporum*: T15, *C. karstii*: M15, *C. aenigma*: V39, *C. gloeosporioides*: G15). In the 2nd phase the extracts were obtained using wild guava leaves cv 'Criolla' and the method of low frequency ultrasound-assisted extraction was used; the identification of flavonoids in the extracts was done by high performance liquid chromatography and capillary electrophoresis; and for the evaluation of its antifungal activity was performed by the method of microdilution-diffusion in agar, testing five concentrations of the ethyl extract: 100, 150, 200, 250 and 300 ppm of extract for six species of *Colletotrichum* (*C. aenigma*, *C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii*, and *C. truncatum*) previously isolated and identified from papaya cv 'Maradol' fruits. In the 3rd phase, papayas cv. Maradol were washed with soap and water, disinfected with 2% sodium hypochlorite, rinsed, dried, inoculated with 50 µL of a spore suspension of *Colletotrichum* spp. (6×10^5 spores/mL) of each strain studied (*C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, and *C. brevisporum*) in a specific area of the fruit (five zones per fruit and worked with four fruits per treatment), incubated (in wet chamber 24 h at 25 °C), it should be clarified that the inoculation and incubation was only performed on fruits assigned for the severity test. The papayas were subjected to various treatments [1: uncoated (SR), 2: coated without addition of extract (CR), 3: with coating and addition of extract (CRE)] by immersion for three min, dried and stored (15 °C for 12 d), evaluating quality parameters every two days (color, total soluble solids, titratable acidity, vitamin C, firmness, weight loss), respiration and antifungal effect against anthracnose (severity index). In the 4th phase, extracts were obtained with leaves of plants (*Annona muricata*, *Azadirachta indica*, *Baccharis trimera*, *Guarea trichilioides*, and *Zingiber officinale*) and were obtained by the maceration method and their antifungal activity was performed with the microdilution method agar diffusion, testing five concentrations of the extract (0, 50, 100, 150, and 200 ppm) against *Colletotrichum* sp. In the 5th phase the study had two parts: in the first, the three best treatments were selected, one of each type (biological, chemical, vegetal extract) based on its antifungal effect on *Colletotrichum* sp., and in the second, the postharvest effect of each treatment selected on the quality parameters [weight loss, color, firmness, total soluble solids (SST), pH, titratable acidity (AT), ascorbic acid content (AA)] was evaluated.

With the results of the 1st phase it was determined that the main species associated with anthracnose in papaya was *C. brevisporum* with a frequency of 60% in the isolates

evaluated. In the 2nd phase the results showed that the guava extract mainly presented the polyphenols: florizidin, epicatechin, quercetin, catechin, and ascorbic acid. In the antifungal activity, it was shown that, the greater the concentration of the extract, the greater the inhibitory effect and the 300 ppm concentration was the optimum to control the 100% growth of the six species evaluated, as well as having a significant effect between each evaluated species. In the third phase the results showed that the papayas CR had significance in the evaluated parameters (color, total soluble solids, titratable acidity, vitamin C, weight loss, firmness and respiration) with respect to the uncoated (SR), in the severity index also showed significant difference, but was even higher in coatings with the addition of extract (CRE). In the 4th phase, the guanabana leaves extract (*A. muricata*) had the highest phenol content and caused the highest antimicrobial activity on *Colletotrichum* sp., at a concentration of 200 ppm of this same extract, since 100% was obtained inhibition of the same fungus. In the 5th phase as a result of the first phase it was obtained that the three best methods of each type for the control of anthracnose were: *T. longibrachiatum*, calcium chloride and commercial extract of ginger, with which it decreased by 67, 42 and 60% lower severity index, respectively with respect to control.

Key words: *Colletotrichum gloeosporioides*, Vegetable extract, Antifungal activity, Biodegradable coating, Polyphenols, Flavonoids.

DEDICATORIA

Dedico esta tesis **a mi vida** por haberme dado la oportunidad de realizarla, de enseñarme que en un abrir y cerrar de ojos todo puede acabar y que gracias a ella este trabajo se concluyó.

Dedico esta tesis con mucho amor, respeto, admiración, gratitud y demás sentimientos que tengo a mi madre **Cecilia Vargas Cuellar** por haberme dado su amor, comprensión, apoyo, confianza, cuidados, consejos e infinidad de valores que me han formado como persona. Le agradezco el haberme brindado la vida y todo lo que me ha enseñado de ella, le agradezco por ser mi amiga, porque ha caminado junto a mí en muchas situaciones adversas y principalmente le agradezco por ser mi madre.

También dedico esta tesis con mucho recuerdo a mi difunto esposo **Efrén Escobedo Avilés** por haber compartido un poco de su vida conmigo, le agradezco haber sido mi amigo, mi amante, mi esposo y un amor en mi vida, le agradezco porque siempre me aconsejó y apoyó para continuar estudiando.

AGRADECIMIENTOS

A la Vida y a Dios por otorgarme la oportunidad de tener y ser lo que soy y por cumplir una meta más del camino.

Al Dr. Daniel Nieto Ángel por ser mi consejero, por ser amigo, por abrirme las puertas de su laboratorio, por ser un ejemplo a seguir, por creer en mí y brindarme su apoyo y confianza, por compartir muchas pláticas de su vida personal, por ser mi profesor y por darme la oportunidad de trabajar con usted.

Al Colegio de Posgraduados por darme todos y cada uno de los conocimientos para mi formación profesional, por brindarme la oportunidad de conocer a cada uno de mis profesores a los cuales también les agradezco.

Al apoyo financiero de CONACYT por haberme brindado apoyo económico durante el trayecto de mi doctorado.

A mis asesores (Dr. Mario Orozco, Dra. Reyna Rojas, Dra. Andrea Trejo, Dra. Nadia Landeros) por regalarme muchos momentos de su valioso tiempo para leer, revisar y darme un consejo para mejor este trabajo y formar personas más preparadas, les agradezco la labor que realizan, el amor, dedicación, esfuerzo, entrega y demás actitudes que vi en ustedes para siempre ser mejor, les agradezco ser ejemplo de muchas personas en especial de la mía. MILGRACIAS

Al Dr. Abel por recibirme calurosamente en Brasil, por aceptar que trabajaré en su laboratorio, por demostrarme que el campo es bello, es una perfección de la naturaleza, que es tan delicado como uno y que hay que cuidar de él, por ser un excelente profesor y una excelente persona.

A la Dra. Gabriela Vargas por ayudar a todos los que la necesitan sin pedir nada a cambio, le agradezco haberme permitido trabajar en su laboratorio.

A Greta Saito Rosas por ser la persona que es, alegre, espontánea, sincera y sobre todo por esas fotos perfectas que solo ella sabe tomar.

A mi sobrina Yatzil Itzayana por ser una nueva luz en vida y en la casa.

A mis hermanos Cecilia y Adrián por estar conmigo en las buenas y malas, por soportarme, por quererme y sentir que siempre puedo contar con ellos, a pesar de nuestras constantes peleas.

A Ernesto Girón por estar con mi madre y ser su apoyo y el mío a pesar de tener muchas diferencias.

A toda mi familia por confiar en mí, por apoyarme y darme ánimos de terminar una meta más, por ser esos muéganos dulces en mi vida, por enseñarme que es la unidad.

A mi abuelita Ma. de Jesús y a sus hijas Claudia y Edith por apoyarme en muchas ocasiones de mi infancia, por todos los consejos, por estar conmigo en muchos de mis tropiezos, por quererme y permitirme ser una más de su familia.

A mis amiguitas del Colpos (Ivonne, Laurita, Elsa, Elizabeth, Leticia) por haberme aguantado, por compartir largas jornadas de trabajo juntas, por la infinidad de favores que me hicieron cada uno de ellas, por compartir muchos tiempos de ocio, cine, fiestas y demás diversiones que tuve con ustedes, muchas gracias.

A mis más antiguas amigas (Ariadna Lobera, Selene Pascual, Ana Sandoval) por brindarme su amistad durante casi más de 10 años, por sus consejos, por todos los momentos que pasamos juntas, por su apoyo, por tolerarme y por ser quien son.

A mis hermanos de la danza (Juan, Irma, Edgar, Brandon, Ocelt, Emiliano e Iván) que han sido mucha luz y mucha fuerza en mi camino.

A todos los que conocí en Brasil (John, Ivan, Ranyelli, Jesileine, Denisse, Diego, Bixmar, Joniulson, Alex, Cintia, Adriana, Tallita) por hacer que mi estancia fuera lo más placentera, por ayudarme y enseñarme lo que saben, pero muy especialmente agradezco a **Jamire y Danielle** por ser para mí más que una asistente técnica, por brindarme su amistad y darme consejos, por escuchar muchas de mis tonterías, por mostrar ese esfuerzo y dedicación durante la realización de este trabajo para que saliera lo mejor posible, por todo su trabajo en el laboratorio.

“Nehuatl nictlazotla in centzontotl
icuicauh,nehuatl nictlazotla in
chalchihuitl Itlapaliz
ihuan in ahuiacmeh xochimeh;
zan oc cenca noicniuhtzin in tlatatl,
Nehuatl nictlazotla.”

“Amo el canto del cenzone,
pájaro de cuatrocientas voces.
Amo el color del jade
y el enervante perfume de las flores,
pero más amo a mi hermano: el hombre.”

Nezahualcōyotl



CONTENIDO

RESUMEN.....	iv
ABSTRACT	vii
LISTA DE CUADROS	xvi
LISTA DE FIGURAS	xvii
INTRODUCCIÓN.....	1
MARCO TEÓRICO	3
Origen e historia	3
Taxonomía y morfología	3
Importancia económica	5
Variedades.....	6
Composición química.....	8
Plagas y enfermedades	10
Manejo postcosecha.....	14
Tratamientos postcosecha.....	15
LITERATURA CITADA	18
CAPÍTULO I. Caracterización molecular, morfológica y patogénica.....	24
1.1. RESUMEN	24
1. ABSTRACT	25
2. INTRODUCCIÓN	25
3. MATERIAL Y MÉTODOS	28
1.1.1. Obtención de la colección.....	28
1.1.3. Caracterización molecular	28
1.1.4. Caracterización morfológica.....	30
1.1.5. Prueba de patogenicidad	31
4. RESULTADOS	31
1.1.6. Caracterización molecular	31
1.1.7. Caracterización morfológica.....	33
1.1.8. Patogenicidad	37
5. DISCUSIÓN	39
1.1.9. Caracterización molecular	39
1.1.10. Caracterización morfológica	40
1.1.11. Patogenicidad	42
6. CONCLUSIÓN	43
7. LITERATURA CITADA.....	44
2. CAPÍTULO II. Caracterización química de polifenoles de hoja de guayaba (<i>Psidium guajava</i>) y su efecto antifúngico sobre seis especies de <i>Colletotrichum</i>	51
2.1. RESUMEN	51
2.2. ABSTRACT.....	52
2.3. INTRODUCCIÓN	53
2.4. MATERIALES Y MÉTODOS	55
2.4.1. Material vegetal	55

2.4.2.	Obtención de extractos	55
2.4.3.	Identificación de flavonoides: HPLC-DAD.....	55
2.4.4.	Identificación de flavonoides: electroforesis capilar	56
2.4.5.	Efecto sobre el crecimiento micelial.....	56
2.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	57
2.5.1.	Identificación de flavonoides en extracto de hoja de guayaba.....	57
2.5.2.	Pruebas <i>in vitro</i> de extracto de hoja de guayaba.....	60
2.6.	CONCLUSIÓN.....	66
2.7.	LITERATURA CITADA	66
3.	CAPITULO III. Aplicación post-cosecha de carboximetilcelulosa con extracto de hoja de guayaba (<i>Psidium guajava</i>) sobre la calidad y el control de antracnosis en papaya (<i>Carica papaya</i> L.).....	72
3.1.	RESUMEN	72
3.2.	ABSTRACT.....	73
3.3.	INTRODUCCIÓN	74
3.4.	MATERIALES Y MÉTODOS	77
3.4.1.	Obtención de extractos	77
3.4.2.	Elaboración de recubrimiento.....	78
3.4.3.	Aplicación de recubrimientos	78
3.4.4.	Parámetros de calidad.....	79
3.4.5.	Respiración.....	79
3.4.6.	Efecto antifúngico.....	79
3.4.7.	Contenido de fenoles	80
3.4.8.	Actividad enzimática de poligalacturonasa	80
3.4.9.	Análisis estadístico	81
3.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	81
3.5.1.	Parámetros de calidad.....	81
3.5.2.	Respiración.....	86
3.5.3.	Severidad e incidencia	87
3.5.4.	Contenido de fenoles	90
3.5.5.	Actividad enzimática de exo-poligalacturonasa (Exo-PG).....	91
3.6.	CONCLUSIÓN.....	92
3.7.	LITERATURA CITADA	92
4.	CAPITULO IV. Efecto inhibitorio de extractos etílicos de plantas medicinales de Brasil en el control <i>in vitro</i> de <i>Colletotrichum</i> sp.....	101
4.1.	RESUMEN	101
4.2.	ABSTRACT.....	102
4.3.	INTRODUCCIÓN	102
4.4.	MATERIAL Y MÉTODOS.....	105
4.4.1.	Obtención de extractos	105
4.4.2.	Determinación de fenoles	105
4.4.3.	Efecto antifúngico.....	106
4.4.4.	Análisis estadístico	106
4.5.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	106

4.5.1. Contenido de fenoles	106
4.5.2. Efecto antifúngico.....	107
4.6. CONCLUSIÓN.....	110
4.7. LITERATURA CITADA	111
5. CAPITULO V. Tratamientos químicos, agentes de control biológico y extractos vegetales en postcosecha sobre la calidad y control de antracnosis en papaya cv. Sunrise de Brasil	116
5.1. RESUMEN	116
5.2. ABSTRACT.....	117
5.3. INTRODUCCIÓN	117
5.4. MATERIALES Y MÉTODOS	121
5.4.1. Aislamiento de <i>Colletotrichum</i> sp.	121
5.4.2. Material biológico.....	121
5.4.3. Efecto antifúngico.....	121
5.4.4. Parámetros de calidad	122
5.4.5. Análisis estadístico	123
5.5. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	123
5.5.1. Efecto antifúngico.....	123
5.5.2. Parámetros de calidad	128
5.6. CONCLUSIÓN.....	134
5.7. LITERATURA CITADA	134

LISTA DE CUADROS

	Página
Cuadro 1. Información taxonómica de <i>Carica papaya</i>	3
Cuadro 2. Descripción morfológica del papayo.	4
Cuadro 3. Principales variedades de papayas en México.	7
Cuadro 4. Composición química de la papaya en estado verde y maduro en 100 g de porción comestible.	8
Cuadro 5. Plagas de mayor importancia que afectan el cultivo de papaya en México.	10
Cuadro 6. Principales enfermedades que afectan al fruto de la papaya en México.	12
Cuadro 1.1. Origen geográfico, nomenclatura y número de accesión en el GenBank de aislados de frutos de papaya Cv ‘Maradol’ en México.	31
Cuadro 1.2. Caracterización morfológica de aislamientos de <i>Colletotrichum</i> spp. de frutos de papaya cv. ‘Maradol’.	36
Cuadro 1.3. Seguimiento fotográfico de papayas cv ‘Maradol’ inoculadas con seis especies de <i>Colletotrichum</i> para determinar su patogenicidad.	38
Cuadro 2.1. Identificación de compuestos polifenólicos en extracto etílico de hoja de guayaba (<i>Psidium guajava</i> L.) por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-DAD) y electroforesis capilar con detector con arreglo de diodos (EC-DAD).	59
Cuadro 4.1. Seguimiento fotográfico del crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp. a los 10 d de evaluación sometido a las diferentes concentraciones de diversos extractos etílicos.	110
Cuadro 5.1. Tratamientos aplicados a papaya para el control de antracnosis.	122
Cuadro 5.2. Seguimiento fotográfico del control de <i>Colletotrichum</i> sp. con diferentes tratamientos sobre el índice de severidad de antracnosis.	128
Cuadro 5.3. Aspecto visual de la aplicación de <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , cloruro de calcio y extracto de jengibre en papaya cv. Sunrise, durante su almacenamiento a 20±2°C y 85% de HR.	131
Cuadro 5.4. Cambios en los sólidos solubles totales, pH, acidez titulable y contenido de ácido ascórbico en papaya cv. Sunrise tratada con <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , cloruro de calcio y extracto de jengibre, durante su almacenamiento a 20±2°C y 85% de HR.	133

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Cultivo de papaya.	3
Figura 2. Producción a nivel mundial de la papaya en el 2015.	5
Figura 3. Producción agrícola (Riego+ Temporal) de papaya en 2015.	6
Figura 4. Grados de madurez en la papaya después de la cosecha: 1. Verde; 2. 3/4 verde; 3. 2/4 verde; 4. 2/4 amarillo; 5. 3/4 amarillo; 6. Amarilla o madura maciza.	8
Figura 1.1. Árbol filogenético con máxima verosimilitud que muestra la relación entre los aislamientos de <i>Colletotrichum</i> de frutos de papaya Cv ‘Maradol’ generada por sus ITS-ACT y el método de máxima parsimonia se muestran en los nodos, respectivamente.	33
Figura 1.2. Crecimiento miceliar en papaya ‘Maradol’ de 6 aislados. Ca: <i>Colletotrichum aenigma</i> , Cb: <i>C. brevisporum</i> , Cc: <i>C. cliviae</i> , Cg: <i>C. gloeosporioides</i> , Ck: <i>C. karstii</i> , Ct: <i>C. truncatum</i> .	37
Figura 2.1. Porcentaje de inhibición de crecimiento miceliar de seis especies de <i>Colletotrichum</i> con el uso de extracto etílico de hoja de <i>Psidium guajava</i> . A) <i>C. aenigma</i> , B) <i>C. brevisporum</i> , C) <i>C. cliviae</i> , D) <i>C. gloeosporioides</i> , E) <i>C. karstii</i> , F) <i>C. truncatum</i>	61
Figura 2.2. Crecimiento micelial de seis cepas de <i>Colletotrichum</i> a 10 días de evaluación con las diferentes concentraciones de extracto etílico de hoja de <i>Psidium guajava</i> y los testigos de aguay etanol y el tratamiento químico (azoxystrobin).	65
Figura 3.1. Cambios en la luminosidad, sólidos solubles totales, acidez y vitamina C en papaya cv Maradol sin recubrimiento (SR) y con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) durante su almacenamiento a 15°C y 85% de HR.	82
Figura 3.2. Evolución de firmeza de papaya cv Maradol sin recubrimiento (SR) y con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) su almacenamiento a 15°C y 85% de HR. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 6 frutos.	83
Figura 3.3. Evolución de pérdida de peso de papaya cv Maradol sin recubrimiento (SR) y con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) durante su almacenamiento a 15°C y 85% de HR. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 6 frutos.	85
Figura 3.4. Evolución de la respiración de papaya cv Maradol, sin recubrimiento (SR) y con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) durante su almacenamiento a 15°C y 85% de HR. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 6 frutos.	86
Figura 3.5. Evolución de incidencia de la antracnosis ocasionada por tres especies de <i>Colletotrichum</i> en papaya cv Maradol. A) <i>C. brevisporum</i> , B) <i>C. gloeosporioides</i> y C) <i>C. truncatum</i> , con diferentes tratamientos: sin recubrimiento (SR), con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) y con recubrimiento más adición de 300ppm de extracto de hoja de guayaba (CRE). Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 6 frutos.	88
Figura 3.6. Evolución de severidad de daño de la antracnosis de tres especies de <i>Colletotrichum</i> en papaya cv Maradol. A) <i>C. brevisporum</i> , B) <i>C. gloeosporioides</i> y C) <i>C. truncatum</i> , con diferentes tratamientos: sin	89

recubrimiento (SR), con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) y con recubrimiento más adición de 300ppm de extracto de hoja de guayaba (CRE). Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 906 frutos	
Figura 3.7. Seguimiento fotográfico del efecto de tres tratamientos (sin recubrimiento (SR), con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) y con recubrimiento más adición de 300ppm de extracto de hoja de guayaba (CRE)) sobre la incidencia y severidad de antracnosis ocasionada por tres especies de <i>Colletotrichum</i> (<i>C. brevisporum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. truncatum</i> .) en papaya cv Maradol.	89
Figura 3.8. Evolución del contenido de fenoles presente en la piel de la papaya cv Maradol. Piel no infectada e infectada con tres especies de <i>Colletotrichum</i> (<i>C. brevisporum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. truncatum</i>). Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 6 frutos.	91
Figura 3.9. Evolución de la actividad de Exo-Poligalacturonasa presente en la piel de la papaya cv Maradol. Piel no infectada e infectada con tres especies de <i>Colletotrichum</i> (<i>C. brevisporum</i> , <i>C. gloeosporioides</i> , <i>C. truncatum</i>). Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 6 frutos.	91
Figura 4.1. Contenido de fenoles de extractos etílicos. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 5 réplicas. Las letras sobre las barras indican diferencia significativa entre tratamientos ($\alpha = 0.05$).	107
Figura 4.2. Inhibición de crecimiento micelial de <i>Colletotrichum</i> sp. con el uso de extractos etílicos a diferentes concentraciones. A) hojas de neem, B) hojas de guanábana, C) hojas de carqueja, D) carqueja completa, E) raíz de jengibre, F) hojas de marinheiro. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 6 réplicas.	108
Figura 5.1. Efecto de diversos agentes en diferentes tratamientos, A) Agentes de control biológico: <i>Trichoderma longibrachiatum</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus amyloliquefaciens</i> , B) químico: azoxistobin, cloruro de calcio, fosfito de potasio; C) extractos vegetales: extracto comercial de jengibre y de guanábana, sobre el índice de severidad en papaya cv. Sunrise ocasionado por <i>Colletotrichum</i> sp.	124
Figura 5.2. Firmeza de papaya cv. Sunrise sometida a diversos tratamientos postcosecha (<i>Trichoderma longibrachiatum</i> , cloruro de calcio, extracto de jengibre) durante su almacenamiento a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 85% de HR. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 8 réplicas.	128
Figura 5.3. Color de papaya cv. Sunrise sometida a diversos tratamientos postcosecha (<i>Trichoderma longibrachiatum</i> , cloruro de calcio, extracto de jengibre) durante su almacenamiento a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 85% de HR. A) Luminosidad, B) Cromo D) Tono. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 8 réplicas.	130
Figura 5.4. Color de papaya cv. Sunrise sometida a diversos tratamientos postcosecha (<i>Trichoderma longibrachiatum</i> , cloruro de calcio, extracto de jengibre) durante su almacenamiento a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 85%.	131

INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya*) es una planta perteneciente a la familia Caricaceae, originaria de América tropical del sur de México hasta Costa Rica; cultivada en la actualidad en diferentes regiones tropicales y subtropicales del mundo. En México para el año 2016 tuvo una producción anual de 836,370 t y se cultivó principalmente en los estados de Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Campeche, Tabasco, Colima y Michoacán (SIAP, 2017) y destaca como un importante exportador de papaya fresca destinando más del 90 % de sus exportaciones al mercado de los Estados Unidos, pero sólo el 10 % de su producción total es exportada (FAOSTAT, 2017).

Sin embargo, es un producto perecedero, susceptible al ataque de microorganismos antes o después de la cosecha y durante su almacenamiento. El principal agente patógeno que ocasiona pérdidas postcosecha es *Colletotrichum* sp el cual ocasiona la antracnosis en papaya. La antracnosis, es causada principalmente por *Colletotrichum gloeosporioides* (Maeda y Nelson, 2014; Sidiqi y Ali, 2014); sin embargo, es posible encontrar otras especies de *Colletotrichum* spp. que causan esta enfermedad en diversos cultivos (Liu et al., 2013a; Diao et al., 2014; Grabke et al., 2014; Hu et al., 2015; Han et al., 2016; Saini et al., 2016; Tapia-Tussell et al., 2016). En la actualidad el género *Colletotrichum*, se constituye en un desafío para los taxónomos dado que al día de hoy el concepto de especie dentro del mismo no ha sido bien definido o universalmente aceptado. Durante muchos años, se ha supuesto que las especies de *Colletotrichum* son específicas para las plantas que infectan y en la actualidad la sistemática de las especies de *Colletotrichum* ha cambiado recientemente con la publicación de análisis filogenético que revela que el género está compuesto por clados (Cannon et al., 2012), los cuales representan un complejo de especies (Damm et al., 2012a y 2012b, Weir et al., 2012, Damm et al., 2014). Para reducir estas pérdidas, es necesario entender los factores biológicos y medioambientales relacionados con su deterioro y el uso de tecnologías postcosecha que retrasen la senescencia y mantengan la calidad del producto lo mejor posible. Durante varios años se han empleado fungicidas sintéticos para controlar patógenos postcosecha; sin embargo, en diversos estudios se ha demostrado que estos compuestos han causado resistencia en microorganismos, incluyendo a los hongos y representan un potencial riesgo para la seguridad del medio ambiente y la salud humana. En la búsqueda de

alternativas naturales para el control de pudriciones postcosecha se ha valorado el empleo de extractos vegetales (Dubey, 2016; Salem et al., 2016; Soliman et al., 2016).

Estudios realizados por Dubey (2016); Morais-Braga et al. (2016); Soliman et al. (2016) demuestran que extractos y aceite esencial de hoja de guayaba (*Psidium guajava*) poseen actividad antimicrobiana, que de esta planta se puede obtener tanto extracto como aceite esencial para emplearlo como un compuesto antifúngico o antimicrobiano y una manera de emplearlos es adicionándolo a un envase activo como un método de conservación.

Una alternativa muy prometedora para la conservación de productos hortofrutícolas, es el empleo de envases activos, definidos como el sistema alimento-envase-entorno que actúa de forma coordinada para mejorar la salubridad y la calidad del alimento envasado y aumentar su vida útil (Figueroa, 2011). Como componentes de los envases activos se encuentran los recubrimientos comestibles, estos pueden servir como vehículos para un amplio rango de aditivos, incluyendo compuestos antimicrobianos que también permite extender la calidad comercial del producto fresco, por un periodo preestablecido entre los siete y diez días en rubros altamente perecederos, siendo el grado de descomposición controlado por la acción de sustancias antioxidantes (Barrera et al., 2012; Quintero et al., 2010).

Por lo anterior mencionado, el presente trabajo tuvo como objetivo, aislar e identificar los patógenos postcosecha asociados a la antracnosis en frutos de papaya cv. 'Maradol' de los principales estados productores de la República Mexicana mediante técnicas morfométricas y moleculares para conocer su estructura morfológica y molecular y evaluar su manejo postcosecha mediante la aplicación de envases activos.

MARCO TEÓRICO

Origen e historia

La papaya es nativa de Centroamérica, posiblemente entre el sur de México y el norte de Nicaragua, según unos autores o de los Andes Peruanos según otros. La primera mención de la misma fue en el libro “Historia Natural y General de las Indias” en el año 1535 y se le atribuye a Gonzalo Fernández de Oviedo (1478-1557), historiador y cronista español, quien informó a los reyes de España haber visto plantas de papayas creciendo en dicha región (ProPapaya, 2009, SIAP, 2012a).



Figura 1. Cultivo de papaya.

Su llegada al Caribe y a Suramérica se debió a los marinos españoles y portugueses. Su distribución en todo el resto del mundo tropical se logra durante el siglo XVI (INFOAGRO, 2012). Se le conoce con diferentes nombres, tales como: papaya (México), fruta bomba (Cuba), mamao (Brasil), pawpaw (Australia) entre otros. (SIAP, 2012b).

Taxonomía y morfología

En el Cuadro 1. Se presentan la información taxonómica de *Carica papaya*.

Cuadro 2. Información taxonómica de *Carica papaya*.

REINO	Plantae
DIVISIÓN	Magnoliophyta
CLASE	Magnoliopsida
ORDEN	Violales
FAMILIA	Caricaceae
GÉNERO	<i>Carica</i> L., 1753
ESPECIE	<i>Papaya</i> L., 1753

Fuente: CONABIO (2012b).

La planta es una herbácea arborescente de crecimiento rápido y de corta vida. Se clasifica como una especie perenne, ya que puede llegar a vivir 20 años. Se considera una hierba arborescente porque es muy poco lignificada. En el Cuadro 2 se describe la morfología de la planta de papaya.

Cuadro 3. Descripción morfológica del papayo.

Parte de la planta	Descripción
<p>Raíz</p> 	<p>Es engrosada y de color blancuzco en su exterior. En los suelos profundos y sueltos crece hacia abajo casi verticalmente hasta unos 60 cm de profundidad. Produce unas 25 raíces secundarias de 2.5 a 5 cm de grueso.</p>
<p>Tronco</p> 	<p>Es recto, cilíndrico, suave, esponjoso-fibroso suelto, jugoso, hueco, de color gris o café grisáceo, de 15-30 cm de diámetro y endurecido por la presencia de cicatrices grandes y prominentes causadas por la caída de hojas e inflorescencias, con una corteza lisa marcada por cicatrices producto del crecimiento foliar. Sencillo o algunas veces ramificado, de 2-10 m de altura.</p>
<p>Hojas</p> 	<p>Son alternas, aglomeradas en el ápice del tronco y ramas, de pecíolo largo; ampliamente patentes, de 25-75 cm de diámetro, lisas, más o menos profundamente palmeadas con venas medias robustas, irradiantes. El haz de la hoja es de color verde oscuro o verde amarillo, brillante, marcado en forma visible por las nerviaduras hundidas de color blanco amarillento y las venas reticuladas, por debajo son de color verde amarillento pálido y opaco con nervaduras y venas prominentes y visibles.</p>
<p>Flores Femenina</p> 	<p>Tiene seis tipos de flores, por lo que se considera que es una planta polígama.</p> <p>Las flores femeninas tienen un cáliz formado por una corona o estrella de cinco puntas muy pronunciada. Encima de éste se encuentra el ovario, cubierto por los sépalos de color blanco amarillo, y cuando muy tiernos, ligeramente tocados de violeta en la punta. Los frutos de este tipo son grandes y globosos.</p> <p>Las flores masculinas crecen en largos pedúnculos de más de medio metro de longitud y en cuyos extremos se encuentran racimos constituidos por 15 - 20 florecillas. Estas flores no dan frutos, pero si lo hacen son alargados y de poca calidad.</p>
<p>Flores Masculina</p> 	<p>Las flores hermafroditas tienen los dos sexos y el árbol que las posee tiene a su vez tres clases de flores. Una llamada pentandria, parecida a la flor femenina, pero al separar los pétalos se aprecian cinco estambres y el ovario es lobulado. Los frutos de esta flor son globosos y lobulados. Otro tipo es la llamada elongata y tiene diez estambres, colocados en dos tandas; es alargada y de forma cilíndrica, al igual que el ovario, dando frutos alargados. El último tipo de flor es la intermedia o irregular, no es una flor bien constituida, formando frutos deformes.</p>

Cuadro 4. Descripción morfológica del papayo (Continuación).

Parte de la planta	Descripción
<p data-bbox="309 387 395 421">Fruto</p> 	<p data-bbox="496 306 1422 741">Es una baya ovoide, cuya forma varía de casi esférica a oblonga o periforme; posee una cavidad cuyo tamaño puede ser pequeña o mayor que la mitad del diámetro del fruto, esta cavidad contiene las semillas que pueden ser muy numerosas o prácticamente no existir. Las semillas son ovoides, negras, de 5 mm de largo y encerradas en un arilo transparente y gelatinoso. La pulpa es de color amarillo anaranjado o rojizo; succulenta y aromática, de sabor agradable y dulce. En cuanto al tamaño y peso del fruto, éste puede ser de entre 10 - 25 cm o más de largo y 7-15 cm o más de diámetro, y oscila entre 400 gramos y 6 kilos, dependiendo de la variedad y de su posición en la planta; los más grandes son aquellos ubicados en la parte baja del tallo, y conforme aumenta la altura va disminuyendo el tamaño del mismo.</p>

Fuente: Fundación de Desarrollo Agropecuario (1998); FAO (2008); ProPapaya (2009); CANALAGRO (2012) SIAP (2012c).

Importancia económica

La papaya se produce en más de 60 países y su producción se concentra en naciones en vías de desarrollo. En 2015 la producción mundial de papaya se estimó en 12.67 millones de toneladas habiendo entre 2013 y 2014 un crecimiento de 8.7 % (FAOSTAT, 2013).

Como se observa en la Figura 2, India es el primer productor a nivel mundial de papaya con una producción de 5,639,300 toneladas, seguido de Brasil con 12.7 %, Nigeria 6.7 % e Indonesia y México con 6.6 %. México se encuentra en el quinto lugar a nivel mundial con una producción de 836,370 t de papaya producida en el año 2015 (FAO, 2017).

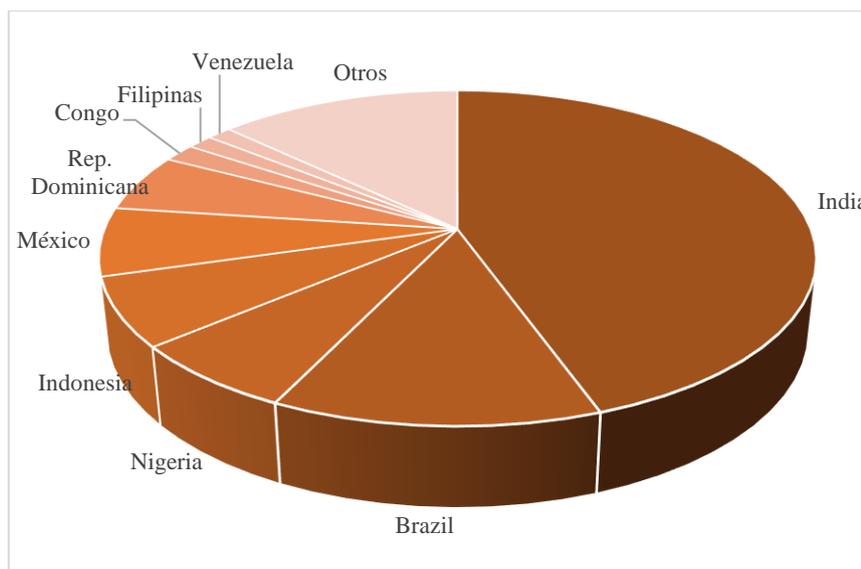


Figura 2. Producción a nivel mundial de la papaya en el 2015.

Fuente: FAOSTAT (2017).

En México, las principales plantaciones de papaya están ubicadas al suroriente del país en los estados de Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Campeche y Yucatán, allí se concentra más del 60% del total de producción de papaya en México (Evans y Ballen, 2012).

La producción de papaya por estados según el SIAP durante el año 2017 se muestra en la Figura 3, en donde Oaxaca con 169 mil 434 toneladas producidas, Veracruz 100,465 t y Chiapas con producción de 86,879 t, les sigue el estado de Colima con 65,121 t de papaya que fueron las entidades con mayor producción (74 % de la producción nacional), obteniendo un valor de producción de \$1,385,150 (SIAP, 2017).

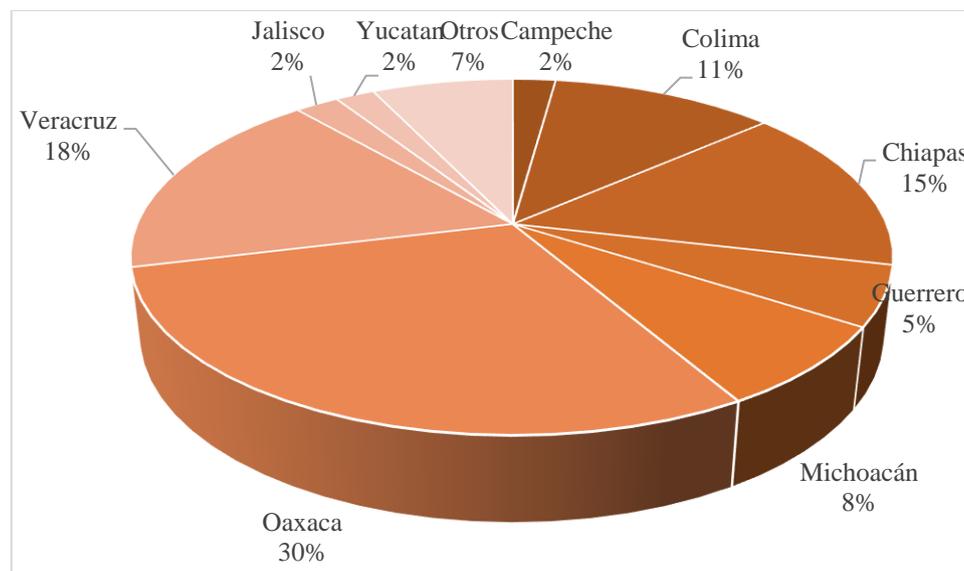


Figura 3. Producción agrícola (Riego+ Temporal) de papaya en 2017.
Fuente: SIAP (2017).

Variedades

Debido a que el papayo se reproduce por semilla, se han desarrollado un gran número de variedades, empleándose en cada zona de cultivo las mejor adaptadas a sus condiciones climatológicas. Las variedades mestizas son poco estables, y se recomienda tener cuidado en obtener semillas de progenitores que pertenezcan a la misma variedad. En México destacan las variedades ‘Maradol’, ‘Red Lady’ y otra variedad de menor importancia es la ‘Solo’, cuyas características se presentan en el Cuadro 3 (INFOAGRO, 2012).

Cuadro 3. Principales variedades de papayas en México.

Variedad	Características	Procedencia
<p>Maradol</p> 	<p>Se desarrolla en clima cálido (25-38 °C). Se puede sembrar en cualquier época del año. Su floración inicia aproximadamente a los tres meses de trasplantada y su cosecha alrededor de siete meses después del trasplante. El exterior de las frutas es amarillo-anaranjado brillante, su interior es un intenso rojo salmón. Azúcares alrededor de 15 °Brix, sabor exquisito, su pulpa tiene excelente consistencia el peso promedio de los frutos es de 1.5 a 2.6 kg, prevalecen los frutos alargados (hermafroditas).</p>	<p>Del sur de México hasta Costa Rica</p>
<p>Red Lady</p> 	<p>Es un híbrido de producción temprana y vigorosa, es tolerante al virus de la mancha anular de la papaya, sus frutos comienzan a una altura de 80 cm y normalmente tiene cerca de 30 frutas por planta en cada temporada. Esta especie se destaca porque tiene la pulpa de color rojo y un buen aroma fuerte. Su peso promedio es de 1.1 kg. La madurez se identifica cuando el fruto empieza a tornarse amarillo pintón por lo menos en un 40% de la superficie y se hace suave al tacto.</p>	<p>***</p>
<p>Solo</p> 	<p>Esta variedad hermafrodita produce frutos pequeños de forma aplanada y de cuello corto, con peso entre los 400 y 800 g, de buen sabor, color salmón y con buenas características para el transporte. Se le conoce comúnmente como Hawaiana, pues es donde mayor auge ha tenido y en donde se han desarrollado dos grupos para hacer frente al virus de la mancha anular (PRSV, por sus siglas en inglés). Por un lado se encuentran los tipos genéticamente modificados: Sunset (pulpa firme de color salmón rosado, peso entre 400 y 600 g), Rainbow y Sunup; Por otro lado están los no modificadas como Kapoho (pulpa color amarillo-naranja de consistencia firme, muy dulce y con peso de 400 a 800 g) y Sunrise (pulpa amarillo-naranja, peso entre 425 y 625 g).</p>	<p>Hawai</p>

Fuente: INFOAGRO (2012); Perfil Mercado de Papaya (2012); Diagnóstico de la Papaya Maradol (2012). Diario El Comercio (2011); Wydyastuti et al. (2010).

La papaya, es una fruta climatérica lo que quiere decir que la maduración continúa después de cosechado, produciendo cantidades significativas de etileno, conjuntamente con la presencia de un alto ritmo respiratorio (Figura 4). Después de la cosecha es muy susceptible a los daños físicos y al deterioro en general por lo que su manejo tiene que ser muy cuidadoso (FAO, 2008).

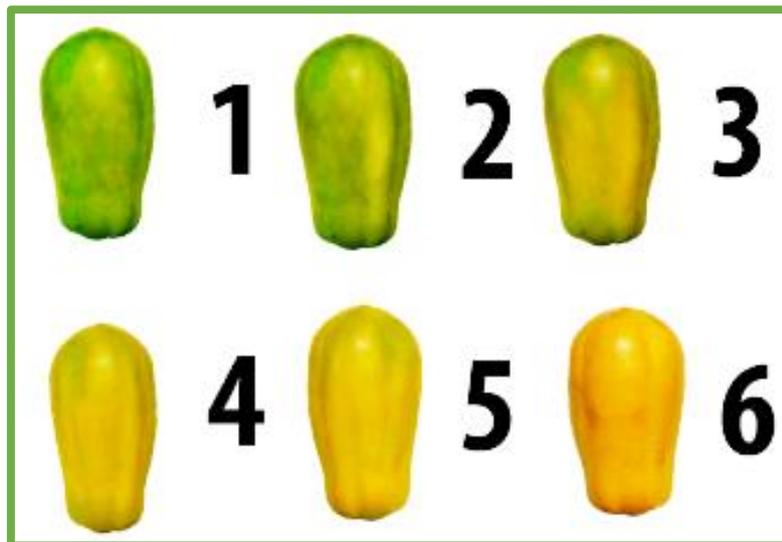


Figura 4. Grados de madurez en la papaya después de la cosecha: 1. Verde; 2. 3/4 verde; 3. 2/4 verde; 4. 2/4 amarillo; 5. 3/4 amarillo; 6. Amarilla o madura maciza.

Fuente: NMX-FF-041-SCFI-2003.

Composición química

Dependiendo la variedad, el cultivar y el estado de madurez, el contenido en humedad varía de un 87 a 94% y el de carbohidratos de 2 a 12%. El cambio más significativo que ocurre en la maduración del fruto es la aparición de azúcares solubles, siendo el predominante la sacarosa (48,3%), seguido de glucosa (29,0%), fructosa (21 %) y trazas de pseudo-heptulosa (Lobo, 1995).

La papaya se consume principalmente como fruta fresca, en postre o ensalada, este fruto se ubica en los primeros lugares entre los frutos ricos en vitamina C, vitamina A, riboflavina, calcio, tiamina, hierro, niacina, potasio y fibra (Krishna et al., 2008). En el Cuadro 4 se muestra el contenido de los principales compuestos químicos que se encuentran en la pulpa de la papaya.

Cuadro 4. Composición química de la papaya en estado verde y maduro en 100 g de porción comestible.

Componente	Verde	Maduro
Valor energético (kCal)	28	39
Humedad (%)	91.60	88.83
Proteína (g)	0.80	0.61
Grasa total (g)	0.10	0.14
Carbohidratos (g)	6.90	9.81
Fibra dietética total (g)	-	1.80
Cenizas (g)	0.60	0.61

Cuadro 4. Composición química de la papaya en estado verde y maduro en 100 g de porción comestible (Continuación).		
Componente	Verde	Maduro
Minerales (mg)		
Calcio	41	24
Fósforo	22	5
Hierro	0.30	0.10
Potasio	-	257
Sodio	-	3
Zinc	-	0.07
Magnesio	-	10
Vitaminas (mg)		
Tiamina	0.04	0.03
Riboflavina	0.04	0.03
Niacina	0.20	0.34
Vitamina C	36	62
Vitamina A (mcg)	-	55
Vitamina B6	-	0.02
Ácidos grasos (g)		
Mono-insaturados	-	0.04
Poli-insaturados	-	0.03
Saturados	-	0.04
Colesterol (mg)	-	0

Fuente: INCAP (2012).

El color de la pulpa se debe a la presencia de carotenoides, entre los cuales se encuentran la violaxantina y la caricaxantina. Es rica también en vitamina A (retinol), vitamina C (ácido ascórbico), algunas del complejo B (B1, B2 y B3) y diversos minerales, principalmente calcio (Nar, 2003). Por otro lado, el látex que se desprende del fruto, sobre todo cuando está inmaduro contiene compuestos como la papaína y la quimiopapaína, que son enzimas similares a la pepsina humana y que hidrolizan las proteínas acelerando el proceso digestivo, además disminuyen el dolor e inflamación del estómago debido a sus propiedades analgésicas (Alonso et al., 2006; Valera y Cruz-Trujillo, 2013).

Actualmente existe una gran demanda a nivel mundial debido a su bajo valor calórico (cerca de 53 calorías por cada 100 gramos de fruta), además de ser un laxante natural y poseer propiedades para agilizar cicatrizaciones externas e internas (por ejemplo, las úlceras gástricas) y eliminar parásitos intestinales (Valera y Cruz-Trujillo, 2013). También, se puede utilizar en la prevención de complicaciones de la diabetes mellitus (Savickiene et al., 2002). Las semillas negras son comestibles y tienen un sabor fuerte,

picante. A veces se muelen y se utiliza como un sustituto de la pimienta negra. En algunas partes de Asia las hojas jóvenes de papaya se cuecen al vapor y se comen como la espinaca (Krishna et al., 2008).

Plagas y enfermedades

La importancia de las plagas y enfermedades en cultivos hortifrutícolas radica principalmente en la disminución del rendimiento, la calidad de los frutos y por ende en las pérdidas económicas que se tienen si no se les controla a tiempo.

En el cultivo de papaya muchos insectos pueden infestar los tallos, las hojas, los frutos y las raíces, pero pocos causan un verdadero daño económico como los que transmiten enfermedades virales y bacterias que causan el deterioro rápido de las plantaciones (Fariñas y Mejía, 1990).

En el Cuadro 5 se describen las principales plagas que afectan tanto el fruto como el árbol de papaya.

Cuadro 5. Plagas de mayor importancia que afectan el cultivo de papaya en México.

Plaga	Características/daño provocado	Método de control
<p>Pulgones (<i>Myzus Spp.</i>)</p> 	<p>Los adultos alados son los principales vectores del virus de la mancha anular.</p>	<p>Se pueden utilizar los siguientes agroquímicos: imidacloprid, dimetoato, metamidofos, y otros en la dosis indicadas por los fabricantes.</p>
<p>Chicharritas o Saltahojas (<i>Empoasca papayae</i>; <i>Empoasca sp.</i>)</p> 	<p>Estos homópteros son causantes de la diseminación de enfermedades como el “Bunchy top”.</p>	<p>Su control es más efectivo con insecticidas sistémicos como el dimetoato, metamidofos, etc. Una medida eficaz para disminuir la incidencia de esta plaga es la limpieza de plantas hospederas dentro y en los alrededores de la plantación.</p>

Cuadro 5. Plagas de mayor importancia que afectan el cultivo de papaya en México (Continuación).

Plaga	Características/daño provocado	Método de control
<p>Mosca mexicana de la fruta (<i>Anastrepha ludens</i> Loew)</p> 	<p>Deposita los huevos en la cavidad de la fruta. Después de la eclosión, las larvas o gusanos empiezan a alimentarse de las semillas. Las larvas perforan la masa madura y producen indirectamente la descomposición interna del fruto a causa de hongos que penetran por las perforaciones producidas por este insecto.</p>	<p>Técnica del insecto estéril (cría masiva y liberación de moscas de la fruta de la misma especie, previamente esterilizadas mediante irradiación). Control biológico a través de la cría y liberación de avispas (enemigos naturales de la plaga).</p>
<p>Hormigas cortadoras de hojas (<i>Acromyrmex octospinosus</i>)</p> 	<p>Estos insectos son muy voraces. El daño consiste en la defoliación de las plantas que en muchas ocasiones se recuperan, siempre ocasiona un atraso innecesario.</p>	<p>Fumigación de suelos con bromuro de metilo. El área afectada se cubre con una lona y el fumigante se libera bajo ella en varios puntos.</p>
<p>Chinchas harinosas (<i>Ripersia radiculola</i>)</p> 	<p>Succionan la savia en el follaje y en el fruto, lo que provoca clorosis y enrollamiento de los bordes foliares. En los frutos es capaz de ocasionar el escurrimiento de látex, que le provoca un aspecto desagradable.</p>	<p>Se aplica clordana mezclado con el fertilizante en la proporción de 1.25% de producto activo, también el metasystox en solución al 0.1% añadiendo al agua de riego.</p>

Fuentes: Oirsa (2002); Duarte (2011); Hernández-Livera (2013).

Las plagas causan daños directos al disminuir el vigor y rendimiento de la planta, y/o reduciendo la calidad de la fruta. Además, algunas plagas son transmisoras de enfermedades de tipo viral, o facilitan el ataque de microorganismos causantes de enfermedades (Cuadro 6) (Fundación de Desarrollo Agropecuario 1998).

Cuadro 6. Principales enfermedades que afectan al fruto de la papaya en México.

Nombre	Características	Método de control
<p>Virus anulado de la papaya (<i>Papaya Ringspot Virus</i>)</p> 	<p>La enfermedad toma su nombre de los síntomas observados en los anillos de color verde oscuro, levemente hundidos.</p>	<p>Alejar los focos de infección a un mínimo de 600m; eliminar malezas y plantas enfermas; uso de barreras de cultivo; aplicación de aceites minerales; y control de vectores con insecticidas sistemáticos.</p>
<p>Pudrición de la raíz y del fruto (<i>Phytophthora parasitica</i>)</p> 	<p>Los frutos jóvenes infectados muestran lesiones acuosas con una sustancia lechosa en su superficie. Se puede observar el micelio blanco y las masas de esporas del hongo creciendo encima de los frutos infectados.</p>	<p>Utilizar en el cultivo de las plantaciones áreas con buen drenaje superficial e interno. Sembrar en canteros elevados solo en el caso de que se trate de suelos pesados. Destruir y eliminar frutos enfermos.</p>
<p>Pudrición interna del fruto (<i>Cladosporium sp.</i> y <i>Fusarium sp.</i>)</p> 	<p>Una vez dentro del fruto el hongo penetra la semilla, la cual se seca y oscurece. El tejido infectado es acuoso al principio, pero en las etapas finales de la infección toma un color negro y apariencia firme.</p>	<p>Una adecuada ventilación del cultivo mediante un amplio espaciamiento entre surcos y plantas, y la poda de hojas, que favorezca la aireación, reducen la severidad de la enfermedad.</p>
<p>Mancha negra (<i>Cercospora papayae</i>)</p> 	<p>En los frutos las manchas se inician como puntos negros diminutos, que pueden distinguirse cuando este empieza a amarillear y no conducen a la pudrición de los frutos.</p>	<p>Aplicar funguicidas como carbomatos y cobres.</p>

Cuadro 6. Principales enfermedades que afectan al fruto de la papaya en México (Continuación).

Nombre	Características	Método de control
<p>Mancha circular (<i>Alternaria Alternata</i>)</p> 	<p>Estas son de forma circular a oval deprimidas, que se tornan negras y no causan una pudrición extensa de la carne del fruto. Sin embargo, pueden cubrir la superficie completa del fruto.</p>	<p>Poda de hojas para favorecer la aireación; adecuado control de malezas; recolección y destrucción de los frutos o partes de la planta afectados; utilizar semillas tratadas o libres de la enfermedad, y control químico (clorotalonil)</p>
<p>Antracnosis (<i>Colletotrichum gloeosporioides</i>)</p> 	<p>Se presentan manchas negras hundidas, redondas y acuosas en los frutos maduros, sobre las cuales pueden observarse masas de esporas de color rosado naranja en un patrón de anillos.</p>	<p>Inmersión del fruto en agua caliente (48 a 52 °C por 20 min). Chorros de aire caliente (48-52 °C por 10 min) Aplicación de fungicidas como propiconazol y cera para exportación, benomyl, carbendazim y tiabendazol.</p>
<p>Pudrición (<i>Phomopsis caricae-papayae</i>)</p>  <p>Phomopsis caricae-papayae</p>	<p>Comienza en el extremo del pedicelo o en alguna herida en la cáscara, y puede desarrollarse rápidamente en frutos maduros; el tejido invadido se vuelve blando y se oscurece levemente.</p>	<p>Aplicar fungicidas protectores a la plantación. Evitar heridas al fruto. Tratar el fruto cosechado con una solución fungicida.</p>
<p>Pudrición terminal (<i>Phomacaricae-papayae</i>)</p>  <p>Phoma caricae- papayae</p>	<p>Lesiones que aparece en el área del pedicelo, la cual se vuelve de color café oscuro a negro.</p>	<p>Aplicar fungicidas protectores a la plantación.</p>

Fuentes: Almodóvar (2000); Oirsa (2002); EcoPort.com (2010); Hunziker (2012); Mund et al. (2012).

Manejo postcosecha

La primera estrategia para la obtener papayas con calidad, es la implementación de sistemas que permitan un manejo sanitario de los productos frescos desde la producción agrícola (Kader, 2012). Para ello se deben efectuar los lineamientos denominados como Buenas Prácticas Agrícolas (BPA) en las áreas donde se pueda ejercer un control. El principio de estas prácticas lo constituye el conocimiento de que todo lo que se pone en contacto con las frutas pueden ocasionar su contaminación y que la mayoría de los microorganismos patógenos y residuos de pesticidas, provienen del hombre, de los animales y del uso indiscriminado de productos químicos (Siller-Cepeda et al., 2002).

El cuidado que reciba la fruta desde que es cortada de la planta hasta que se le entrega al consumidor, influirá en su vida de anaquel y en su calidad física y visual. Por eso se deben tomar todas las medidas necesarias para evitar los golpes durante el transporte interno en el campo, el lavado y el tratamiento, transporte a centros de distribución, entre otros. Cuando el fruto es cortado, se debe envolver en papel periódico o espuma de poliuretano para evitar daños mecánicos en la piel, ya que estos aceleran la maduración y son un punto de entrada de hongos que dañarán al fruto (García, 2010).

La papaya debe almacenarse refrigerada para alargar su vida de comercialización, transporte y consumo, ya que las frutas almacenadas al medio ambiente maduran y se deterioran rápidamente. Antes de ingresar al almacén refrigerado la fruta debe enfriarse para eliminar el calor que trae del campo; además es susceptible al daño por enfriamiento por lo cual no debe almacenarse a menos de 7°C por períodos breves. La fruta puede conservarse de 1 a 3 semanas a 7-13°C y 85-90% de humedad relativa dependiendo del grado de maduración. La temperatura para maduración organoléptica es de 21-27°C (SEDER, 2010).

A pesar de que la variedad Maradol poseer cualidades de embarque y almacenamiento dadas por su gran consistencia, no está exenta de las afectaciones por enfermedades postcosecha, que pueden ser controladas con programas integrales en campo y una adecuada organización de las labores postcosecha. La calidad de la fruta se decide en el campo por lo que ningún sistema de calidad puede eliminar los problemas originados por un mal manejo en el control de enfermedades en postcosecha, que se traduce en pérdidas elevadas de la producción obtenida (Anaya, 2012). Las enfermedades de postcosecha de los productos vegetales u órganos de las plantas, son aquellas que se desarrollan durante la cosecha y posteriormente durante la selección, empaque y transporte de los productos

al mercado, pero que infelizmente se muestran hasta el consumidor, por lo que se está estudiando algunos tratamientos postcosecha para poder controlarlas.

Tratamientos postcosecha

En la actualidad se han ensayado un gran número de sustancias químicas para destruir los patógenos de frutas y hortalizas. Una de las propiedades más deseables de un determinado agente químico higienizante es la capacidad de lograr reducir 5 unidades logarítmicas de la carga del patógeno en cuestión (Jay et al., 2005).

El lavado de los productos con agua clorada previene su descomposición causada por bacterias, hongos y levaduras. El hipoclorito de calcio (en polvo) y el hipoclorito de sodio (líquido) son baratos y fáciles de conseguir. La eficacia del tratamiento disminuye si se permite que la materia orgánica se incremente en el agua de lavado. La eficacia del cloro aumenta si el pH se reduce de 11 a 8, pero a un pH más bajo el cloro se vuelve inestable (Kader, 2006). Las frutas y hortalizas pueden lavarse con una solución de hipoclorito (25 ppm de cloro activo por dos minutos) para controlarles pudriciones bacterianas y después enjuagarse. Alternativamente pueden ser sumergidas en una solución de hipoclorito (50 a 70 ppm de cloro activo) para el control de bacterias, hongos y mohos y después enjuagarse con agua corriente (Ogawa y Manji, 1984).

Otro agente utilizado, es el Ozono (O₃), el cual es un agente oxidante 1.5 veces más potente que el cloro; eficaz en solución y en forma de gas. Una concentración típica es la de 0.1-0.5ppm que es eficaz contra bacterias Gram-positivas y Gram-negativas. Se ha demostrado que es un agente eficaz para la reducción de carga de patógenos en diversos tipos de alimentos (Jay et al., 2005).

El uso de altas temperaturas para la prevención de contaminación en frutos y hortalizas se basa en el efecto letal de este agente sobre los patógenos (Jay et al., 2005). A continuación, se mencionan las modalidades más utilizadas en productos poscosecha frescos (Kader, 2006):

- **Tratamiento de agua caliente:** 30 min a 42°C (107.6°F) seguido dentro de los 3 minutos siguientes por una inmersión de 20 min a 49°C (120.2°F).
- **Tratamiento de vapor:** La temperatura de la fruta es incrementada por vapor de agua saturado a 44.4°C (112°F) hasta que el centro de la fruta llegue a esa temperatura, y luego es mantenida por 8.5 horas.
- **Tratamiento de aire caliente forzado:** 2 h a 43°C (109.4°F) + 2 h a 45°C (113°F) + 2 h a 46.5°C (115.7°F) + 2 h a 49°C (120.2°F).

Otro método, es la irradiación que puede definirse como la emisión y propagación de energía en el espacio o a través de un medio material, siendo la radiación electromagnética la que presenta mayor interés en la conservación de los alimentos. Las irradiaciones de onda corta son las letales para los microorganismos; así podemos dividir el espectro electromagnético, en relación a las radiaciones que interesan en la conservación de los alimentos, en: microondas, rayos ultra violeta, rayos X y rayos gamma. La Luz Ultravioleta (UV) tiene su mayor poder bactericida a una longitud de onda de 2600Å. No es ionizante y es absorbida por las proteínas y ácidos nucleicos, en los que se produce cambios fitoquímicos que pueden conducir a la muerte de la célula debido a la producción de mutaciones letales resultante de la acción sobre los ácidos nucleicos (Jay et al., 2005). La radiación ionizante se basa en el hecho de que inhibe la síntesis de DNA con lo que impide la división celular. Su uso está limitada a la irradiación electromagnética altamente energética (rayos gamma de ^{60}Co o rayos X) con energías de hasta 5 MeV o aceleradores de electrones de partículas con energías hasta de 10 MeV. Se han elegido estos tipos de radiación porque producen los efectos deseados en lo que respecta al alimento, no inducen radioactividad en los alimentos o materiales de envasado y están disponibles a costes que permiten el uso comercial del proceso (Doyle, 1997).

Otro método relativamente joven para la conservación de alimentos frescos es el uso de envases activos que pretenden la interacción del envase con el alimento para mejorar su calidad y proporcionar diversas funciones al envase (López et al., 2010). Es definido como un sistema coordinado de preparación de productos para el transporte, la distribución, el almacenaje, la venta al detalle y el uso oficial y como un medio de asegurar el suministro seguro hasta el último consumidor en condiciones adecuadas a un costo global mínimo (Paine y Paine, 1994). Está diseñado para interactuar de una forma activa con su contenido, y esta interacción implica una transferencia de masa pudiendo incorporar sustancias al contenido del envase o absorbiendo componentes desde el contenido con el objeto de mejorar su calidad y aceptabilidad. Los materiales activos modifican determinadas condiciones o procesos del alimento que juegan un papel determinante en la vida comercial del producto. Dentro de los envases activos se encuentran aquellos que incluyen sistemas que absorben/eliminan o regulan compuestos como oxígeno, etileno, humedad o compuestos que pueden causar malos olores o sabores en los alimentos. Otros sistemas liberan agentes antimicrobianos, antioxidantes, saborizantes, aromatizantes o colorantes (López et al., 2010).

El componente activo del envase puede ser parte del material de envasado o algún material ajeno incluido en él; el método más desarrollado hasta el momento es la utilización de sobres o bolsitas que contienen el producto activo y que se introducen en los envases. En otros casos, los compuestos activos se incorporan a las películas del envase, tanto sintéticas como comestibles (López et al., 2010).

LITERATURA CITADA

- Alonso, E.M.; Ramos, R.R. y Tornet, Q.Y. 2006. Caracterización y evaluación de los recursos genéticos de papaya (*Carica papaya* Linn). CitriFrut. Cuba 23(2), 21-25.
- Anaya, N. 2012. Comercializadora de papaya. Plagas y enfermedades. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://papayasanaya.com/plagas-y-enfermedades/>
- CANALAGRO. 2012. Frutas tropicales, Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: http://servicios.laverdad.es/canalagro/datos/frutas/frutas_tropicales/papaya.htm#1
- CONABIO. 2012a. *Carica papaya*. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/info_especies/arboles/doctos/23-caric1m.pdf
- CONABIO. 2012b. Papaya. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: http://www.conabio.gob.mx/conocimiento/bioseguridad/pdf/20898_sg7.pdf
- Diagnóstico de la papaya Maradol. 2012. Gobierno de Campeche, Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://camp.gob.mx>
- Diao Y.Z., Zhang C., Lin D., Liu X.L. 2014. First Report of *Colletotrichum truncatum* Causing Anthracnose of Tomato in China. Plant Disease 98(5), 687-689. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0491-PDN>
- Diario El Comercio. 2011. Tres variedades de papaya y sus problemas en la recolección. Santo Domingo. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: http://www.elcomercio.com/agromar/variedades-papaya-consumen_0_413358692.html
- Doyle M.P.; Beuchat L.R., Montville T.J. 1997. Microbiología de los alimentos. Fundamentos y Fronteras. Acribia. Zaragoza, España.
- Duarte O. 2011. Plagas que afectan el cultivo de la papaya. Sección Fruticultura, Escuela Agrícola Panamericana. EcuRed. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: http://www.ecured.cu/index.php/Plagas_del_cultivo_de_la_Papaya
- Dubey S. 2016. Comparative antimicrobial efficacy of herbal alternatives (*Emblica officinalis*, *Psidium guajava*), MTAD, and 2.5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. Journal of oral biology and craniofacial

- research. Journal of Oral Biology and Craniofacial Research 6, 46-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.010>
- EcoPort. 2010. *Carica Papaya*. Consultado septiembre del 2017. Disponible en: <http://ecoport.org/>
 - Evans A. y Ballen F. 2012. Una mirada a la producción, el comercio y el consumo de papaya a nivel mundial. University of Florida: USA.
 - Fariñas M.E. y Mejías Y. 1990. El cogollo arrellado que afecta el cultivo del papayo. Transmisión, distribución y microscopía en cortes histológicos. Simposio XX Aniversario de la ENSA. La Habana, Cuba.
 - FAO. 2008. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Manejo poscosecha de frutos tropicales. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: http://www.fao.org/inpho_archive/content/documents/vlibrary/ac304s/ac304s01.htm
 - FAOSTAT. 2014. Food and Agriculture Organization of United Nations, Statics. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>.
 - Fundación de Desarrollo Agropecuario. 1998. Cultivo de lechosa. Guía técnica No. 14, 2da Ed. Santo Domingo, República Dominicana. 1-96.
 - García M.A. 2010. Guía técnica del cultivo de la papaya. Centro Nacional de Tecnología Agropecuaria y Forestal “Enrique Álvarez Córdova”. (CENTA). EL Salvador.
 - Grabke A., Williamson M., Henderson G.W., Schnabel G. 2014. First Report of Anthracnose on Peach Fruit Caused by *Colletotrichum truncatum* in South Carolina. Plant Disease, 98(8): 1154-1156. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-13-1215-PDN>.
 - Han Y.C., Zeng X.G., Xiang F.Y., Ren L., Chen F.Y., Gu Y.C. 2016. Distribution and Characteristics of *Colletotrichum* spp. Associated with Anthracnose of Strawberry in Hubei, China. Plant Disease, 100(5): 996-1006. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1016-RE>.
 - Hernández-Livera R.A. 2013. Moscas nativas de la fruta. SENASICA (Servicio Nacional de Seguridad, Inocuidad y Calidad Alimentaria). Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://www.senasica.gob.mx/?id=4516>.
 - Hu M-J., Grabke a., Schnabel G. 2015. Investigation of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing anthracnose fruit rot of peach in South Carolina. Plant Disease, 99:797-805. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1076-RE>.

- Hunziker M. 2012. Papaya pests and diseases. InfonetBioVIsion. Suiza. Consultado: septiembre del 2017. Disponible en: <http://www.infonet-biovision.org/>.
- INCAP. 2012. Tabla de composición de alimentos de Centroamérica. Menchú, M. T. y Méndez, H. (eds). Organización Panamericana de la Salud (OPS). 2da Ed. 137 p.
- INFOAGRO. 2012. El cultivo de la papaya. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: http://www.infoagro.com/frutas/frutas_tropicales/papaya.htm
- Jay J.M., Loessner M.J., Golden D.A. 2005. Microbiología moderna de los alimentos. Quinta edición. Acribia. Zaragoza, España.
- Kader A. 2012. Modified atmosphere during transport and storage, pp. 135–144. In: Postharvest Technology of Horticultural Crops. KADER, A.A. (ed.). University of California, Davis, California, USA.
- Krishna K.L., Paridhavi M., Patel J.A. 2008. Review on nutritional, medicinal and pharmacological properties of Papaya (*Carica papaya*). Natural Product Radiance 7(4), 364-373.
- Liu L., Zhao D., Zheng L., Hsiang T., Wei Y., Fu Y., Huang J. 2013. Identification of virulence genes in the crucifer anthracnose fungus *Colletotrichum higginsianum* by insertional mutagenesis. Microbial Pathogenesis, 64: 6-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2013.06.001>.
- Lobo M.G. 1995. Caracterización bioquímica de frutos de papaya (*Carica papaya*, cv. *Sunrise*), hembra y hermafrodita, en relación con su aptitud al procesado por congelación. Tesis doctoral no publicada. Universidad Complutense de Madrid. Facultad de Farmacia. Madrid, España.
- López-Cervantes J., Sánchez-Machado D.J., Buen-Solano C. 2010. Envases activos e inteligentes con bioproductos de los residuos de camarón. Ide@s CONCYTEG 5(60). Méxco. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: http://www.concyteg.gob.mx/ideasConcyteg/Archivos/60062010_ENVASES_ACTIVOS_INTELIGENTES_BIOPROD_RESID_CAMARON.pdf
- Maeda C. y Nelson S. 2014. Anthracnose of Papaya in Hawaii. Plant Disease, 103: 1-6.
- Morais-Braga, M.F.B., Carneiro, J.N.P., Machado, A.J.T., Sales, D.L., dos Santos, A.T.L., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Menezes, I.R.A., Souza, D.S.L., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M. 2016. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium*

- guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence?. Saudi Journal of Biological Sciences, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.028>
- [Mund L., Shivas R., Malipatil M. 2012.](#) PaDIL–High quality images and Information tools designed for Biosecurity and Biodiversity. Australia. Consultado en enero 2014. Disponible en: <http://www.padil.gov.au/>
 - Nar L.F. 2003. Diagnóstico de papaya maradol. Promotora de servicios comerciales de Campeche. Gobierno del Estado de Campeche, México.
 - NMX-FF-041-SCFI-2003. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano. Fruta fresca. Papaya (*Carica papaya* L.). Especificaciones. Consultado en: septiembre de 2017. Disponible en: <http://200.77.231.100/work/normas/nmx/2007/nmx-ff-041-scfi-2007.pdf>
 - Ogawa, J.M. y Manji, B.T. 1984. in: Moline , H.E. (Ed). Postharvest Pathology of Fruits and Vegetables. University of California, Division of Agriculture and Natural Re Fuentes.
 - OIRSA. 2002. Organización Internacional Regional de Sanidad Agropecuaria. Manual técnico de buenas prácticas agrícolas en papaya. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://www.oirsa.org/aplicaciones/subidoarchivos/BibliotecaVirtual/BUENASPRACTICASPAPAYA.pdf>
 - Paine F. y Paine H. 1994. Manual de envasado de alimentos. Madrid Vicente, Ediciones. Madrid, España: A.
 - Perfil mercado de papaya. 2009. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: http://www.industrias.ec/archivos/file/ESTUDIOS%20DE%20MERCADO/Perfil_Mercado_Papaya_BO.pdf
 - ProPapaya-Sistema Producto Papaya. 2009. Estudio de oportunidades de mercado e inteligencia comercial internacional de la papaya mexicana e identificación de necesidades de infraestructura logística. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: http://www.sagarpa.gob.mx%2Fagronegocios%2FDocuments%2FEstudios_promercado%2FPAPAYA2009.pdf
 - ProPapaya- Sistema Producto Papaya. 2014. Situación actual de la papaya. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://www.propapaya.org/acerca-de-la-papaya/situacion-de-la-papaya>

- Saini T.J., Gupta S.G., Char B.R., Zehr U.B., Anandalakshmi R. 2016. First report of chilli anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in India. New Disease Report, 34(6): X-X. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2016.034.006>.
- Salem M.Z.M., Zidan Y.E, Mansour M.M.A., El Hadidi N.M.N., Abo Elgat W.A.A. 2016. Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mold fungi. International Biodeterioration & Biodegradation 106, 88-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.010>
- Savickiene N., Dagilyte A., Lukosius A., Zitkevicius V. 2002. Importance of biologically active components and plants in the prevention of complications of diabetes mellitus. Medicina (Kaunas) 38, 970-975.
- SEDER. 2010. Secretaría de desarrollo rural. Papaya, perfil comercial. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://seder.col.gob.mx/seder2012/comercializacion/perfiles/Papaya.pdf>
- SIAP. 2012a. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Papaya. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://w4.siap.gob.mx/AppEstado/Monografias/Frutales/Papaya.html>
- SIAP. 2012b. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Panorama mundial. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: http://w4.siap.gob.mx/sispro/portales/agricolas/papaya/ce_panorama1.pdf
- SIAP. 2012c. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Zonas productoras de papaya. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://w4.siap.gob.mx/sispro/portales/agricolas/papaya/descripcion.pdf>
- SIAP. 2016. Servicio de información agroalimentaria y pesquera. Cierre de producción agrícola por cultivo. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: http://infosiap.siap.gob.mx:8080/agricola_siap_gobmx/AvanceNacionalCultivo.do
- Siddiqui Y. y Ali A. 2014. Chapter 11. *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). In Postharvest Decay. Control Strategies. Editado por: Bautista-Baños S. Elsevier-Academic Press. Estados Unidos de América. 337-371. <https://books.google.com.mx/books?isbn=0124115683>.
- Siller-Cepeda J.; Báez-Sañudo M.A.; Sañudo-Barajas A.; Báez-Sañudo R. 2002. Manual de Buenas Prácticas Agrícolas. SAGARPA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo rural, Pesca y Alimentación). México.

- Soliman F.M., Fathy M.M., Salama M.M., Saber F.R. 2016. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University. In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.06.003>
- Tapia-Tussell R., Cortés-Velázquez A., Valencia-Yah T., Navarro C., Espinosa E., Moreno B., Perez-Brito D. 2016. First Report of *Colletotrichum magnum* Causing Anthracnose in Papaya in Mexico. Plant disease. Posted online. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0324-PDN>.
- Widyastuti C.A.; Iskandar Z.; Wardani R.S.; Toekan A. 2010. Papaya Red Lady. Horti Chan Centre. Indonesia. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://www.hortichain.org/site/>

CAPÍTULO I. Caracterización molecular, morfológica y patogénica de *Colletotrichum* spp. asociado al complejo de antracnosis de papaya cv. Maradol en México.

Lira-Vargas A.A.¹, Rojas-Martínez R.I.¹, Orozco-Santos M.², Trejo-Márquez M.A.³, Landeros-Valenzuela N.⁴, Rosas-Saito G.H.⁵, Nieto-Ángel D.^{1*}

¹ Colegio de Posgraduados, Dpto. Fitopatología, Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo, Texcoco, 56230, Edo. de México.

² Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias C.E. Tecoman, Carretera Colima-Manzanillo, Km 35, Predio La Escondida, Tecoman, 28930, Colima-México.

³ Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Centro de Asimilación Tecnológica, Laboratorio de Postcosecha de Productos Vegetales, Jiménez Cantú s/n, San Juan Atlámica, Cuautitlán Izcalli, 54700, Edo. de México.

⁴ Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Tepatepec, 42660, Hidalgo-México.

⁵ Instituto de Ecología, Red de Estudios Moleculares Avanzados, Xalapa, Veracruz-México.

*Autor de correspondencia: dnieto@colpos.mx

1.1. RESUMEN

Teniendo en cuenta los recientes avances taxonómicos en la sistemática de *Colletotrichum*, el objetivo de este trabajo fue caracterizar molecular, morfológica y patogénicamente diferentes especies de *Colletotrichum* spp. en frutos de papaya cv. Maradol de México. Las muestras de material con síntomas se colectaron de 23 Municipios de 10 estados productores. El aislamiento de *Colletotrichum* se realizó con el método monospórico y de cámara húmeda, posteriormente se hizo una extracción de ADN genómico, amplificación de Reacción en Cadena de Polimerasa con región del Espacio de Transcripción Interna y genes que codificaron para Actina, secuenciación en Macrogen y un análisis filogenético mediante un alineamiento multilocus con dos genes combinados (ITS y ACT) usando el programa SeaView. La caracterización morfológica (coloración de las cepas, aspecto, crecimiento del micelio, forma y tamaño de conidios, tasa de esporulación) y prueba de patogenicidad (crecimiento miceliar de cepa en el fruto de papaya) se llevó a cabo con seis aislamientos que resultaron diferentes en su identificación con ACT (*C. cliviae*: V22, *C. truncatum*: Co19, *C. brevisporum*: T15, *C. karstii*: M15, *C. aenigma*: V39, *C. gloeosporioides*: G15). Se determinó que la principal especie asociada a la antracnosis en papaya fue *C. brevisporum* con una frecuencia del 60% en los aislados evaluados. Los aislamientos evaluados mostraron variaciones morfológicas y patogénicas, por lo que los resultados de este estudio son relevantes debido a que constituyen nuevos reportes fitosanitarios, además de que el

complemento de métodos moleculares y morfofisiológicos son complementarios para una eficiente caracterización.

Palabras clave: *C. gloeosporioides*, *C. aenigma*, *C. brevisporum*, *C. karstii*, *C. truncatum*, *C. cliviae*, ITS, ACT, microscopia electrónica de barrido, árbol filogenético.

1. ABSTRACT

Taking into account the latest taxonomic progress in the *Colletotrichum* systematics, the objective of this work was to characterise molecularly, morphologically and pathogenically various *Colletotrichum* spp. in Maradol cv. papaya fruits of Mexico. Diseased material samples were collected from 23 municipalities of 10 producing states. *Colletotrichum* isolation was carried out with the monosporic and humidity chamber method; then, genomic DNA extraction, polymerase chain reaction amplification with Internal Transcribed Spacer region and genes that coded for actin, sequencing in Macrogen and a phylogenetic analysis through a multilocus alignment with two combined genes (ITS and ACT) were performed using the SeaView programme. The morphologic characterisation (strain colouring, appearance, mycelium growth, conidium shape and size, sporulation rate) and pathogenicity test (mycelium growth of strain in papaya fruit) were carried out with six isolations, which turned out to be different in their identification with ACT (*C. cliviae*: V22, *C. truncatum*: Co19, *C. brevisporum*: T15, *C. karstii*: M15, *C. aenigma*: V39, *C. gloeosporioides*: G15). It was determined that the main species associated with anthracnose on papaya was *C. brevisporum* with a 60% frequency in the isolates assessed. Such assessed isolations exhibited morphologic and pathogenic variations; the results of this study are relevant because they constitute new phytosanitary reports.

Keywords: *C. gloeosporioides*, *C. aenigma*, *C. brevisporum*, *C. karstii*, *C. truncatum*, *C. cliviae*, ITS, ACT, scanning electron microscopy, phylogenetic tree.

2. INTRODUCCIÓN

A nivel mundial la papaya se produce en más de 60 países, y según la FAO en el año 2013 se registró una producción de 764,514 t a nivel mundial, siendo los principales países productores India, Brasil, Indonesia, Nigeria, México, Etiopía, Colombia, Tailandia y Guatemala. México es el país latinoamericano con mayores exportaciones de papaya. En el

2013 exportó a los Estados Unidos la cantidad de 6,765 contenedores equivalentes a 121,770 t de fruta (USDA, 2016; FAOSTAT, 2016). En la última década las plantaciones de papaya variedad ‘Maradol’ en México tuvieron un incremento del 5.63% anual debido a la alta demanda de ésta fruta por sus propiedades nutritivas, medicinales y su sabor. Los principales estados productores: Oaxaca, Veracruz, Chiapas y Michoacán (SIAP-SAGARPA, 2015); sin embargo, su exportación a otros países se ve afectada debido a la presencia de diversos factores bióticos y abióticos. Entre los factores bióticos, se encuentran los problemas fitosanitarios como las enfermedades que tienen un alto costo en la producción, tal como la antracnosis, la cual ha causado del 25-50% de pérdidas en la fruta tanto en campo como en poscosecha (Maeda y Nelson, 2014).

La antracnosis, es causada principalmente por *Colletotrichum gloeosporioides* (Maeda y Nelson, 2014; Sidiqi y Ali, 2014); sin embargo, es posible encontrar otras especies de *Colletotrichum* spp. que causan esta enfermedad en diversos cultivos (Liu et al., 2013a; Mahmodi et al., 2013; Peng et al., 2013; Diao et al., 2014; Grabke et al., 2014; Hu et al., 2015; Bragança et al., 2016; Han et al., 2016; Saini et al., 2016; Tapia-Tussell et al., 2016). Hongos del género de *Colletotrichum* son de gran importancia económica, ya que son agentes patogénicos de algunas plantas de mayor importancia económica y de distribución en el mundo, al afectar partes vegetativas y al causar deterioro postcosecha de frutos de clima templado, subtropical y tropical (Cannon et al., 2012).

La identificación de especies se ha basado tradicionalmente con base a caracteres morfológicos, tales como: tamaño y forma de conidios, forma del apresorio, presencia de setas, estado telemorfo, y características del cultivo como color de la colonia, tasa de crecimiento y textura (Noireung et al., 2012; Sharma y Shenoy et al., 2013; Jiang et al., 2014; Velho et al., 2015, Rabha et al., 2016). Sin embargo, estos criterios por sí solos no son suficientes ni adecuados, debido a las características morfológicas y culturales que pueden variar bajo diferentes condiciones ambientales (Weir et al., 2012).

En la actualidad el género *Colletotrichum*, se constituye en un desafío para los taxónomos dado que al día de hoy el concepto de especie dentro del mismo no ha sido bien definido o universalmente aceptado. Durante muchos años, se ha supuesto que las especies de *Colletotrichum* son específicas para las plantas que infectan y en la actualidad la sistemática de las especies de *Colletotrichum* ha cambiado recientemente con la publicación de análisis

filogenético que revela que el género está compuesto por clados (Cannon et al., 2012), los cuales representan un complejo de especies (Damm et al., 2012a y 2012b, Weir et al., 2012, Damm et al., 2014).

Los complejos de especies, se puede evaluar indirectamente por medio de caracteres morfológicos e isoenzimáticos, o directamente con marcadores moleculares tipo RAMs, RFLPs, RAPDs, entre otros (Rabha et al., 2016). Los marcadores moleculares permiten el análisis de cada fracción del genoma, ya sea de copia única o altamente repetitivo, segmentos codificantes o no codificantes, segmentos conservados o hipervariables, del genoma nuclear u organelar; además permiten identificar especies que son morfológicamente similares y confirmar las identificaciones realizadas con base a características morfológicas (Weir et al., 2012; Damm et al., 2012a, 2012b). La región de Espacio Transcrito Interno (ITS) se ha utilizado con frecuencia para la identificación de *Colletotrichum* spp., solo que el uso de este gen ha dado lugar a resultados insatisfactorios (Cannon et al., 2012; Kamle et al., 2013). Por lo tanto, ITS ha sido utilizado junto con otros marcadores como, los genes que codifican para Actina (ACT), Deshidrogenasa Gliceraldehído-3-fosfato (GAPDH), β -Tubulina (Tub2), entre otros para aclarar la relación entre los complejos de especies de *Colletotrichum* (Peng et al., 2013; Álvarez et al., 2014, Velho et al., 2015; Rabha et al., 2016).

De ahí que la aplicación combinada de las herramientas de diagnóstico moleculares con la tradicional caracterización morfológica, sean un recurso apropiado y confiable para la identificación específica de las especies de este patógeno (Phoumivong et al., 2012; Velho et al., 2015), y de esta manera facilitar la implementación de medidas mucho más efectivas en el manejo de las enfermedades y en programas de mejoramiento genético (Sun et al., 2015). Con los recientes avances taxonómicos en la sistemática de *Colletotrichum*, el objetivo de esta investigación fue caracterizar morfológica, molecular y patogénicamente las especies de *Colletotrichum* spp. asociadas a la antracnosis en papaya 'Maradol' de diferentes estados productores de la República Mexicana.

3. MATERIAL Y MÉTODOS

1.1.1. Obtención de la colección

El material vegetal infectado con antracnosis, fue obtenido de frutos de papaya Cv ‘Maradol’ con síntomas típicos de la enfermedad, colectados en lotes productores de este cultivo en 23 municipios de 10 estados de la República Mexicana (Cuadro 1.1).

1.1.2. Aislamiento de especies de *Colletotrichum* en frutos de papaya

El aislamiento de hongos se realizó con dos métodos: 1) método de aislamiento monospórico con la técnica de diluciones sucesivas, procedimiento descrito por Than *et al.* (2008a) con modificaciones, cuando los frutos presentaban los síntomas con abundante masa de esporas. El método consistió en colocar la masa de esporas que quedó en una aza de siembra en 2 mL de agua destilada estéril, sucesivamente se hicieron dos diluciones más, donde los conidios fueron contables (10-20 conidios/mL) con la ayuda de un microscopio empleando objetivos de 4x y 10x posteriormente se depositaron en una caja Petri con medio agar papa dextrosa (PDA), las cajas se incubaron a 28 °C por 24-48 h, el conidio germinado y monoconidial se transfirieron a nuevas placas de PDA y se hicieron crecer durante 10 d a 28 °C; 2) método de cámara húmeda se utilizó, cuando las papayas presentaban síntomas pero escasa masa de conidios, se cortaron pequeños trozos de tejido y se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% durante 1 min, se enjuagaron en agua destilada estéril, y se secó en papel de seda esterilizada y finalmente las muestras se incubaron en medio de cultivo PDA a 28 °C por 7 d y ya que estas esporularon se realizó la técnica de monospórico antes mencionada.

1.1.3. Caracterización molecular

Extracción de ADN: La extracción de ADN genómico se realizó con el protocolo descrito por Gupta *et al.* (2013) con ligeras modificaciones. La técnica consistió en el raspado de cultivos de 10d de edad desarrollados en PDA con un bisturí esterilizado, el raspado se transfirió en un tubo eppendorf, se le adicionó 500 µL de buffer de extracción, 1 µL de β-mercaptoetanol, 35 µL de SDS y 50 µL de CTAB, se agitó por un minuto y se llevó a baño maría por 15 min a 65 °C, después se le adicionó 130 µL de acetato de potasio y se incubó en hielo por 5 min, se adicionaron 700 µL de cloroformo con alcohol isoamílico (24:1) y se centrifugó a 15000 rpm por 10 min, el sobrenadante se recuperó y se le adicionaron 640 µL

de isopropanol y 60 µL de acetato de sodio, se incubó a -20 °C por 20 min y se centrifugó a 15000 rpm por 5 min, el sobrenadante se descartó y la pastilla obtenida se enjuagó con etanol al 70 % , se secó y finalmente se diluyó en agua esteril-deshionizada.

Amplificación: El material extraído se utilizó como molde para la amplificación PCR de cuatro regiones genómicas: ADN ribosomal región ITS utilizando los oligos ITS1: CTT GGT CAT TTA GAG GAA GTA A (Gardes y Bruns, 1993), ITS4: TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC (White *et al.*, 1990); el gen que codifica para ACT con los oligos ACT-512F: ATG TGC AAG GCC GGT TTC GC, ACT783R: TAC GAG TCC TTC TGG CCC AT (Carbone y Kohn, 1999). Reacciones de PCR se realizaron en un termociclador (MJ Research PTC - 200) en un volumen final de 25 µL, que contenía 2 µL de ADN plantilla, 2.5 µL de tampón de PCR 10X (Tris/HCl 10 mM, pH 8, 50 mM de KCl, 1.5-2.0 mM MgCl₂), 0.5 µL de mezcla de dNTP (BioTecMol®), 10 pmoles de cada uno de los cebadores de amplificación opuestos, 0.2 µL de ADN polimerasa (BioTecMol®) y el resto de agua. Las condiciones de reacción fueron: desnaturalización inicial a 94 ° C durante 3 min, seguido de 30 ciclos, consistiendo cada ciclo en una etapa de desnaturalización a 94 °C durante 30 s, una etapa de recocido a 53.5 °C durante 30 s, una etapa de extensión a 72 °C durante 60 s y una extensión final a 72 °C durante 8 min. La temperatura etapa de recocido para amplificar ACT fue de 59.5 °C durante 30 s. Los amplicones fueron analizados por electroforesis en 0.8 % (w/v) en gel de agarosa en 1X TAE tampón, después el gel se visualizó se fotografió usando Molecular Imager Gel Doc XR y el sistema con el Laboratorio de Imagen Software (Bio-Rad) (Weir *et al.*, 2012).

Secuenciación: Los productos obtenidos de la amplificación se purificaron y se secuenciaron en 3730 XL DNA Analyzer (Applied Biosystems) En Macrogen (Seúl, Corea). Las secuencias fueron editadas con ClustalW (Thompson *et al.*, 2002) el programa BioEdit (Hall, 1999) y comparadas para identificación por similitud contra bases de datos internacionales en el GenBank base de datos de nucleótidos organizado por el Centro Nacional de Información Biotecnológica (NCBI) con la herramienta BLAST (Boratyn *et al.*, 2013). Todas las secuencias generadas en este estudio fueron depositadas en GenBank (Cuadro 1).

Análisis filogenético: Este análisis se realizó mediante un alineamiento multilocus con dos genes combinados (ITS y ACT) usando el programa SeaView (versión 4.4.0) (Gouy *et al.*, 2010). Con el alineamiento resultante se realizó un árbol filogenético mediante PhyML

(Guindon *et al.*, 2010) mediante el modelo de sustitución de nucleótidos TN93 (Tamura y Nei, 1993) el árbol fue dibujado a escala siendo la longitud de las ramas las sustituciones por sitio. La probabilidad fue maximizada al optimizar la topología del árbol y la longitud de las ramas mediante Nearest Neighbor Interchange (NNI) (Desper y Gascuel, 2002) y Bionighbor joining (BioNJ) (Gascuel, 1997). El soporte interno de las ramas se evaluó mediante 1000 repeticiones de bootstrap. Como grupo externo se usó *Colletotrichum lindemuthianum*. Sólo se muestran valores de bootstrap mayores a 50.

1.1.4. Caracterización morfológica

De los cultivos monospóricos conservados, se seleccionaron y reactivaron los aislamientos que resultaron diferentes en su identificación con ACT (*C. cliviae*: V22, *C. truncatum*: Co19, *C. brevisporum*: T15, *C. karstii*: M15, *C. aenigma*: V39, *C. gloeosporioides*: G15), seis cajas Petri en medio de PDA de cada aislamiento. Los aislamientos se revisaron diariamente para registrar: coloración de las cepas, aspecto y crecimiento del micelio durante ocho días.

Para el análisis de microscopía electrónica de barrido, se extrajo un biodisco de 5mm de cada caja que fue inmerso en buffer fosfatos 0.1 M pH 7.2 con glutaraldehído, después se continuó con una deshidratación gradual con etanol del 10 % hasta el 100 % cada 24 h en cada solución hasta un secado a punto crítico. La muestra deshidratada se colocó en un portaobjetos metálico y se pegó con un disco adhesivo de carbón conductivo, se tiñeron con una capa fina de Oro en un Ionizador y se observaron en microscopio electrónico de barrido (Sorrivas de Lozano *et al.*, 2014).

Con el resto de micelio cada caja se observó la morfología de los conidios de cada especie, para ello se realizó un raspado de cada caja con un bisturí previamente esterilizado y 5 mL de Tween al 0.5 % estéril, que posteriormente fueron filtrados y aforados a 5 mL, para después cuantificar las esporas/mL en una cámara de Neubauer y también se midió la longitud y anchura de 50 conidios de cada especie.

Se empleó un diseño completamente aleatorizado, donde la unidad experimental estuvo conformada por una caja Petri con seis repeticiones, registrándose el conteo y tamaño de cada especie, se realizó el análisis de varianza (ANOVA) y la comparación entre medias por el método de Tukey con una significancia del 5% con el programa SAS versión 20.1.

1.1.5. Prueba de patogenicidad

Mismos aislamientos utilizados para la caracterización morfológica fueron ocupados para la prueba de patogenicidad, los cuales se dejaron crecer por ocho días. La prueba se llevó a cabo en condiciones controladas de humedad relativa ($85 \pm 5 \%$), temperatura ($23^{\circ}\text{C} \pm 2$), luminosidad (fotoperiodo cada 12 h) en una cámara húmeda que constaba de una bolsa plástica, hermética y transparente, de 20 x 25 cm, que contenía una charola con papel filtro estéril humedecido con agua destilada estéril sobre el cual se colocó el fruto de papaya (Martínez y Zambrano, 1994; Smith *et al.*, 1997). El fruto de papaya fue lavado de agua y jabón, desinfectado en inmersión con hipoclorito de sodio al 2% por 1min, un enjuagado con agua destilada estéril y un secado con sanitas esteriles; luego se sometió a incubación en cámara húmeda por tres días con el propósito de detectar infecciones latentes y una vez confirmada la ausencia de contaminantes se realizó la inoculación con cinco biodiscos de 4mm de cada aislamiento previamente crecido de ocho días, que se colocaron de manera equidistante y se realizaron observaciones periódicas para detectar el desarrollo de síntomas y signos de la infección durante 10 días. Los síntomas se evaluaron cada dos días midiendo el diámetro de las lesiones (mm) de cada fruto, en dos direcciones perpendiculares utilizando un calibrador digital (Trupet, Stainless steel) (Velho *et al.*, 2015).

Se empleó un diseño completamente aleatorizado, donde la unidad experimental estuvo conformada por un fruto de papaya con seis repeticiones, se registró el crecimiento micelial en cada una de las papayas y se realizó el análisis de varianza y las pruebas de comparación entre medias por Tukey a nivel del 5% con el programa SAS versión 20.1.

4. RESULTADOS

1.1.6. Caracterización molecular

De los 35 aislados estudiados con secuenciación de ITS y de ACT obtenidas y su posterior comparación con secuencias previamente reportadas e identificadas, se obtuvo que el 60% perteneció a la especie *C. brevisporum* misma especie que se encuentra dentro del complejo de *Glomerella cingulata*, 20% a *C. cliviae* del complejo de *C. gloeosporioides* (Weir *et al.*, 2012), 8.6% a *C. truncatum* del complejo de *C. truncatum* (Cannon *et al.*, 2012), 5.7% *C. gloeosporioides* y 2.8% *C. aenigma* que pertenecen al complejo *C. gloeosporioides* (Weir *et al.*, 2012) y 2.7% a *C. karstii* del complejo *C. boninense* (Damm *et al.*, 2012) (Cuadro 1).

Cuadro 1.1. Origen geográfico, nomenclatura y número de accesión en el GenBank de aislados de frutos de papaya Cv ‘Maradol’ en México.

Estado	Municipio	Nomenclatura	Nombre con ACT	Número de accesión en GenBank	
				ITS	ACT
Campeche	Campeche	Ca1 ₄	<i>C. brevisporum</i>	KX828189	KX914908
		Ca1 ₁₀	<i>C. cliviae</i>	KX828201	KX950010
	Halcechakan	Ca2 ₂	<i>C. cliviae</i>	KX828200	KX950011
		Ca2 ₆	<i>C. cliviae</i>	KX897999	KX902194
Chiapas	Acapetahua	Ch1 ₁₀	<i>C. brevisporum</i>	KX828185	KX950012
	Mazatan	Ch2 ₇	<i>C. brevisporum</i>	KX897995	KX950013
	Tapachula	Ch3 ₁₃	<i>C. cliviae</i>	KX828202	KX950016
Colima	Colima (centro)	Co1 ₁	<i>C. truncatum</i>	KX828204	KX897169
		Co1 ₅	<i>C. brevisporum</i>	KX828186	KX902191
		Co1 ₉	<i>C. truncatum</i>	KX828205	KX950017
	Tecomán	Co2 ₁	<i>C. brevisporum</i>	KX828187	KX902192
		Co2 ₄	<i>C. brevisporum</i>	KX828188	KX950014
Guerrero	La unión de Isidoro	G1 ₅	<i>C. gloeosporioides</i>	KX828182	KX960139
		G1 ₈	<i>C. brevisporum</i>	KX828190	KX950015
Jalisco	Tomatlán	Ja2 ₅	<i>C. brevisporum</i>	KX828192	KX981472
		Ja2 ₁₀	<i>C. brevisporum</i>	KX828195	KX960134
Michoacán	La Huacana	M1 ₅	<i>C. karstii</i>	KX898000	KX960140
	Coahuayana	M2 ₅	<i>C. brevisporum</i>	KX897996	KX902193
Oaxaca	Villa de Tututepec de Melchor Ocampo	O1 ₃	<i>C. brevisporum</i>	KX897998	KX960135
		O1 ₇	<i>C. brevisporum</i>	KX433419	KX902195
	Santiago María Huazolotitlán	O2 ₂	<i>C. brevisporum</i>	KX433420	KX960136
		O2 ₇	<i>C. truncatum</i>	KX828203	KX981467
	Santiago Pinotepa Nacional	O3 ₁	<i>C. brevisporum</i>	KX433421	KX960137
		O3 ₁₀	<i>C. brevisporum</i>	KX898001	KX960138
	Santiago Jamiltepec	O4 ₁₁	<i>C. brevisporum</i>	KX897997	KX981473
	Santa María Jalapa de Marqués	O5 ₇	<i>C. cliviae</i>	KX828199	KX981469
O5 ₁₂		<i>C. cliviae</i>	KX828198	KX981470	
Tabasco	Balancán	T1 ₅	<i>C. brevisporum</i>	KX828191	KX981474
Yucatán	Tizimín	Yu3 ₅	<i>C. brevisporum</i>	KX828193	KX981475
		Yu3 ₆	<i>C. brevisporum</i>	KX828194	KX981476
Veracruz	Cotaxtla	V1 ₆	<i>C. brevisporum</i>	KX828196	KX981477
	Tierra Blanca	V2 ₂	<i>C. cliviae</i>	KX828197	KX981471
	Tlalixcoyan	V3 ₁	<i>C. gloeosporioides</i>	KX828183	KX981468
	Actopan	V3 ₉	<i>C. aenigma</i>	KX828184	KX981466
	Soledad de Doblado	V4 ₂	<i>C. brevisporum</i>	KX914907	KX981478

Con el análisis filogenético molecular se obtuvieron dos grandes clados (Figura 1.1). En el primero se encuentran las especies de *C. truncatum* del complejo *C. truncatum* y en el segundo clado varias especies estrechamente relacionadas con el complejo de *C. gloeosporioides* y *Glomerella cingulata*, por lo que el género *Colletotrichum* afecta a la papaya en la República Mexicana y tuvo una gran diversidad de especies al encontrarse seis (*C. aenigma*, *C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii* y *C. truncatum*).

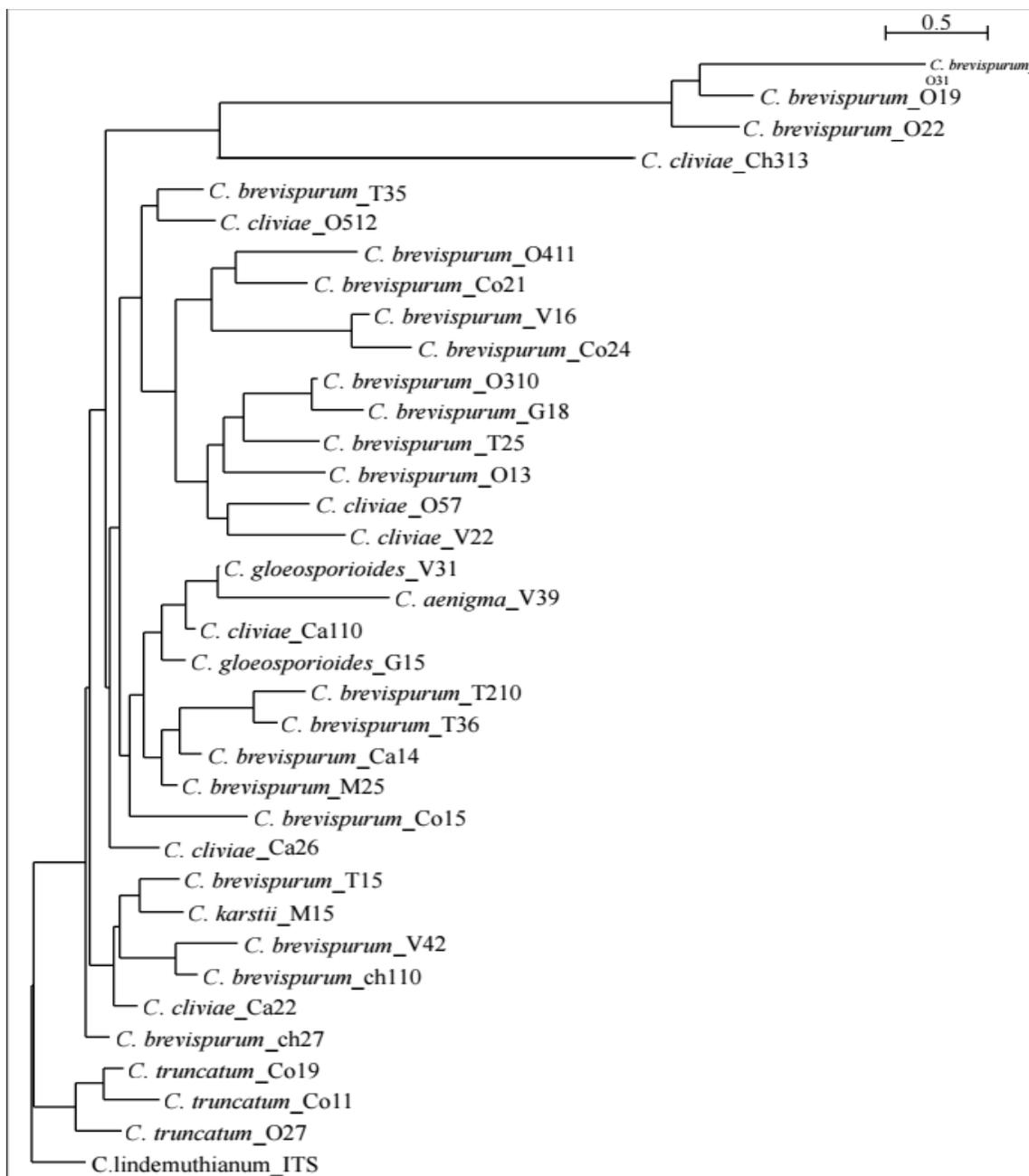


Figura 1.1. Árbol filogenético con máxima verosimilitud que muestra la relación entre los aislamientos de *Colletotrichum* de frutos de papaya Cv ‘Maradol’ generada por sus ITS-ACT y el método de máxima parsimonia se muestran en los nodos, respectivamente.

1.1.7. Caracterización morfológica

El aspecto de los seis aislados seleccionados como diferentes especies, mostró que el color observado en las colonias era característico del género *Colletotrichum* (Cuadro 1.2). Sin embargo, hubo variación en las tonalidades de los colores predominantes, un 67% de los

aislamientos presentaron coloración naranja con tintes grises, un 16.5% amarillo-naranja y otro 16.5% un negro-blanco; todas las coloraciones mostraron cambios con el transcurso del tiempo.

Con respecto al crecimiento miceliar de las colonias estudiadas, se observaron diferencias significativas en el crecimiento bajo las mismas condiciones. Los aislados de la especie de *C. karstii* tuvieron el menor crecimiento (2.2 mm/día), seguidos de *C. cliviae* y *C. brevisporum* (3 mm/d), y los de mayor crecimiento fueron los de *C. aenigma*, *C. gloeosporioides* y *C. truncatum* con 3.35 mm/d en promedio, no se presentó diferencia significativa en el crecimiento de estas tres últimas colonias. Cerca del 70 % de las cepas presentaron un crecimiento ralo-superficial del micelio; otras cepas presentaron crecimiento ralo-superficial con agregados miceliales de aspecto grumoso o agregados de micelio denso de aspecto algodonoso, distribuidos irregularmente por toda la cepa o en ocasiones formando anillos. Al microscopio se observó un micelio hialino, septado, con inclusiones citoplasmáticas y variaciones a medida que la cepa envejecía.

La forma de conidios se pudo observar tanto en las fotos de microscopía ocular como en las microfotografías electrónicas de barrido, la cual varió entre especies de *Colletotrichum*, que presentaron diversas formas de conidios tanto entre las diferentes cepas como dentro de una misma cepa. Las principales formas encontradas fueron: elipsoides, ligeramente fusiformes, ovoides, oblongas y elipsoides ligeramente constrictas, aunque en la mayoría siempre se presentó la típica forma de conidios hialinos, aseptados, cilíndricos y rectos, excepto en *C. karstii* que no hubo presencia de conidios en medio PDA y *C. truncatum* que tuvieron una forma de media luna con un parecido los conidios del género *Fusarium*. En las fotos de microscopía ocular también se mostró que *C. karstii* presentó la formación de ascocarpos que fueron marrón de forma y tamaño similar, no así en las demás especies y en las microfotografías electrónicas de barrido se evidenció la presencia de setas fértiles y largas con producción apical de conidios en *C. truncatum* en contraste con las demás especies no produjeron setas.

El tamaño de los conidios de las diferentes especies estudiadas presentó diferencia significativa, *C. truncatum* fue la que mostró 31.8 % mayor longitud (9.2 μm) con respecto a *C. gloeosporioides*, *C. aenigma*, *C. cliviae* y *C. karstii* que no tuvieron diferencia significativa entre ellas (6.05 μm), y 45.5% mayor con respecto a *C. brevisporum* que fue la

de menor tamaño (4.6 μm). El ancho de las conidias fluctuó entre 1.2 a 2.6 μm , con diferencia significativa, donde las conidias de *C. truncatum* fueron 55.7% menos anchas que las de *C. karstii* y 46% menos que las demás especies evaluadas que no presentaron diferencia significativa entre ellas.

Con respecto a la tasa de esporulación de cada aislado también fue bastante variado, con diferencia significativa en esta, teniendo que *C. brevisporum* tuvo la mayor tasa de esporulación (542.9×10^3 esporas/mL) siendo del 37 % más esporulación que *C. aenigma*, 97 % más que *C. truncatum* y *C. cliviae* y 99.5 % más que *C. gloeosporioides* y *C. karstii*.

Cuadro 1.2. Caracterización morfológica de aislamientos de *Colletotrichum* spp. de frutos de papaya cv. ‘Maradol’.

Especie Característica	<i>C. brevisporum</i>	<i>C. truncatum</i>	<i>C. gloeosporioides</i>	<i>C. cliviae</i>	<i>C. aenigma</i>	<i>C. karstii</i>
Frontal						
Anverso						
Crecimiento (mm/día)	3.1 ± 0.01 b	3.3 ± 0.01 a	3.3 ± 0.01 a	3.0 ± 0.02 b	3.4 ± 0.01 a	2.2 ± 0.01 c
Microscopio ocular						
Microscopia electrónica						
Largo de conidio (µm)	17.18 ± 0.71 c	22.93 ± 1.14 a	15.18 ± 0.56 b	16.33 ± 0.75 b	16.2 ± 0.75 b	12.78 ± 0.68 b,c
Ancho de conidio (µm)	4.3 ± 0.24 b	2.34 ± 0.19 c	4.34 ± 0.20 b	4.32 ± 0.21 b	4.38 ± 0.20 b	5.28 ± 0.36 a
Conteo de conidios (esporas/ml)	542.9 x 10 ³ ± 5.91 a	7.2 x 10 ³ ± 0.78 c	2.7 x 10 ³ ± 0.49 c, d	17 x 10 ³ ± 0.98 c	341.8 x 10 ³ ± 7.66 b	0.6 x 10 ³ ± 0.23 d

1.1.8. Patogenicidad

La patogenicidad es una característica que se usa comúnmente para diferenciar especies y los resultados presentados mostraron que todas fueron patogénicas, con un crecimiento ascendente con respecto al tiempo (Figura 1.2).

Las especies de *C. aenigma* y *C. brevisporum* fueron de mayor patogenicidad (1.1 cm de crecimiento micelial en fruto a los 10 d) con respecto a las otras especies, ya que mostraron tener 10 % mayor severidad que las cepas de *C. truncatum* y *C. cliviae*, 19 % más que las de *C. gloeosporioides* y 37.3 % más que los aislados de *C. kastii*.

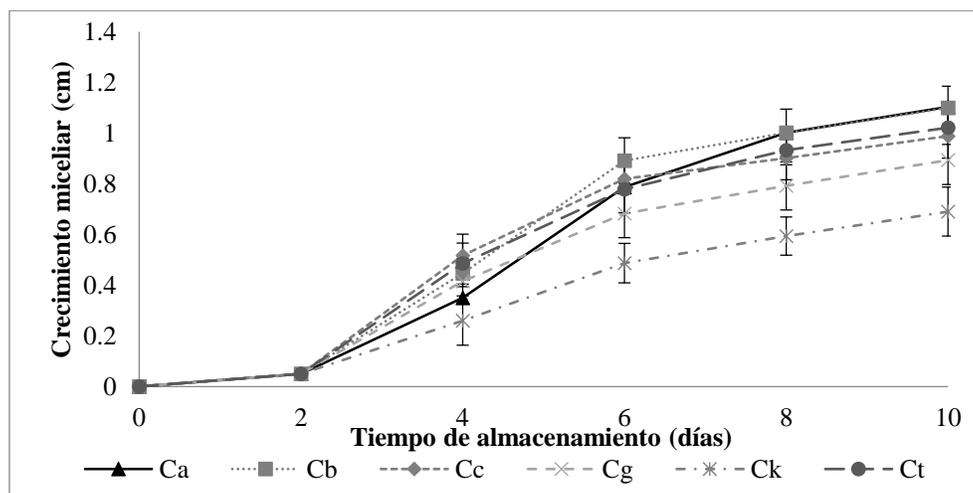


Figura 1.2. Crecimiento micelial en papaya ‘Maradol’ de 6 aislados. Ca: *Colletotrichum aenigma*, Cb: *C. brevisporum*, Cc: *C. cliviae*, Cg: *C. gloeosporioides*, Ck: *C. karstii*, Ct: *C. truncatum*.

Los resultados mostraron significativamente diferente nivel de virulencia y presentaron lesiones típicas de antracnosis similares a las encontradas en el campo (lesiones necróticas circulares o irregulares: áreas oscuras en la epidermis, brillantes y de tamaño variable, hundidas con bordes levantados, por hundimiento del tejido, y con masas de conidios salmón-naranja) (Cuadro 1.3).

A pesar de que hubo diferencia estadística en el crecimiento radial de los hongos sobre los frutos, en el Cuadro 1.3, se observan tres principales síntomas 1) los que sólo presentaron hundimiento sin crecimiento micelial del hongo (*C. cliviae* y *C. karstii*), 2) los que sólo presentaron hundimiento con ligero crecimiento micelial del hongo (*C. aenigma* y *C. brevisporum*) y 3) los que sólo presentaron hundimiento con abundante crecimiento micelial del hongo (*C. gloeosporioides* y *C. truncatum*). El re-aislamiento a partir de estas lesiones mostró siempre características morfológicas similares a las cepas usadas para la inoculación.

Cuadro 1.3. Seguimiento fotográfico de frutos de papayas cv. ‘Maradol’ inoculados con seis especies de *Colletotrichum* para determinar su patogenicidad.

Especie	Días de almacenamiento						Síntoma
	0	2	4	6	8	10	
<i>C. aenigma</i>							
<i>C. brevisporum</i>							
<i>C. cliviae</i>							
<i>C. gloeosporioides</i>							
<i>C. karstii</i>							
<i>C. truncatum</i>							

5. DISCUSIÓN

1.1.9. Caracterización molecular

La identificación de diferentes especies en el presente trabajo se vio facilitada en gran medida por el uso del gen Actina (ACT) como codificador de proteínas para identificaciones basadas en secuencias y por el análisis filogenético de multilocus (Damm *et al.*, 2012a, 2012b; Weir *et al.*, 2012.), cabe mencionar que la región ITS es el código de barras oficial para especies de hongos y actualmente estas secuencias por sí solas no son aceptadas debido a que no pueden separar las especies filogenéticamente relacionadas (Schena *et al.*, 2014; Siddiqui y Ali, 2014). Análisis filogenéticos basados en diferentes loci permitirán dilucidar esta situación.

Colletrichu brevisporum fue la de mayor frecuencia, por lo que se puede considerar que *C. gloeosporoides* no es el principal agente causal de la antracnosis en papaya, sino esta especie tal y como sucedió en el trabajo de Vieira *et al.* (2013), dicha evidencia recomendaría que dejase de ser la especie de *C. gloeosporioides* como la más importante en las enfermedades de papaya (Siddiqui y Ali, 2014) sino la especie de *C. brevisporum* que también se ha reportado en plantas de Tailandi (Noireung *et al.*, 2012), en *Licium chinense* (Paul *et al.*, 2014) y ocasionando la antracnosis en chayote (Bezerra *et al.*, 2016). Partiendo de que *C. gloeosporioides* es el principal agente causal de la antracnosis y de que se ha demostrado que este hongo es una especie compleja que contiene varias especies genética y biológicamente separadas (*Colletotrichum asianum*, *Colletotrichum fragariae*, *Colletotrichum fructicola*, *Colletotrichum kahawae*, *Colletotrichum siamense*, *Colletotrichum gloeosporioides* se ha denominado complejo ‘gloeosporioides’ (Phoulivong *et al.* 2010; Weir *et al.*, 2012).

La especie de *C. truncatum*, se considera un moho de peligro ya que se ha reportado que este hongo ocasiona infecciones en ojos como la queratitis y endoftalmitis (Squizzato *et al.*, 2015), por lo que sería de gran riesgo si se expande en los demás estados productores, ya que principalmente se aisló del estado de Colima. Se ha reportado que ocasiona la antracnosis en garbanzo (Mahmodi *et al.*, 2013), la antracnosis en durazno (Grabke *et al.*, 2014), la antracnosis en tomate (Diao *et al.*, 2014), la mancha foliar y frutal en mandarina (Cheng *et al.*, 2014) y ocasiona canchales en *Jatropha curcas* (Ellison *et al.*, 2015).

A pesar de que *C. karstii* tuvo poca presencia en las cepas utilizadas, tiene una gran importancia, ya que en los últimos años se ha encontrado en varias plantas hospedantes

tropicales de Brasil tales como, maracuyá, papaya, y cereza (Damm *et al.*, 2012a), que infecta *Phalaenopsis* (Jadrane *et al.*, 2012), mango (Lima *et al.*, 2013), ocasiona antracnosis de oliva (Schena *et al.*, 2014), en guanábana (Álvarez *et al.*, 2014), antracnosis en hojas de arándano (Rios *et al.*, 2015), mancha foliar por *Glomerella* (GLS) en manzana (Velho *et al.*, 2015), antracnosis en Chile (Saini *et al.*, 2016), antracnosis en aguacate (Velázquez del Valle *et al.*, 2016) y antracnosis en limón Persa (Wang *et al.*, 2016). Con lo antes mencionado, los resultados sugieren que este hongo ha tenido una gran adaptación y expansión, por lo que sería recomendable continuar con su estudio.

La especie de *C. aenigma* al igual que *C. karstii* tampoco se presentó con gran frecuencia, sin embargo mostró tener una alta patogenicidad en los frutos de papaya, lo que los resultados recomiendan continuar con su estudio, ya que a diferencia de *C. karstii* ha sido poco estudiada y mencionada en trabajos de investigación (Weir *et al.*, 2012), se encuentra relacionada en la antracnosis de *Proteacea* (Liu *et al.*, 2013), en la mancha de la hoja en manzanas de China (Wang *et al.*, 2015) y en la antracnosis en fresa (Han *et al.*, 2016).

Con respecto a *C. cliviae*, a pesar de que tuvo mayor frecuencia que *C. aenigma* y *C. karstii*, solo ha sido reportada por Yang *et al.* (2009) en *Amaryllidaceae* y Paul *et al.* (2014) en *Licium chinense*; sin embargo, en la prueba de patogenicidad realizada en el presente trabajo esta especie tuvo un efecto significativo muy similar al presentado por *C. karstii*, por lo que continuar con su estudio sería de gran aporte.

Por otra parte, la variabilidad presente en este estudio se puede explicar por las diferentes papayas de donde fueron aisladas las cepas, así como también por las barreras geográficas y las variaciones agroclimáticas entre los sitios de aislamiento.

Por lo tanto, el análisis filogenético molecular multilocus parece ser esencial para identificar correctamente las especies de *Colletotrichum*. La identificación de las especies de *Colletotrichum* es de suma importancia para entender mejor la epidemiología de la enfermedad, en particular aquellos en los que pueden existir diferencias en la capacidad de infectar diferentes tejidos del hospedante.

1.1.10. Caracterización morfológica

Muchos de los parámetros morfológicos de clasificación taxonómica (aspecto visual, crecimiento, forma, tamaño, tasa de esporulación, etc.), son inseguros, pues se ven influenciados por varios factores externos, como son: la temperatura, el pH, la edad del

medio de cultivo y del hongo, entre otros, que ocasionan que la estabilidad de los rasgos morfológicos se vea afectada por dichos factores que favorecen o no el desarrollo del organismo y afectan su expresión fenotípica, dificultando su diferenciación; además de la existencia de formas intermedias en la morfología conidial y en el tamaño por la dependencia del medio o sustrato así como también de las diferentes temperaturas a las cuales se sometan, intensidad de luz, fotoperiodo, tiempo de incubación, humedad relativa, etc., lo cual conlleva a que la cepa pueda ser identificada como una u otra especie, dependiendo de los criterios individuales del identificador (Phoulivong *et al.*, 2010; Weir *et al.*, 2012; Noireung *et al.*, 2012; Huan *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014; Paul *et al.*, 2014; Sharma y Shenoy, 2013; Hu *et al.*, 2015; Velho *et al.*, 2015).

También la falta de estandarización de los protocolos y condiciones de trabajo entre los diferentes investigadores, así como la inexistencia de convenciones internacionalmente aceptadas, crean controversias y confusiones que dificultan y producen incertidumbre en las identificaciones de los aislamientos.

La variabilidad en la coloración de los aislamientos del hongo es considerada normal y ha sido registrada por Cannon *et al.* (2012), Weir *et al.* (2012) quienes sugieren tener precaución cuando se usa esta característica para separar especies, ya que es muy subjetivo de acuerdo a la vista del identificador.

Tanto en las microfotografías electrónicas de barrido (Siddiqui y Ali, 2014) y fotografías de microscopía ocular (Noireung *et al.*, 2012; Huan *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2013; Peng *et al.*, 2013; Jiang *et al.*, 2014; Paul *et al.*, 2014; Sharma y Shenoy, 2013; Hu *et al.*, 2015; Velho *et al.*, 2015) se pueden observar colores, formas y estructuras que a simple vista muestran diferentes especies. Tal es el caso de la presencia de setas (hifas de crecimiento determinado, de pared gruesa, oscura y estériles que no producen conidios) (Kirk *et al.*, 2001) en *C. truncatum*, mismas que no se producen en todos los aislamientos del complejo de *C. gloeosporioides* y que su formación está en función de la humedad relativa y de las condiciones de incubación del aislamiento y de acuerdo con los principios de conidiogénesis, las setas fértiles poseen una célula conidiogénica apical con un solo lóculo conidiogénico en la punta, a diferencia de las setas estériles, por lo que no pueden considerarse como criterio taxonómico para la identificación de *C. gloeosporioides* o para diferenciar *Colletotrichum* de otro género relacionado. Otra estructura mostrada fueron los ascocarpos que al igual que las setas, no son estructuras determinantes en la identificación de especies (Liu *et al.*, 2013 y Huang *et al.*, 2013)

Según Phoulivong *et al.*, (2010) la morfología de los conidios se puede utilizar para diferenciar los taxones en complejos de especies, pero no son criterios suficientes para separar las especies dentro de un género como el de *Colletorichum* o un complejo como el *Colletotrichum gloeosporioides*. El tamaño de los conidios del presente trabajo se encontró dentro de lo reportado en la literatura (Noireung *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Puel *et al.*, 2014; Álvarez *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015). No así la tasa de crecimiento que se encontró inferior a lo presentado por Noireung *et al.* (2012) y Hu *et al.* (2015). Mientras que la variación de esporulación fue semejante a la que se mostró en el trabajo de Rabha *et al.* (2016).

1.1.11. Patogenicidad

En la interacción hospedante-patógeno, no se conoce con claridad por qué una especie ataca a un hospedante y no a otro; frecuentemente ese tipo de patrones se establecen sólo cuando todas las relaciones filogenéticas han sido establecidas se presentan patogenicidad diferenciada con respecto al hospedero con el cual puede ser sexualmente compatible (Peng *et al.*, 2013; Alvarez *et al.*, 2014 Jiang *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015; Velho *et al.*, 2015).

Esta explicación es viable porque algunos autores asocian los altos porcentajes de infección utilizando inoculo natural, sin causar heridas (Velho *et al.*, 2015), a la existencia de una asociación sinergista de otros organismos con *Colletotrichum*; especialmente con bacterias del género *Ralstonia* que, luego de aprovechar el hierro existente en la masa de conidios, promueven la germinación de los mismos e inducen la formación de apresorios. El apresorio es una estructura sin la cual *Colletotrichum* es incapaz de causar infección (Noireung *et al.*, 2012; Liu *et al.*, 2013; Puel *et al.*, 2014). Para la formación de apresorios es necesaria la interacción planta-patógeno y se involucra la activación secuencial de diferentes grupos de genes que definen la penetración al hospedante. Estas señales son reconocidas y utilizadas para definir las relaciones de compatibilidad e incompatibilidad entre las especies (Álvarez *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015).

Así como la formación de apresorio es indispensable para que haya patogenicidad; la maduración es un factor muy importante, ya que una característica de *Colletotrichum* spp. es que presenta quiescencia, es decir, que se encuentra en reposo o latente y siempre se produce en la etapa inmadura de las frutas infectadas por los hongos, y se desarrolla progresivamente a la putrefacción infección como los frutos maduran (Prusky *et al.*,

2013). Sin embargo, se sabe que la herida mejora el éxito de la infección por *Colletotrichum* y la severidad de la enfermedad (Phoulivong *et al.* 2012). Además, el uso de la herida puede romper el reposo infección y mejorar la capacidad de infección (Jiang *et al.*, 2014).

Las diferencias en la patogenicidad de una cepa puede ser consecuencia de las interacciones del medio ambiente, la secreción de enzimas ex-intracelulares (por ejemplo, cutinasa) que degradan la cutícula y la pared celular para entrar en la planta, al genotipo del hospedante y a la variabilidad en el periodo de latencia del hongo representa una adaptación importante a las condiciones de la fisiología del tejido del hospedante y a las condiciones climatológicas durante el ciclo del cultivo, el almacenamiento prolongado también atenúa la eficacia patogénica de los aislados, además de que los aislados son más agresivos en su hospedante original que en otros hospedantes (Peng *et al.*, 2013; Alvarez *et al.*, 2014 Jiang *et al.*, 2014; Hu *et al.*, 2015; Velho *et al.*, 2015).

6. CONCLUSIÓN

Con los diferentes métodos moleculares y morfofisiológicos utilizados en la diferenciación de aislados de *Colletotrichum spp.* de frutos de papaya ‘Maradol’ resultó eficiente con respecto a la caracterización intraespecífica, ya que se encontró más de una especie de *Colletotrichum* causando síntomas de antracnosis. De la parte molecular se obtuvieron seis especies (*Colletotrichum cliviae*, *Colletotrichum truncatum*, *Colletotrichum brevisporum*, *Colletotrichum karstii*, *Colletotrichum aenigma*, *Colletotrichum gloeosporioides*), y *Colletotrichum brevisporum* resultó ser el principal agente causal de la antracnosis en papaya. Las mismas especies presentaron variaciones morfológicas (diferente aspecto, color, tipo y crecimiento de micelio, diferente forma y tamaño de conidios y tasa de esporulación) y patogénicas y solo la parte morfológica no sería confiable para la identificación de especies. Los resultados de este estudio son relevantes debido a que constituyen nuevos reportes fitosanitarios en frutos de papaya y son la demostración de la diversidad y la virulencia de las especies de *Colletotrichum* que infectan a la papaya para que así se facilite el desarrollo e implementación de prácticas de manejo de la enfermedad y de las medidas de cuarentena más eficaces para reducir al mínimo el riesgo de introducir nuevas especies a través de fronteras y continentes.

7. LITERATURA CITADA

- Álvarez E., Gañán L., Rojas-Triviño A., Mejía J.F., Llano G.A., González A., **2014**. Diversity and pathogenicity of *Colletotrichum* species isolated from soursop in Colombia. *Eur J Plant Pathol.*, 139: 325-338. <http://dx.doi.org/10.1007/s10658-014-0388-7>.
- Bezerra J.P., Ferreira P.V., Barbosa L. da F., Ramos-Sobrinho R., Pinho D.B., Reis A., Assunção I.P., Lima G.S.A. **2016**. First Report of Anthracnose on Chayote Fruits (*Sechium edule*) Caused by *Colletotrichum brevisporum*. *Plant disease*, 100: 217-219. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0793-PDN>.
- Boratyn G.M., Camacho C., Cooper P.S., Coulouris G., Fong A., Ma N., Madden T.L., Matten W.T., McGinnis S.D., Merezhuk Y., Raytselis Y., Sayers E.W., Tao T., Ye J., Carbone I. y Kohn L.M. **1999**. A method for designing primer sets for speciation studies in filamentous ascomycetes. *Mycologia*, 91: 553–556.
- Cai L., Hyde K.D., Taylor P.W.J., Weir B.S., Waller J. **2009**. A polyphasic approach for studying *Colletotrichum*. *Fungal Diversity*, 39: 183-204.
- Cannon P.F., Damm U., Johnston P.R., Weir B.S. **2012**. *Colletotrichum* – Current status and future directions. *Studies in Mycology*, 73: 181-213.
- Cheng B.P., Huang Y.H., Peng A.T., Ling J.F., Song X.B., Chen X. **2014**. First Report of Leaf and Fruit Spot of *Citrus reticulata* Blanco cv. Nian Ju Caused by *Colletotrichum truncatum* in China. *Plant Disease*, 98(3): 422-424. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-13-0712-PDN>.
- Crouch J.A., Beirn L.A., Cortese L.M., Bonos S.A., Clarke B.B. **2009**. Anthracnose disease of switchgrass caused by the novel fungal species *Colletotrichum navitas* *Mycological Research*, 113: 1411-1421. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mycres.2009.09.010>.
- Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H.C., Crous P.W. **2012a**. The *Colletotrichum acutatum* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 37-113.
- Damm U., Cannon P.F., Woudenberg J.H.C., Johnston P.R., Weir B., **2012b**. The *Colletotrichum boninense* species complex. *Studies in Mycology*, 73: 1-36.
- Desper R., Y Gascuel O. **2002**. Fast and accurate phylogeny reconstruction algorithms based on the minimum-evolution principle. *Journal of computational biology: a journal of computational molecular cell biology*, 9: 687-705.

- Diao Y.Z., Zhang C., Lin D., Liu X.L. **2014**. First Report of *Colletotrichum truncatum* Causing Anthracnose of Tomato in China. *Plant Disease*, 98(5): 687-689. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-05-13-0491-PDN>.
- Ellison C.A., Sawadogo A., Braman S., Nacro S. **2015**. First Report of *Colletotrichum truncatum* Causing Stem Cankers on *Jatropha curcas* in Burkina Faso. *Plant Disease*. 99: 14-20. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-02-14-0181-RE>.
- FAOSTAT. 2016. Food and Agriculture Organization of United Nations, Statics. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>.
- Figtree M., Weeks K., Chan L., Leyton A., Bowes A., Giuffre B., Sullivan M., Hudson B.J. **2013**. *Colletotrichum gloeosporioides* sensu lato causing deep soft tissue mycosis following a penetrating injury. *Medical Mycology Case Reports*, 2: 40-43. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mmcr.2013.01.003>
- Gardes M. y Bruns T.D. **1993**. ITS primers with enhanced specificity for basidiomycetes application to the identification of mycorrhizae and rusts. *Molecular Ecology*, 2: 113–118.
- Gascuel O. **1997**. BIONJ: An improved version of the NJ algorithm based on a simple model of sequence data. *Molecular biology and evolution*, 14: 685-695.
- Gouy M., Guindon S., Gascuel O. **2010**. SeaView version 4: A multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Molecular biology and evolution*, 27: 221-224.
- Grabke A., Williamson M., Henderson G.W., Schnabel G. **2014**. First Report of Anthracnose on Peach Fruit Caused by *Colletotrichum truncatum* in South Carolina. *Plant Disease*, 98(8): 1154-1156. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-13-1215-PDN>.
- Guindon S., Dufayard J.F., Lefort V., Anisimova M., Hordijk W., Gascuel O. **2010**. New Algorithms and Methods to Estimate Maximum-Likelihood Phylogenies: Assessing the Performance of PhyML 3.0. *Syst Biol*, 59: 307-321.
- Gupta V.K., Tuohy M.G., Gaur R. **2013**. Methods for high-quality DNA extraction from fungi. In: Gupta VK, Tuohy MG, Ayyachamy M, Turner KM, O'Donovan (eds), *A Laboratory Protocols in Fungal Biology: current methods in fungal biology*. Springer, New York, pp. 403e406. http://dx.doi.org/10.1007/978-1-4614-2356-0_36.
- Hall T.A. **1999**. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*, 41: 95-98.

- Han Y.C., Zeng X.G., Xiang F.Y., Ren L., Chen F.Y., Gu Y.C. **2016**. Distribution and Characteristics of *Colletotrichum* spp. Associated with Anthracnose of Strawberry in Hubei, China. *Plant Disease*, 100(5): 996-1006. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1016-RE>.
- Hardur Venkatappa Annegowda y Rajeev Bhat. **2015**. Chapter 21: Composition of Papaya Fruit and Papaya Cultivars. In *Nutricional Composition of Fruit Cultivars* editado por: Simmonds Monique S.J. y Preedy Victor R. Academy Press. 497-516. <https://books.google.com.mx/books?isbn=0124080642>.
- Hewajulige, **2015**. Papayas. In *Encyclopedia of Food and Health*. Editado por: Caballero B., Finglas P.M, y Toldrá F. Vol. 1. Elsevier-Academy Press. Reino Unido. 209-212. <https://books.google.com.mx/books?isbn=0123849535>.
- Hu M-J., Grabke a., Schnabel G. **2015**. Investigation of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing anthracnose fruit rot of peach in South Carolina. *Plant Disease*, 99:797-805. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1076-RE>.
- Huang F., Chen G.Q., Hou X., Fu Y.S., Cai L., Hyde K.D., Li H.Y. **2013**. *Colletotrichum* species associated with cultivated citrus in China. *Fungal Diversity*, 61: 61-74. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-013-0232-y>.
- Jadrane I., Kornievsky M., Desjardin D.E., He Z., Cai L., Hyde K., **2012**. First report of flower anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in white *Phalaenopsis* orchids in the United States. *Plant Disease* 96: 1227. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-04-12-0360-PDN>.
- Jiang J., Zhai H., Li H., Wang Z., Chen Y., Hong N., Wang G., Nchongboh Chofong G., Xu W. **2014**. Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spots on young fruits related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China. *Crop Protection*, 58: 41-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.01.003>.
- Kamle M., Kumar P., Gupta V., Tiwari A.K., Misra A.K., Pandey B.K. **2013**. Identification and phylogenetic correlation among *Colletotrichum gloeosporioides* pathogen of anthracnose for mango. *Biocatalysis and Agricultural Biotechnology*, 2: 285-287. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bcab.2013.04.001>.
- Kirk, P. M., P. F. Cannon, J. C. David, and J. A. Stalpers. **2001**. *Dictionary of the Fungi*. CAB International. Oxon, UK.
- Lima N.B., Marques M.W., Michereff S.J., Morais Jr. M.A., Barbosa M.A.G., Câmara M.P.S. **2013**. First Report of Mango Anthracnose Caused by *Colletotrichum karstii* in

- Brazil. *Plant Disease*, 97(9): 1248-1253. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-01-13-0002-PDN>.
- Liu F., Damm U., Cai L., Crous P.W. **2013a**. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* Complex associated with anthracnose diseases of *Proteaceae*. *Fungal Diversity*, 61:89–105. <http://doi10.1007/s13225-013-0249-2>.
 - Liu L., Zhao D., Zheng L., Hsiang T., Wei Y., Fu Y., Huang J. **2013b**. Identification of virulence genes in the crucifer anthracnose fungus *Colletotrichum higginsianum* by insertional mutagenesis. *Microbial Pathogenesis*, 64: 6-17. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2013.06.001>.
 - Liu Y., Li B., Wang C., Liu C., Kong X., Zhu J., Dai H. **2016**. Genetics and Molecular Marker Identification of a Resistance to *Glomerella* Leaf Spot in Apple. *Horticultural Plant Journal*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.hpj.2016.06.002>
 - Maeda C. y Nelson S. **2014**. Anthracnose of Papaya in Hawaii. *Plant Disease*, 103: 1-6.
 - Mahmodi F., Kadir J.B., Nasehi A., Puteh A., Soleimani N. **2013**. Occurrence of Anthracnose Caused by *Colletotrichum truncatum* on Chickpea (*Cicer arietinum*) in Malaysia. *Plant Disease*, 97(11): 1507-1509. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-13-0231-PDN>.
 - Noireung P., Phoulivong S., Liu F., Cai L., McKenzie E.H.C., Chukeatirote E., Jones E.B. G., Bahkali A.H., Hyde K.D. **2012**. Novel Species of *Colletotrichum* Revealed by Morphology and Molecular Analysis. *Cryptogamie, Mycologie*, 33(3): 347-362. <http://dx.doi.org/10.7872/crym.v33.iss3.2012.347>
 - Paul N.C., Lee H.B., Lee J.H., Shin K.S., Ryu T.H., Kwon H.R., Kim Y.K., Youn Y.N., Yu S.H. **2014**. Endophytic Fungi from *Lycium chinense* Mill and Characterization of Two New Korean Records of *Colletotrichum*. *International Journal of Molecular Sciences*, 15: 15272-15286. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms150915272>
 - Peng L-J., Sun T., Yang Y-L., Cai L., Hyde K.D., Bahkali A.H., Liu Z-Y. **2013**. *Colletotrichum* species on grape in Guizhou and Yunnan provinces, China. *Mycoscience*, 54: 29-41. <http://dx.doi.org/10.1016/j.myc.2012.07.006>.
 - Phoulivong S., Cai L., Chen H., McKenzie E.H.C., Abdelsalam K., Chukeatirote E., Hyde K.D. **2010**. *Colletotrichum gloeosporioides* is not a common pathogen on tropical fruits. *Fungal Diversity* 44: 33-43. <http://dx.doi.org/10.1007/s13225-010-0046-0>.

- Phoulivong S., McKenzie E.H.C., Hyde K.D. **2012**. Cross infection of *Colletotrichum* species; a case study with tropical fruits. *Current Research in Environmental & Applied Mycology*, 2: 99-111. <http://dx.doi.org/10.5943/cream/2/2/2>.
- Prusky D., Alkan N., Mengiste T., Fluhr R. **2013**. Quiescent and Necrotrophic Lifestyle Choice During Postharvest Disease Development. *Annual Review of Phytopathology*, 51:155-176. <http://dx.doi.org/10.1146/annurev-phyto-082712-102349>.
- Rabha A J., Naglot A., Dutta Sharma G., Kumar Gogoi H., Kumar Gupta V., Dutta Shreemali D., Veer V. **2016**. Morphological and molecular diversity of endophytic *Colletotrichum gloeosporioides* from tea plant, *Camellia sinensis* (L.) O. Kuntze of Assam, India. *Journal of Genetic Engineering and Biotechnology* (2016) xxx, xxx–xxx. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jgeb.2015.12.003>.
- Rios J.A., Pinho D.B., Moreira W.R., Pereira O.L., Rodrigues F.A. **2015**. First Report of *Colletotrichum karstii* Causing Anthracnose on Blueberry Leaves in Brazil. *Plant Disease*, 99: 157-161. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-14-0717-PDN>.
- Saini T.J., Gupta S.G., Char B.R., Zehr U.B., Anandalakshmi R. **2016**. First report of chilli anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in India. *New Disease Report*, 34(6): X-X. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2016.034.006>.
- Serra I.M.R.S., Menezes M., Coelho R.S.B., Ferraz G.M.G., Montarroyos A.V.V., Martins L.S.S. **2011**. Molecular Analysis in the Differentiation of *Colletotrichum gloeosporioides* Isolates from the Cashew and Mango Trees. *An International Journal Brazilian Archives of Biology and Technology*, 54(6): 1099-1108.
- Sharma G., Shenoy B.D. **2013**. Multigene sequence-based identification of *Colletotrichum cymbidiicola*, *C. karstii* and *C. phyllanthi* from India. *Czech Mycol.*, 65(1): 79-88.
- Schena L., Mosca S., Cacciola S.O., Faedda R., Sanzani S.M., Agosteo G.E., Sergeeva V., Magnano di San Lio G. **2014**. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. boninense* complexes associated with olive anthracnose. *Plant Pathology*, 63: 437-446. <http://dx.doi.org/10.1111/ppa.12110>.
- SIAP-SAGARPA, **2016**: Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera-Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://www.siap.gob.mx/cierre-de-la-produccion-agricola-por-estado/>.

- Siddiqui Y. y Ali A. **2014**. Chapter 11. *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). In Postharvest Decay. Control Strategies. Editado por: Bautista-Baños S. Elsevier-Academic Press. Estados Unidos de América. 337-371. <https://books.google.com.mx/books?isbn=0124115683>.
- Sorrivias de Lozano V., Morales A., Yañez M.J. **2014**. Principios y práctica de la Microscopía Electrónica. SBN:978-987-43-4752-7. Disponible en: <http://www.bahiablanca-conicet.gob.ar/biblioteca/principios-practica-microscopia-electronica.pdf>.
- Squizzato V., Yucel Y.H., Richardson S.E., Alkhotani A., Wong D.T., Nijhawan N., Chan C.C. **2015**. *Colletotrichum truncatum* species complex: Treatment considerations and review of the literature for a non usual pathogen causing fungal keratitis and endophthalmitis. Medical Mycology Case Reports 9: 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mmcr.2015.06.001>.
- Stracieri J., Pereira F.D., da Silveira A.L., Magalhães H.M., de Goes A. **2016**. Morphocultural and molecular characterization of papaya tree *Colletotrichum* spp. African Journal of Agricultural Research, 11(19): 1755-1764. <http://dx.doi.org/10.5897/AJAR2016.10868>.
- Sun C.Y., Mao S.L., Zhang Z:H., Palloix A., Wang L.H., Zhang B.X. **2015**. Resistances to anthracnose (*Colletotrichum acutatum*) of Capsicum mature green and ripe fruit are controlled by a major dominant cluster of QTLs on chromosome P5. Scientia Horticulturae, 181: 81-88.
- Tamura K. y Nei M. **1993**. Estimation of the number of nucleotide substitutions in the control region of mitochondrial DNA in humans and chimpanzees. Molecular biology and evolution, 10: 512-526.
- Tapia-Tussell R., Cortés-Velázquez A., Valencia-Yah T., Navarro C., Espinosa E., Moreno B., Perez-Brito D. **2016**. First Report of *Colletotrichum magnum* Causing Anthracnose in Papaya in Mexico. Plant disease. Posted online. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0324-PDN>.
- Than P.P., Jeewon R., Hyde K.D., Pongsupasamit S., Mongkolporn O., Taylor P.W.J. **2008a**. Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum* species associated with anthracnose on chilli (*Capsicum* spp.) in Thailand. Plant Pathology, 57: 562–572.

- Thompson J.D., Gibson T.J., Higgins D.G. **2002**. Multiple sequence alignment using ClustalW and ClustalX. Current protocols in bioinformatics / editorial board, Andreas D Baxevanis Chapter 2, Unit 2-3.
- USDA, **2016** Departamento de Agricultura de los Estados Unidos. <http://www.ers.usda.gov/data-products/fruit-and-tree-nut-data/data-by-commodity.aspx>.
- Velázquez del Valle M.G., Campos-Martínez A., Flores-Moctezuma H.E., Suárez-Rodríguez R., Ramírez-Trujillo J.A., Hernández-Lauzardo A.N. **2016**. First Report of Avocado Anthracnose Caused by *Colletotrichum karstii* in Mexico. Plant Disease. 100(2): 534-536. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-15-0249-PDN>.
- Velho A.C., Alaniz S., Casanova L., Mondorino P., Stadnik M.J., **2015**. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with Apple diseases in southern Brazil and Uruguay. Fungal Biology, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.009>.
- Vieira W.A.S., Nascimento R.J., Michereff S.J., Hyde K.D., Camara M.P.S. **2013**. First Report of Papaya Fruit Anthracnose Caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. Plant Disease. 97:1659-1966. <http://apsjournals.apsnet.org/doi/full/10.1094/PDIS-07-15-0793-PDN>.
- Wang W., Fu D.D., Zhang R., Sun G.Y., **2015**. Etiology of apple leaf spot caused by *Colletotrichum* spp. Mycosystema, 34(1): 13–25.
- Wang J., Ai C.X., Yu X.M., An M., Sun S., Gao R. **2016**. First Report of *Colletotrichum karstii* Causing Anthracnose on Persimmon Leaves in China. Plant Disease, 100(2): 532-533. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-07-15-0787-PDN>.
- Weir B., Johnston P.R., Damm U. **2012**. The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. Studies in Mycology. 73: 115-180. <http://dx.doi.org/10.3114/sim0011>.
- White T.J., Bruns T., Lee S., Taylo R.J. **1990**. Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. In: Innis MA, Gelfand DH, Shinsky JJ, White TJ (eds), PCR Protocols: a guide to methods and applications.
- Yang Y.L., Liu Z.Y., Cai L., Hyde K.D., Yu Z.N., Mckenzie E.H.C. **2009**. *Colletotrichum* anthracnose of *Amaryllidaceae*. Fungal Diversity, 39: 123-149.
- Zaretskaya I. **2013**. BLAST: a more efficient report with usability improvements. Nucleic Acids Research 41: 29-33. <http://dx.doi.org/10.1093/nar/gkt282>.

2. CAPÍTULO II. Caracterización química de polifenoles de hoja de guayaba (*Psidium guajava*) y su efecto antifúngico sobre seis especies de *Colletotrichum*

Lira-Vargas A.A.¹, Trejo-Márquez M.A.², Vargas-Martínez, M.G.³; Orozco-Santos M.⁴, Rojas-Martínez R.I.¹, Landero-Valenzuela N.⁵, Nieto-Ángel D.^{1*}

¹ Colegio de Posgraduados, Posgrado-Fitosanidad-Fitopatología, Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo, Texcoco, 56230, Estado de México.

² Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Centro de Asimilación Tecnológica, Laboratorio de Postcosecha de productos vegetales, Jiménez Cantú s/n, San Juan Atlámica, Cuautitlán Izcalli, 54700, Edo. de México.

³ Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Campo 1. Av. 1ro de Mayo s/n, Santa María las Torres, Cuautitlán Izcalli, 54740, Edo. de México.

⁴ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias C.E. Tecoman, Carretera Colima-Manzanillo, Km 35, Predio La Escondida, Tecoman, 28930, Colima.

⁵ CONACyT-Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Tepatepec, 42660, Hidalgo-México.

*Autor de correspondencia: dnieto@colpos.mx

2.1.RESUMEN

La alta severidad de la antracnosis causada por el género *Colletotrichum* en frutos de papaya ha llevado a los productores a realizar aplicaciones constantes de fungicidas, y en muchas ocasiones se sobre-dosifica causando contaminación ambiental, por lo que el uso de extractos de plantas con propiedades fungicidas o fungistáticas son una alternativa en el manejo de dicha enfermedad, por lo que el objetivo de la presente investigación fue determinar la composición fitoquímica del extracto etílico vegetal de hojas de guayaba (*Psidium guajava*), así como la evaluación de la efectividad biológica *in vitro* sobre seis especies de *Colletotrichum* para el manejo de la antracnosis en frutos de papaya cv ‘Maradol’. En la obtención de los extractos se utilizaron hojas de guayaba silvestre cv ‘Criolla’ y se empleó el método de extracción asistida por ultrasonido de baja frecuencia; la identificación de flavonoides en los extractos se hizo por cromatografía de líquidos de alta resolución y electroforesis capilar; y para la evaluación de su actividad antifúngica se realizó por el método de microdilución-difusión en agar, probando cinco concentraciones del extracto etílico: 100, 150, 200, 250 y 300 ppm de extracto para seis especies de *Colletotrichum* (*C. aenigma*, *C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii* y *C. truncatum*) previamente aisladas e identificadas de frutos de papaya cv ‘Maradol’. Los resultados mostraron que el extracto de guayaba principalmente presentó los polifenoles: florizidina, epicatequina, quercitina, catequina y ácido ascórbico. En la actividad antifúngica se mostró que, a mayor concentración del extracto, mayor fue el efecto inhibitorio y que la concentración de 300ppm fue la óptima para controlar el 100% de crecimiento de las seis

especies evaluadas, además de que se tuvo efecto significativo entre cada especie evaluada. De acuerdo a lo anterior el uso de extractos de hojas de guayaba son una alternativa inofensiva tanto para el hombre como para el ambiente en el control de los síntomas de antracnosis en papaya y sustitución y/o complemento a tratamientos químicos, debido a los compuestos bioactivos presentes en el extracto.

Palabras clave: Extracto vegetal, Actividad antifúngica, *Colletotrichum gloeosporioides*, Metabolitos secundarios, Polifenoles, Flavonoides.

2.2.ABSTRACT

High severity of anthracnose caused by the fungus from the *Colletotrichum* genus in papaya fruits has led producersto carry out constant applicationsof fungicideson crops,causing many times overdoses and environmental contamination; thus, the use of plant extracts with fungicidal or fungistatic properties applied to crops are one alternative in handling such a disease. Consequently, the aim of the present research was to contribute in determining the phytochemical composition of the plant ethyl extract from guava leaves (*Psidium guajava*), as well as the assessment of their *in vitro* biological effectiveness over six *Colletotrichum* species for handling the anthracnosein papaya fruits cv. ‘Maradol’. Whilst obtaining the extracts, wild guava leavescv. ‘Criolla’ were utilised andthe low-frequency ultrasound-assisted extraction method was used. The identification ofpolyphenolsin extractswas performed by high-performance liquid chromatography and capillary electrophoresis; and for the evaluation of their antifungal activity, it was carried out by the microdilution-diffusion in agar method, testing five concentrations of ethyl extract: 100, 150, 200, 250 and 300 ppm of extract for six *Colletotrichum* species (*C. aenigma*, *C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. gloeosporioides*, *C. Karstii* and *C. truncatum*) previously isolated and identified from papaya fruits cv. ‘Maradol’.The results showed that the guava extractmainly exhibited the majority polyphenols: florizidin, epicatechin, quercetin, catechin and ascorbic acid. In the antifungal activity, it was shown that greater the extract concentration, greater the inhibitory effect was andthe 300-ppm concentration was the optimal one to control 100% of growth of all six species assessed. In addition, there was a significant effect amongst every species assessed. According to the aforementioned, the use ofguava leave extract is an alternative harmless to both the man and the environment in controlling the anthracnose symptoms in papaya and

replacement and/or complement to chemical treatments, due to bioactive compounds present in the extract.

Keywords: Plant extract, Antifungal activity, *Colletotrichum gloeosporioides*, Secondary metabolites, Polyphenols, Flavonoids.

2.3.INTRODUCCIÓN

La antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc., es la que ocasiona mayores pérdidas en postcosecha en el cultivo de la papaya (Liu et al., 2013; Maeda y Nelson, 2014), aunque en investigaciones recientes se ha encontrado que especies del mismo género de *Colletotrichum* ocasiona daños relacionados con la antracnosis si no más especies del mismo género de *Colletotrichum* (Viera et al., 2013 y Stracieri et al., 2016). La severidad de la antracnosis ha llevado a los productores a realizar aplicaciones sin control, continuas y en altas concentraciones de fungicidas, causando contaminación ambiental, aumento de la resistencia, aumento en los costos de producción y en algunos casos el abandono total del cultivo ante el fracaso de esta práctica (Maeda y Nelson, 2014).

Algunas de las alternativas más empleadas en el control de la antracnosis son los tratamientos físicos y químicos, éstos últimos implican el uso constante de sustancias desarrolladas sintéticamente que pueden inducir la rápida resistencia en el patógeno o mayor virulencia del mismo y algunos incluso pueden causar daños a la salud humana y/o al medio ambiente, deteriorando en ocasiones la calidad del producto con manchas, olores y sabores desagradables, además el alto costo de los tratamientos químicos han obligado a los investigadores a buscar nuevos ingredientes activos biodegradables, para la implementación de medidas de manejo con menor impacto ambiental y económico (Dubey, 2016). Una de esas alternativas, es el uso de moléculas derivadas de extractos de plantas con propiedades fungicidas o fungistáticas (De Araújo et al., 2014; Farjana et al., 2014; Fernandes et al., 2014; Thirunavukkarasu-Santhoshkumar et al., 2014; Dubey, 2016; Salem et al., 2016), ya que las plantas en su evolución han desarrollado mecanismos de defensa como los metabolitos secundarios que constituyen barreras contra insectos, hongos, bacterias y otros organismos nocivos (Dubey, 2016; Salem et al., 2016; Soliman et al., 2016).

Los compuestos fenólicos son metabolitos secundarios que regulan la actividad metabólica, son esenciales para el desarrollo (crecimiento y reproducción) de las plantas, producen

soporte mecánico a las plantas, contribuyen en la coloración de las flores y frutos, protegen contra patógenos, herbívoros y frente a la radiación ultravioleta (Gil-Ramírez et al., 2016); además presentan propiedades relacionadas con la salud humana, debido a su actividad antioxidante (Jang et al., 2014; Laily et al., 2015; Díaz de Cerio et al., 2016).

Los compuestos fenólicos en especies vegetales pueden variar, dentro de un mismo individuo, en respuesta a factores genéticos, ontogénicos, bióticos y abióticos (Liu et al., 2014), presentando diferentes concentraciones en los diversos órganos de la planta. En las hojas, la regulación de la síntesis de compuestos fenólicos es una parte importante de su desarrollo. Por otro lado, el destino de los carbohidratos formados durante la fotosíntesis, parte de los cuales se emplearán en la conformación estructural de la planta (metabolismo primario) y otros en el metabolismo secundario, tienen una gran influencia en la cantidad y calidad de los compuestos fenólicos producidos (Jang et al., 2014; Laily et al., 2015; Díaz de Cerio et al., 2016).

Por otro lado, el guayabo (*Psidium guajava* L.) es un pequeño árbol originario de América central desde el sur de México hasta el norte de América del Sur, pertenece a la familia del mirto (*Myrtaceae*) y se ha distribuido a través de muchos países por su capacidad para crecer en condiciones tropicales y subtropicales (Morton, 1987). Las diferentes partes de esta planta se han utilizado tradicionalmente en la medicina popular en América, Asia del Este y otros países para el tratamiento de una serie de enfermedades tales como la diabetes mellitus, la hipertensión y la obesidad, y se han utilizado como un sedante para la tos y un anti-diarreico (Shruthi et al., 2013; Laily et al., 2015).

Extractos de hojas de guayaba contienen numerosos compuestos polifenólicos (triterpenoides, flavonoides, taninos, carotenoides y otros compuestos químicos) (Gutiérrez et al., 2008; Laily et al., 2015; Morais-Braga et al., 2016) que han demostrado diversos efectos farmacológicos incluyendo: agente hipoglucémico, antiespasmódicas, hepatoprotección, antialérgico, antígenotóxicas, antiplasmódica, citotóxico (De Araújo et al., 2014; Feng et al., 2015), antiinflamatorio (De Araújo et al., 2014), antioxidante (We Cai Lee et al., 2012; Fernandes et al., 2014; Thirunavukkarasu-Santhoshkumar et al., 2014; Feng et al., 2015; Flores et al., 2015), antimicrobiano (De Araújo et al., 2014; Farjana et al., 2014; Fernandes et al., 2014; Thirunavukkarasu-Santhoshkumar et al., 2014; Dubey, 2016; Morais-Braga et al., 2016; Soliman et al., 2016); antitumoral (Flores et al., 2013; Jang et al.,

2014; Mazumdar et al., 2015; Díaz de Cerio et al., 2016) y antidiabético (Soman et al., 2013; Liu et al., 2015; Mazumdar et al., 2015).

Por lo anteriormente descrito, el objetivo de la presente investigación fue determinar la composición fitoquímica de extracto etílico vegetal de hoja de guayaba (*Psidium guajava*), así como su evaluación antifúngica en seis especies de *Colletotrichum* aisladas del fruto de papaya Cv ‘Maradol’ para el control de la antracnosis.

2.4. MATERIALES Y MÉTODOS

2.4.1. Material vegetal

Hojas jóvenes y aparentemente sanas de *P. guajava* fueron colectadas de una propiedad privada ubicada en Pino Suárez, Zontecomatlán, Veracruz-México (20.7315985,-98.3765157,14z), mismas que se transportaron en bolsas de papel al Laboratorio de Postcosecha de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente por tres días, trituradas hasta un tamaño de partícula de 0.83 mm y almacenadas a temperatura ambiente en un frasco de vidrio cerrado herméticamente.

2.4.2. Obtención de extractos

La obtención de los extractos de hojas de guayaba se basó en el método de extracción ultrasónica desarrollado por Fernandes et al. (2014), con modificaciones. Una porción de 5g del material vegetal seco y pulverizado se colocó en un matraz de 100mL y se adicionó 25mL de la solución extractora (etanol:agua 70:30% v/v), posteriormente, se realizó la extracción ultrasónica (35 KHz) por 60 min y se procedió a filtrar por gravedad, a través de papel de filtro Whatman No. 1 lavado con 5mL de solución extractora. El extracto se aforó con etanol:agua 70:30% v/v a 25mL y se conservó en un frasco ámbar.

2.4.3. Identificación de flavonoides: HPLC-DAD

Para confirmar la presencia de flavonoides se analizaron los extractos por cromatografía de líquidos de alta resolución (HPLC). El sistema de HPLC analítico empleado consistió en un JASCO cromatógrafo de líquidos acoplada con un detector de múltiples longitudes de onda UV-vis (MD-910 JASCO). Para el análisis por HPLC se operó bajo las siguientes

condiciones: columna YMC-Pack ODSAM (250 mm × 4.6mmi.d., y las partículas de 5 micras) (YMC, Japón), la temperatura del horno 35 °C y la detección a 285 nm. El sistema disolvente consistió en ácido acético al 0.1% en agua (disolvente A) y ácido acético al 0.1% en acetonitrilo/agua (disolvente B) y el gradiente utilizado fue: 0-1 min, 12% B; 1-18 min, 22% de B; 18- 28 min, 28% B; 28-35 min, 38% B; 35-48 min, 48% de B; 48-54 min, 68% de B; 54-60 min, 100% B; 60-67 min, 12%. El caudal fue de 1mL/min, y el volumen de inyección fue de 10 µL. La identificación de cada compuesto se basó en una combinación de tiempo de retención y emparejamiento espectral (Jang et al., 2014). Las muestras se tomaron por triplicado y se consideró la desviación estándar de cada componente.

2.4.4. Identificación de flavonoides: electroforesis capilar

Para la identificación de polifenoles se utilizó un equipo de Electroforesis capilar P/ACE MDQ, Beckman Coulter Capillary Electrophoresis system (Fullerton, CA, USA) con un capilar de sílice fundida de 50µm de diámetro interno, 54.6 cm de longitud total y 44.1 cm de longitud efectiva. La detección se realizó empleando un detector con arreglo de diodos (DAD) monitoreado a una longitud de onda de 200 nm y un voltaje aplicado de 28 kV. Inicialmente se hizo un acondicionamiento del equipo con un lavado a 25 psi con agua desionizada durante 2 min, NaOH 0.1M durante 10 min, agua desionizada durante 3 min y buffer boratos 50 mM a un pH de 9.4 durante 10 min. La separación se llevó a cabo con buffer de boratos 50 mM y agua desionizada que se ocupó como disolvente, bajo las condiciones de enjuague: buffer boratos 50 mM por 5 min a 20 psi, inyección: muestra = extracto etílico por 5 s a 0.5 psi, separación: buffer boratos 50 mM por 30 min a 28 kV y finalmente un lavado como en el acondicionamiento. La identificación se llevó a cabo por la adición de estándares y la comparación de los espectros de absorción. (Khachik et a., 1986).

2.4.5. Efecto sobre el crecimiento micelial

El efecto inhibitor de los compuestos fenólicos en el crecimiento de los hongos se ensayó usando el método de microdilución-difusión en agar. Los hongos utilizados fueron seis especies de *Colletotrichum* (*C. aenigma*, *C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii* y *C. truncatum*) previamente aisladas e identificadas de frutos de papaya cv ‘Maradol’

en el programa de Fitosanidad-Fitopatología del Colegio de Posgraduados Campus Montecillo, México.

El método consistió en diluir y difundir extracto de hojas de guayaba a una concentración de 100, 150, 200, 250 y 300 ppm equivalentes a 0.1, 0.15, 0.2, 0.25 y 0.3 mg de quercitina/mL de extracto respectivamente en medio de cultivo de Papa Dextrosa Agar (PDA), una vez solidificado el medio de cultivo, al centro de la placa se colocó un biodisco de 0.4cm de hongo previamente crecido durante 8 d de edad en medio de cultivo específico. Los controles se prepararon usando un volumen igual de agua (C+) y etanol sin fenoles (C-) y el uso de azoxystrobin como testigo comercial (45 mg de producto comercial/L) (T.Q.). La incubación se llevó a cabo a 23 ± 2 °C durante 10 d. El porcentaje de inhibición el crecimiento radial de los hongos se calculó según la siguiente fórmula: porcentaje de inhibición = $(DC - DT) / DC \times 100$, donde DC fue el diámetro de hongo crecido en PDA con la adición de agua y DT fue el diámetro de las colonias tratadas con los extractos (Sagwan et al., 2012).

Un diseño experimental completamente aleatorizado se utilizó y se conformaron cinco tratamientos definidos por la concentración de extracto, un tratamiento químico (azoxystrobin), un testigo con agua y testigo con etanol, dando un total de ocho tratamientos, los ensayos se realizaron con cinco replicas por cada tratamiento. En el procesamiento de los datos se utilizaron estadísticas descriptivas, análisis de varianza (ANOVA) con pruebas de separación de medias por mínimos cuadrados, ajustadas por Tukey haciendo uso del programa estadístico SAS (Versión 20.1).

2.5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

2.5.1. Identificación de flavonoides en extracto de hoja de guayaba

La composición química de *Psidium guajava* ha sido ampliamente investigada y los estudios han informado de que los extractos de plantas están constituidos por alcaloides, triterpenos, taninos, saponinas, glucósidos, flavonoides y compuestos fenólicos y otros compuestos (Shruthi et al, 2013; Tambe et al., 2014; Morais-Braga et al., 2015; Díaz de Cerio et al., 2016).

Los compuestos identificados en el extracto de hoja de guayaba se presentan en el Cuadro 1. La cantidad de cada compuesto identificado por el método de electroforesis capilar mostró diferencia significativa, no así en el método de HPLC donde florizina fue el único compuesto

que presentó diferencia significativa con respecto a los demás compuestos detectados por este método.

Varios de los compuestos reportados en el presente trabajo han sido estudiados por otros investigadores, tal es el caso de la quercetina (Jang et al., 2014; Amaya-Cruz et al., 2015; Flores et al., 2015; Morais-Braga et al., 2015 y Díaz de Cerio et al., 2016) que en el presente trabajo resultó ser el tercer componente de mayor cantidad en el extracto etílico evaluado, además también es utilizada para la determinación de flavonoides totales (Chang et al., 2013; Fernandes et al., 2014); el ácido gálico reportado por: Chang et al., 2013; Jang et al., 2014; Flores et al., 2015 y Díaz de Cerio et al., 2016 y que también se utiliza para la determinación de fenoles totales (De Araújo et al., 2014; Fernandes et al., 2014; Liu et al., 2014; Thirunavukkarasu-Santhoshkumar et al., 2014; Laily et al., 2015; Morais-Braga et al., 2016), la catequina detectada por: Chang et al., 2013; Jang et al., 2014; Amaya-Cruz et al., 2015; Flores et al., 2015; Morais-Braga et al., 2015 y Díaz de Cerio et al., 2016, fue el cuarto componente con mayor presencia en el extracto estudiado.

Algunos polifenoles no han sido evaluados como lo son: la vainillina, galangina, florizidina y ácido ascórbico, siendo estos dos últimos de gran presencia en este trabajo, ya que se encontraron en cantidades considerables comparadas con el resto de los demás componentes evaluados (Cuadro 2.1).

Y otros han sido poco evaluados como la epicatequina que fue el segundo componente de mayor cantidad en el extracto etílico analizado y solo la han reportado Chang et al., 2013; Amaya-Cruz et al., 2015 y Flores et al., 2015; rutina por Chang et al., 2013; Jang et al., 2014 y Morais-Braga et al., 2015; ácido clorogénico y kaempferol por Amaya-Cruz et al., 2015 y Flores et al., 2015; ácido p-cumárico por Jang et al., 2014 y Amaya-Cruz et al., 2015; apigenina por Jang et al., 2014 y narangina por Díaz de Cerio et al., 2016.

Los resultados obtenidos en esta investigación contrastan numéricamente con los obtenidos por los otros investigadores, esto puede explicarse debido a que la producción de fenoles fotoquímicos se ve afectada por el estado fenológicos y genotipos de la planta, la edad de la planta, la ubicación, así como las variaciones ambientales (causadas por la época del año, la nutrición, los daños ocasionados por plagas y enfermedades), lo cual influye en la producción de metabolitos secundarios y la actividad metabólica de los polifenoles (Jang et al., 2014, Morais-Braga et al., 2015, Díaz de Cerio et al., 2016).

Cuadro 2.1. Identificación de compuestos polifenólicos en extracto etílico de hoja de guayaba (*Psidium guajava* L.) por cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC-DAD) y electroforesis capilar con detector con arreglo de diodos (EC-DAD).

Compuesto	HPLC-DAD		EC-DAD	
	Tiempo de retención (min)	Cantidad (µg/mL)	Tiempo de retención (min)	Cantidad (µg/mL)
Florizidina	6.499 (0.008)	160.846 (0.708)	---	---
Rutina	---	---	6.821 (0.054)	0.760 (0,089)
Vainillina	---	---	7.788 (0.217)	2.264 (0.216)
Ac. ascórbico	---	---	8.432 (0.189)	7.266 (0.308)
Epicatequina	---	---	8.926 (0.1259)	18.047 (0.489)
Catequina	---	---	8.901 (0.032)	10.977 (0.361)
Ac. clorogénico	---	---	10.429 (0.127)	5.215 (0.114)
Kaempferol	---	---	11.968 (0.425)	1.464 (0.034)
Naringenina	12.076 (0.015)	4.495 (0.372)	---	---
Apigenina	14.632 (0.004)	0.049 (0.003)	14.058 (0.869)	1.111 (0.094)
Quercetina	16.136 (0.020)	2.613 (0.034)	16.095 (0.044)	12.785 (0.940)
Ac p-cumárico	---	---	17.448 (0.075)	0.290 (0.090)
Ac. gálico	---	---	19.340 (0.115)	4.487 (0.039)
Galangina	22.406 (0.018)	3.048 (0.148)	---	---

(---) indica que no fue detectado con ese método.

Los valores entre paréntesis representan \pm la desviación estándar de las muestras.

Los resultados también pueden variar debido al método de extracción, ya que trabajos demuestran que puede ocurrir degradación de flavonoides con aumento de la temperatura, sin embargo, este proceso también depende de la estructura química y la interacción entre ellos (Chan et al., 2013; Jang et al., 2014; Liu et al., 2014; Morais-Braga et al., 2015).

En las plantas, la síntesis de compuestos fenólicos utiliza como sus precursores a los productos del metabolismo primario, entre otros compuestos. La biosíntesis fenólica procede de la construcción del anillo aromático a partir de precursores de carbohidratos que ya contienen el grupo hidroxilo requerido. Estos fenoles formados son considerados productos del metabolismo secundario de las especies vegetales que se producen en células especialmente diferenciadas (Bianchi y Canuel, 2011). De acuerdo con Oziyigit (2008), los compuestos fenólicos son sintetizados en las hojas y luego son transportados a otros tejidos y órganos. Por lo tanto, la cantidad total de estos compuestos en las hojas son mayores que en otros órganos y tejidos de las plantas.

Los compuestos fenólicos vegetales aumentan la rigidez de las paredes celulares de la planta actuando como puentes moleculares entre los componentes de la pared celular (Fry, 1986); son precursores de la lignina, que es un polímero fenólico principal en las plantas que se produce por acción de las peroxidasa mediante la polimerización de estos compuestos fenólicos en caso de lesiones, de estrés o para protegerse del medio ambiente (Kefeli et al., 2003; Ewané, 2012).

2.5.2. Pruebas *in vitro* de extracto de hoja de guayaba

El bioensayo realizado mostró que el extracto de hoja de guayaba tuvo un efecto significativo sobre el porcentaje de inhibición en las seis especies evaluadas (*C. aenigma*, *C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii* y *C. truncatum*) así como en la mayoría de las concentraciones estudiadas (0.1, 0.15, 0.2, 0.25, 0.3 mg/mL) con respecto al testigo de agua y etanol y el testigo comercial (Figura 2.1).

El control positivo (agua) no mostró diferencia significativa con el control negativo (etanol) en la mayoría del tiempo de crecimiento en todas las cepas analizadas y el control químico de azoxystrobin (T.Q) tuvo 75% de inhibición para la cepa de *C. karstii*, 60% en *C. aenigma*, 50% en *C. cliviae*, 45% en *C. brevisporum*, 30% en *C. gloeosporioides* y 20% en *C. truncatum*. Las cepas de *C. karstii* y *C. cliviae* tuvieron lento crecimiento con respecto a las demás cepas evaluadas y más cuando estas fueron tratadas con las diversas concentraciones.

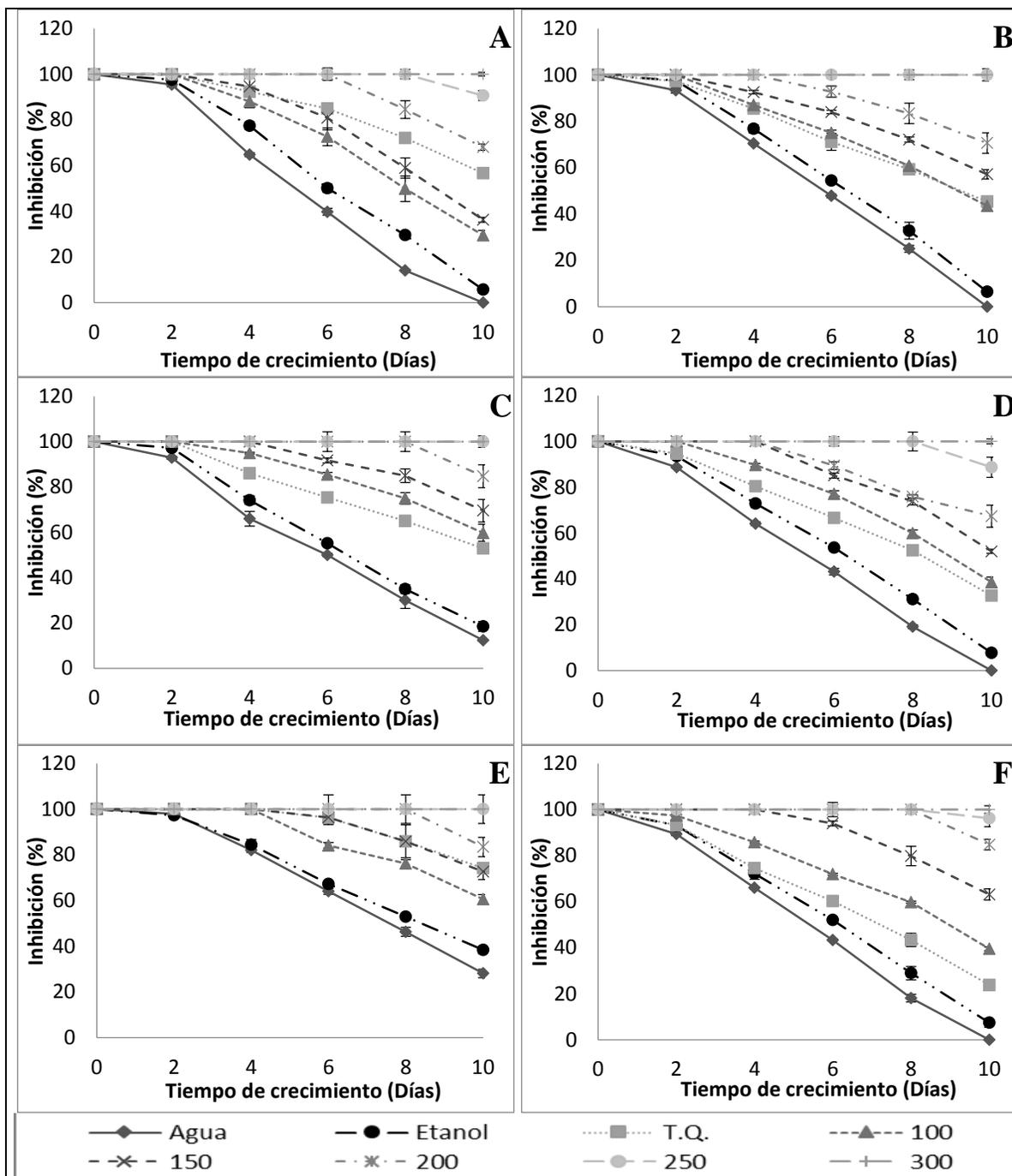


Figura 2.1. Porcentaje de inhibición de crecimiento micelial de seis especies de *Colletotrichum* con el uso de extracto etílico de hoja de *Psidium guajava*. A) *C. aenigma*, B) *C. brevisporum*, C) *C. cliviae*, D) *C. gloeosporioides*, E) *C. karstii*, F) *C. truncatum*

A los 10 días de evaluación, para la concentración de 300 ppm presentó el 100% de inhibición en todas las cepas evaluadas, 250 ppm tuvo 100% de inhibición en las cepas de *C. brevisporum*, *C. cliviae* y *C. karstii*; 95% en *C. truncatum* y 90% en *C. aenigma* y *C. brevisporum*.

gloeosporioides; 200 ppm mostró 90% en *C. truncatum*, 80% en *C. cliviaey C. karstii* y 70% en *C. aenigma*, *C. brevisporum* y *C. gloeosporioides*; 150 ppm 70% en *C. cliviaey C. karstii*, 60% en *C. brevisporumy C. truncatum*, 50% en *C. gloeosporioides* y 40% en *C. aenigma*; 100 ppm obtuvo 58% en *C. cliviaey C. karstii*, 40% en *C. brevisporum* y *C. truncatum*, 35% en *C. gloeosporioides* y 30% en *C. aenigma*.

Con los resultados obtenidos se puede pensar que el efecto que tuvo el extracto etílico sobre los hongos evaluados pudo ser atribuido a los polifenoles presentes en el mismo, como: florizidina, epicatequina, quercetina, catequina, ácido ascórbico, entre otros. Estos polifenoles se pueden dividir en tres grupos químicamente distintos: terpenos, compuestos fenólicos y compuestos que contienen nitrógeno; son producidos por las plantas como metabolitos secundarios y como un mecanismo de defensa, los cuales pueden ser constitutivos o sintetizados como respuesta al ataque de un patógeno o a una situación estresante, tal es el caso de las llamadas fitoalexinas que se producen como consecuencia de la infección. Dentro de las fitoalexinas se encuentran lactonas sesquiterpénicas, cumarinas, indoles, flavanonas, diterpenos, isoflavonoides, alcaloides, fenoles, entre otros (Taiz y Zeiger, 2012).

La actividad antimicrobiana de extractos de plantas depende del contenido y tipo de compuestos fenólicos y flavonoides (Karim et al., 2017). Los terpenos están involucrados en el rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos; o que los alcaloides se intercalan en la doble cadena del ADN y/o pueden penetrar la membrana plasmática combinándola y precipitando las proteínas protoplasmáticas y desnaturalizándolas y a que las lectinas y polipéptidos pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana, lo que conduce a la producción de cantidades elevadas de H₂O₂ (Pérez et al., 2011; De Araújo et al., 2014).

El modo de acción antimicrobiana de los taninos puede estar relacionado con su capacidad para inactivar adherencias microbianas, enzimas, células que envuelven proteínas de transporte, etc. También se combinan con polisacáridos presentes en la pared celular, generando una disrupción de la pared celular del microorganismo (Dubey, 2016).

Otros compuestos de las plantas son la quinolonas, tales como la ciprofloxacina, que son inhibidores de las topoisomerasas, estas enzimas juegan un papel importante en los mecanismos implicados en la replicación del ADN, la transcripción y la reparación. Los

mecanismos de resistencia contra estos fármacos incluyen: modificación del objetivo, activación de bombas de reflujo y reducción de la permeabilidad de la membrana celular. gentamicina y la amicacina son aminoglucósidos y, por tanto, actúan por la inhibición de la síntesis de proteínas (Morais-Braga et al., 2016).

Compuestos fenólicos actúan como segundos mensajeros en la mejora del mecanismo de defensa de la planta, activando la resistencia al aumentar la actividad de la peroxidasa (PO), la síntesis de nuevas isoformas POD, la acumulación de compuestos fenólicos, o a través de la inhibición de algunas enzimas antioxidantes y catalasas, lo que conduce a la producción de cantidades elevadas de H₂O₂ y finalmente, aumentar la resistencia por efectos directos sobre el desarrollo de la multiplicación y la supervivencia de los patógenos o efectos indirectos sobre el metabolismo de las plantas con posterior efectos sobre el suministro de alimentos para los patógenos (Shabana et al., 2017).

Estudios previos han demostrado la actividad antimicrobiana del extracto de hojas de *Psidium guajava*, principalmente se han mostrado el efecto antibacterial que este ha tenido sobre algunas bacterias tales como: *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (De Araújo et al., 2014; Fernandes et al., 2014; Farjana et al., 2014 y Soliman et al., 2016), *Streptococcus faecalis* (Dubey et al., 2016 y Soliman et al., 2016), *Klebsiella spp.* (De Araújo et al., 2014 y Farjana et al., 2014), *Enterococcus faecalis* (De Araújo et al., 2014 y Dubey, 2016), *Pseudomonas aeruginosa* (Fernandes et al., 2014 y Soliman et al., 2016) entre otras.

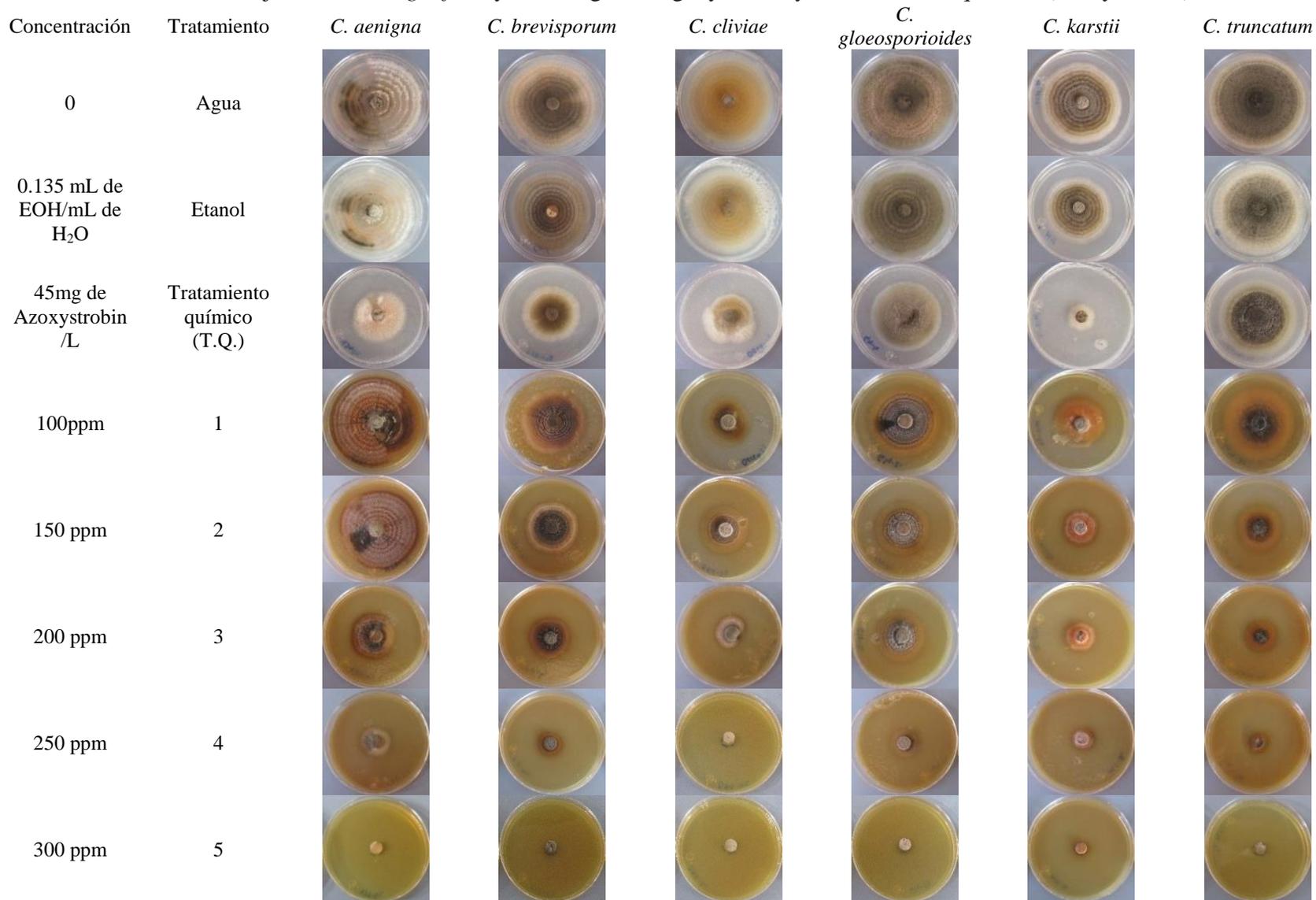
Hay muy pocos estudios sobre el efecto antifúngico del extracto de hoja de guayaba, y los que hay lo presentan en varias especies de *Candida* (Fernandes et al., 2014 y Moraes-Braga et al., 2016) que son más un problema en medicina y no en postcosecha. Sin embargo, si hay estudios en hongos fitopatógenos como el estudio de extractos de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) contra *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum* (Rodríguez-Maturino et al., 2015); extractos de dos morfotipos de *Raphanus raphanistrum* sobre *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum acutatum* y *Fusarium oxysporum* (Sánchez-León et al., 2015); extractos de tres especies de líquenes (*Leptogiumcyanescens*, *Physcia americana* y *Pyxineaff. cocoes*) para evitar *Rhizoctonia solani* y *Phytophthora nicotianae* var. *parasítica* (Vaillant-Flores et al., 2015).

El efecto inhibitorio de los extractos puede variar dependiendo del método de obtención de los extractos, los solventes con los que fueron obtenidos, el tiempo de extracción, la cantidad

de solvente utilizado (Bimakr et al., 2011; Bae et al., 2012; Engida et al., 2013), el método de bioensayo, la variedad de las plantas, las diferentes partes de la planta (Kapoor et al., 2015; Pilna et al., 2015; Ullah et al., 2016).

En el Figura 2.2, se puede observar la imágenes de las cepas evaluadas a los 10 días de estudio en las que se observa, que al adicionar el extracto etílico de hoja de guayaba al medio de cultivo este fue tomando un color más oscuro a medida que aumentaba la concentración, así mismo se puede ver que todas las cepas mostraron diferente aspecto morfológico al adicionar el extracto etílico de hoja de *Psidium guajava*, ya que presentaron diferente color y mayor esporulación como si estas estuvieran en estrés.

Figura 2.2. Crecimiento micelial de seis cepas de *Colletotrichum* a 10 d de evaluación con las diferentes concentraciones de extracto etílico de hoja de *Psidium guajava* y los testigos de aguay etanol y el tratamiento químico (azoxystrobin).



2.6. CONCLUSIÓN

El extracto de *Psidium guajava* presentó compuestos fenólicos: florizidina, quercetina, apigenina, naringenina, galangina, entre otros. Estos compuestos provocaron un 100% de inhibición de crecimiento micelial en la prueba *in vitro* en todas las cepas evaluadas (*C. aenigma*, *C. brevisporum*, *C. cliviae*, *C. gloeosporioides*, *C. karstii* y *C. truncatum*) a una concentración de 0.25 y 0.3 µg de quercitina/mL, por lo que se mostró actividad antifúngica. Hojas de guayaba son una fuente importante de compuestos bioactivos con el potencial como un agente antimicrobiano natural. Florizidina representó el 90% de los compuestos fenólicos, por lo que estos resultados podrían ser útiles para el desarrollo de fungicidas y/o como una nueva fuente de control de hongos que atacan a la papaya, la cual sea inofensiva tanto para el hombre como para el ambiente gracias a sus compuestos bioactivos.

2.7. LITERATURA CITADA

- Amaya-Cruz, D.M., Rodríguez-González, S., Pérez-Ramírez, I.F., Loarca-Piña, G., Amaya-Llano, S., Gallegos-Corona, M.A., Reynoso-Camacho, R. 2015. Juice by-products as a source of dietary fibre and antioxidants and their effect on hepatic steatosis. *Journal of Functional Foods* 17, 93-102. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2015.04.051>
- Bae, H., Jayaprakasha, G.K., Jifon, J., Patil, B.S. 2012. Extraction efficiency and validation of an HPLC method for flavonoid analysis in peppers. *Food Chemistry* 130, 751-758. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2011.07.041>
- Bianchi, T.S., Canuel, E.A. 2011. *Chemical Biomarkers in Aquatic Ecosystems*. Princeton University Press. Oxford. http://www.jlakes.org/config/hpkx/news_category/2015-06-05/ChemicalBiomarkersinAquaticEcosystems-2011.pdf
- Bimakr, M., Rahman, R.A., Taip, F.S., Ganjloo, A., Salleh, L.Md, Selamat, J., Hamid, A., Zaidul, I.S.M. 2011. Comparison of different extraction methods for the extraction of major bioactive flavonoid compounds from spearmint (*Mentha spicata* L.) leaves. *Food and Bioprocess Technology* 89, 67-72. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2010.03.002>
- Chang, C.H., Hsieh, C.L., Wang, H.E., Peng, C.C., Chyau, C.C., Peng, R.Y., 2013. Unique bioactive polyphenolic profile of guava (*Psidium guajava*) budding leaf tea is

- related to plant biochemistry of budding leaves in early dawn. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 93, 944-954. <http://dx.doi.org/10.1002/jsfa.5832>
- De Araújo, A.A., Lira-Soares, L.A., Assunção-Ferreira, M.R., DeSouza Neto, M.A., Ribeiro da Silva, G., Fernandes de Araújo, Jr. F., Bernardo Guerra, G.C., Nunes de Melo, M.C. 2014. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibiaferrea*, *Parapiptadeniarigida* and *Psidium guajava*. *Journal of Ethnopharmacology*, 156: 88-96.
 - Díaz de Cerio, E., Gómez-Caravaca, A.M., Verardo, V., Fernández-Gutiérrez, A., Segura-Carretero, A. 2016. Determination of guava (*Psidium guajava*L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. *Journal of Functional Foods* 22, 376–388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.040>
 - Díaz-de-Cerio, E., Verardo, V., Gómez-Caravaca, A. M., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero A. 2015. Determination of polar compounds in guava leaves infusions and ultrasound aqueous extract by HPLC-ESI-MS. *Journal of Chemistry* 2015, 1–9. <http://dx.doi.org/10.1155/2015/250919>
 - Dubey, S. 2016. Comparative antimicrobial efficacy of herbal alternatives (*Embllica officinalis*, *Psidium guajava*), MTAD, and 2.5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Journal of oral biology and craniofacial research*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.010>
 - Engida, A.M., Kasim, N.S., Tsigie, Y.A., Ismadji, S., Huynh, L.H., Ju, Y.-H. 2013. Extraction, identification and quantitative HPLC analysis of flavonoids from sarangsemut (*Myrmecodiapendan*). *Industrial Crops and Products* 41, 392-396. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.04.043>
 - Ewané, C.A., Lepoivre, L., de Lapeyre de Bellaire L., Lassois L. 2012. Involvement of phenolic compounds in the susceptibility of bananas to crown rot. A review. *Biotechnology, Agronomy, Society and Environment* 16(3), 393-404.
 - Farjana, A., Zerín, N., Kabir, Md.S. 2014. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(2), 920-923. [http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60758-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60758-1)
 - Feng, X-H., Wang, Z-H., Meng, D-L-. Li, X. 2015. Cytotoxic and antioxidant constituents from the leaves of *Psidium guajava*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters* 25, 2193–2198. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bmcl.2015.03.058>

- Fernandes, M.R.V, Dias, A.L.T., Carvalho, R.R., Souza, C.R.F., Oliveira, W.P. 2014. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. *Industrial Crops and Products* 60, 39-44.
- Flores, G., Dastmalchi, K., Wu, S.-B., Whalen, K., Dabo, A.J., Reynertson, K.A., 2013. Phenolic-rich extract from the Costa Rican guava (*Psidium friedrichs thalianum*) pulp with antioxidant and anti-inflammatory activity. Potential for COPD therapy. *Food Chemistry* 141(2), 889-895.
- Flores, G., Wu, S-B., Negrin, A., Kennelly, E.J., 2015. Chemical composition and antioxidant activity of seven cultivars of guava (*Psidium guajava*) fruits. *Food Chemistry* 170, 327–335. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.08.076>
- Fry, S.C. 1986. Cross-linking of matrix polymers in the growing cell walls of angiosperms. *Annual Review of Plant Physiology* 37, 165-186.
- Gil-Ramírez, A., Pavo-Caballero, C., Baeza, E., Baenas, N., Garcia-Viguera, C., Marín, F.R., Soler-Rivas, C. 2016. Mushrooms do not contain flavonoids. *Journal of Functional Foods* 25, 1-13.
- Gutiérrez, R.M., Mitchell, S., Solis, R.V. 2008. *Psidium guajava*: A review of its traditional uses, phytochemistry and pharmacology. *Journal of Ethnopharmacology* 117, 1-27.
- Jang, M., Jeong, S-W., Cho, S.K., Yang, H.J., Yoon, D-S., Kim, J-C., Park, K-H. 2014. Improvement in the anti-inflammatory activity of guava (*Psidium guajava*L.) leaf extracts through optimization of extraction conditions. *Journal of Functional Foods* 10, 161-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.06.006>
- Karim, H., Boubaker, H., Askarne, L., Cherifi, K., Lakhtar, H., Msanda, F., Boudyach, E.H., Ait Ben Aoumar, A. 2017. Use of *Cistus aqueous* extracts as botanical fungicides in the control of Citrus sour rot. *Microbial Pathogenesis* 104, 263-267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.041>
- Kapoor, A., Kaur, G., Kaur, R. 2015. Antimicrobial Activity of Different Herbal Plants Extracts: A Review. *World Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4(7), 422-459.
- Kefeli, V.I.,Kalevitch, M.V., Borsari, B. 2003. Phenolic cycle in plants and environment. *Journal of Molecular Cell Biology* 2, 13-18.
- Khadhri, A., El Mokni, R., Almeida, C., Nogueira, J.M.F., Araújo, M.E.M. 2014. Chemical composition of essential oil of *Psidium guajava* L. growing in Tunisia.

- Industrial Crops and Products, 52: 29-31. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2013.10.018>
- Laily, N., Kusumaningtyas, R.W., Sukarti, L., Kartika Rini, M.R.D. 2015. The Potency of Guava *Psidium guajava* (L.) Leaves as a functional Immuno stimulatory Ingredient. *Procedia Chemistry* 14, 301-307.
 - Liu, F., Damm, U., Cai, L., Crous, P.W. 2013. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* Complex associated with anthracnose diseases of Proteaceae. *Fungal Diversity* 61, 89–105. <http://doi10.1007/s13225-013-0249-2>.
 - Liu, C-W., Wang, Y-C., Hsieh, C-C., Lu, H-C., Chiang, W-D. 2015. Guava (*Psidium guajava* Linn.) leaf extract promotes glucose up take and glycogen accumulation by modulating the insulin signaling path way in high-glucose-induced insulin-resistant mouse FL83B cells. *Process Biochemistry* 50, 1128-1135.
 - Liu, C-W., Wang, Y-C., Lu, H-C., Chiang, W-D. 2014. Optimization of ultrasound-assisted extraction conditions for total phenols with anti-hyperglycemic activity from *Psidium guajava* leaves. *Process Biochemistry* 49, 1601-1605. <http://dx.doi.org/10.1016/j.procbio.2014.06.009>
 - Maeda, C., Nelson, S. 2014. Anthracnose of Papaya in Hawaii. *Plant Disease* 103, 1-6.
 - Mazumdar, S., Akter, R., Talukder, D. 2015. Antidiabetic and antidiarrhoeal effects on ethanolic extract of *Psidium guajava* (L.) Bat. leaves in Wister rats. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine* 5(1), 10-14.
 - Morais-Braga, M.F.B., Carneiro, J.N.P., Machado, A.J.T., Sales, D.L., dos Santos, A.T.L., Boligon, A.A., Athayde, M.L., Menezes, I.R.A., Souza, D.S.L., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M. 2015. Phenolic composition and medicinal usage of *Psidium guajava* Linn.: Antifungal activity or inhibition of virulence?. *Saudi Journal of Biological Sciences*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.09.028>
 - Morais-Braga, M.F.B., Sales, D.L., Carneiro, J.N.P., Machado, A.J.T., dos Santos, A.T.L., Audilene de Freitas, M., Morais, A.G., Martins, B., Figueiredo Leite, N.L.S. de Matos, Y.M., Tintino, S.R., Souza, D.S.L., Menezes, I.R.A., Ribeiro-Filho, J., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M. 2016. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti e *Candida* effect in association with fluconazole. *Microbial Pathogenesis* 95, 200-207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.04.013>
 - Morton, J.F. 1987. Guava. Fruits of warm climates. Creative Resource Systems, Inc. Miami, FL.

- Ozyigit, I.I. 2008. Phenolic changes during in vitro organogenesis of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) shoot tips. African Journal of Biotechnology 7, 1145-1150.
- Pérez, C. Rojas, A., Jhanna, C.S. Chamorro, A.L., Pérez, P. Katy. 2011. Evaluation of the antifúngi activity of *Melia azederachon* isolated of *Colletotrichum* spp. Revista Colombiana de Ciencia Animal 3(2), 309-320.
- Pilna, J., Vlkova, E., Krofta, K., Nesvadba, V., Rada, V., Kokoska, L. 2015. *In vitro* growth-inhibitory effect of ethanol GRAS plant and supercritical CO₂ hop extracts on planktonic cultures of oral pathogenic microorganisms. Fitoterapia 105, 260-268. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2015.07.016>
- Rodriguez-Maturino, A., Troncoso-Rojas, R., Sánchez-Estrada, A., González-Mendoza, D., Ruiz-Sanchez, E., Zamora-Bustillos, R., Cecena-Duran, C., Grimaldo-Juarez, O., Aviles-Marin, M. 2015. Efecto antifúngico de extractos fenólicos y de carotenoides de chiltepín (*Capsicum annum* var. *glabriusculum*) en *Alternaria alternata* y *Fusarium oxysporum*. Revista Argentina de Microbiología 47, 72-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ram.2014.12.005>
- Sagwan, S, Rao, D.V., Sharma, R.A. 2012. In vivo and in vitro proportional antimicrobial activity in karanj (*Pongamiapinnata*): an imperative leguminous tree. In International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences 2(6), 981-95.
- Salem, M.Z.M., Zidan, Y.E, Mansour, M.M.A., El Hadidi, N.M.N., Abo Elgat, W.A.A.2016. Antifungal activities of two essential oils used in the treatment of three commercial woods deteriorated by five common mold fungi. International Biodeterioration & Biodegradation 106, 88-96. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibiod.2015.10.010>
- Sánchez-León, G.; Vargas-Rincón, A.; Jiménez, P. 2015. Evaluación de la actividad antifúngica de extractos etanólicos de dos morfotipos de *Raphanus raphanistrum* sobre tres hongos fitopatógenos. Bioagro 27, 3-10.
- Shabana, Y.M., Abdalla, M.E., Shahin, A.A., El-Sawy, M.M., Draz, I.S., Youssif, A.W. 2017. Efficacy of plant extracts in controlling wheat leaf rust disease caused by *Puccinia triticina*. Egyptian Journal of Basic and Applied Sciences 4, 67–73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejbas.2016.09.002>
- Shruthi, S.D., Adhikari, R., Timilsina, S.S., Sajjekhan, S., 2013. A review on the medicinal plant *Psidium guajava* Linn. (*Myrtaceae*). J Journal of Drug Delivery and Therapeutics 3, 162-168. ISSN: 2250-1177. <http://jddtonline.info>

- Soliman, F.M., Fathy, M.M., Salama, M.M., Saber, F.R. 2016. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University. In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.06.003>
- Soman, S., Rajamanickam, C., Rauf, A.A., Indira, M. 2013. Beneficial effects of *Psidium guajava* leaf extract on diabetic myocardium. Experimental and Toxicologic Pathology 65, 91-95.
- Stracieri, J., Pereira, F.D., Da Silveira, A.L., Magalhães, H.M., De Goes, A. 2016. Morphocultural and molecular characterization of papaya tree *Colletotrichum* spp. African Journal of Agricultural Research 11(19), 1755-1764.
- Taiz, L., Zeiger, E. 2002. Plant Physiology, 3rd ed. Sunderland: Sinauer. Massachusetts. USA.
- Tambe, R., Singhal, R.G., Bhise, K., Kulkarni, M., 2014. Phytochemical screening and HPTLC fingerprinting of leaf extracts of *Psidium guajava* Linn. Journal of Pharmacognosy and Phytochemistry 3, 52-56.
- Thirunavukkarasu-Santhoshkumar, Rahuman, A.A., Jayaseelan, C., Rajakumar, G., Marimuthu, S., Kirthi, A.V., Velayutham, K., Thomas, J., Venkatesan, J., Kim, S-K. 2014. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Psidium guajava* extract and its antibacterial and antioxidant properties. Asian Pacific Journal of Tropical Medicine 2014, 968-976. [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60171-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60171-1)
- Ullah, N., Parveen, A., Bano, R., Zulfiqar, I., Maryam, M., Jabeen, S., Liaqat, A., Ahmad, S. 2016. *In vitro* and *in vivo* protocols of antimicrobial bioassay of medicinal herbal extracts: A review. Asian Pacific Journal of Tropical Disease 6(8), 660-667.
- Vaillant-Flores, D.I., Gómez-Peralta, M., Romeu-Carballo, C.R., Ramírez-Ochoa, R., Porrás-González, A. 2015. Actividad antifúngica de extractos de tres especies de líquenes en cuba. Mesoamerican Agronomy 26(2), 345-350. <http://dx.doi.org/10.15517/am.v26i2.19328>
- Vieira, W.A.S., Nascimento, R.J., Michereff, S.J., Hyde, K.D., Camara, M.P.S. 2013. First Report of Papaya Fruit Anthracnose Caused by *Colletotrichum brevisporum* in Brazil. Plant Dis. 97:1659-1966.
- Wei Cai Lee, Mahmud, R., Pillai, S., Perumal, S., Ismail, S. 2012. Antioxidant Activities of Essential Oil of *Psidium guajava* L. leaves. APCBEE Procedia 2, 86-91. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apcbee.2012.06.016>

3. CAPITULO III. Aplicación post-cosecha de carboximetilcelulosa con extracto de hoja de guayaba (*Psidium guajava*) sobre la calidad y el control de antracnosis en papaya (*Carica papaya* L.)

Lira-Vargas A.A.¹, Trejo-Márquez M.A.², Orozco-Santos M.³, Rojas-Martínez R.I.¹, Landero-Valenzuela N.⁴, Nieto-Ángel D.^{1*}

¹ Colegio de Posgraduados, Posgrado Fitosanidad-Fitopatología, Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo, Texcoco, 56230, Estado de México.

² Universidad Nacional Autónoma de México, Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, Centro de Asimilación Tecnológica, Jiménez Cantú s/n, San Juan Atlamica, Cuautitlán Izcalli, 54700, Edo. de México.

³ Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias C.E. Tecoman, Carretera Colima-Manzanillo, Km 35, Predio La Escondida, Tecoman, 28930, Colima.

⁴ CONACyT-Universidad Politécnica de Francisco I. Madero, Francisco I. Madero, Tepatepec, 42660, Hidalgo-México.

*Autor de correspondencia: dnieto@colpos.mx

3.1.RESUMEN

La papaya es una fruta altamente perecedera, por lo que el control de la maduración es esencial para aumentar la vida útil, así como disminuir los síntomas de la antracnosis. Una alternativa es el uso de recubrimientos comestibles biodegradables ya que tienen la capacidad de proveer estabilidad microbiológica a los alimentos, ya que sirven como acarreadores de un amplio número de compuestos, lo cuales incluyen agentes antimicrobianos de origen natural como los extractos vegetales. En este trabajo se evaluó el efecto de un recubrimiento comestible a base de carboximetilcelulosa 0.5% adicionado con extracto etanólico de hoja de guayaba (*Psidium guajava*) sobre la calidad y el control de tres especies de *Colletotrichum spp.* En frutos de papaya cv. Maradol fueron lavadas con agua y jabón, desinfectadas con hipoclorito de sodio al 2%, enjuagadas, secadas, inoculadas con 50 µL de una solución de esporas de *Colletotrichum spp* (6×10^5 esporas/mL) de cada cepa estudiada (*C. gloeosporioides*, *C. truncatum*, *C. brevisporum*) en una zona específica del fruto (5 zonas por fruto y se trabajó con cuatro frutos por tratamiento), incubados (en cámara húmeda 24 h a 25°C), cabe aclarar que la inoculación e incubación solo se realizó en frutos asignados para la prueba de severidad. Las papayas fueron sometidas a los diversos tratamientos (1: sin recubrimiento (SR), 2: con recubrimiento sin adición de extracto (CR), 3: con recubrimiento y adición de extracto (CRE)) por inmersión durante tres min, secadas y almacenadas (15°C por 12 d), evaluando cada dos días parámetros de calidad (color, sólidos solubles totales, acidez titulable, vitamina C, firmeza, pérdida de peso), respiración y efecto antifúngico contra la antracnosis (índice de severidad). Los resultados mostraron que las papayas CR tuvieron

significancia en los parámetros evaluados (color, sólidos solubles totales, acidez titulable, vitamina C, pérdida de peso, firmeza y respiración) con respecto a los no recubiertos (SR), en el índice de severidad también se mostró diferencia significativa, pero fue aún mayor en recubrimientos con la adición de extracto (CRE). Se concluye que el recubrimiento de carboximetilcelulosa resultó ser una buena alternativa para la preservación de la papaya durante los 12 d de almacenamiento, y que si a este recubrimiento se le adiciona el extracto etanólico de hoja de guayaba los síntomas de antracnosis se ven significativamente retardados mejorando la calidad del fruto.

Palabras clave: Recubrimiento biodegradable, Extracto vegetal, Actividad antifúngica, *Colletotrichum gloeosporioides*.

3.2.ABSTRACT

Papaya is a highly perishable fruit, so control of maturation is essential to increase shelf life as well as decrease the symptoms of anthracnose. An alternative is the use of biodegradable edible coatings since they have the ability to provide microbiological stability to foods, as they serve as carriers of a large number of compounds, which include antimicrobial agents of natural origin such as plant extracts. In this work the effect of an edible coating based on carboxymethylcellulose 0.5% added with guanaba leaf extract (*Psidium guajava*) on the quality and control of three species of *Colletotrichum* spp. in papaya. Papayas cv. Maradol were washed with soap and water, disinfested with 2% sodium hypochlorite, rinsed, dried, inoculated with 50 µL of a *Colletotrichum* spp spore solution (6 x 10⁵ spores / ml) of each strain studied (*C. C. truncatum*, *C. brevisporum*) in a specific area of the fruit (5 areas per fruit and worked with four fruits per treatment), incubated (in a humid chamber 24 ha 25 ° C), it should be clarified that inoculation and incubation was only performed on fruits assigned for the severity test. Papayas were subjected to the various treatments (1: uncoated (SR), 2: coated without addition of extract (CR), 3: coated and added extract (CRE)) by immersion for 3 min, dried and stored (Color, total soluble solids, titratable acidity, vitamin C, firmness, weight loss), respiration and antifungal effect against anthracnose (severity index). The results showed that CR papaya had a significant effect on the evaluated parameters (color, total soluble solids, titratable acidity, vitamin C, weight loss, firmness and respiration) with respect to uncoated (SR), severity index showed significant difference, but was even higher in coatings with the addition of extract (CRE). It is concluded that the coating of

carboxymethylcellulose proved to be a good alternative for the preservation of papaya during the 12 days of storage, and that if this coating is added guanaba leaf ethanolic extract the symptoms of anthracnose are significantly delayed improving the quality of the fruit.

Key words: Biodegradable coating, Vegetable extract, Antifungal activity, *Colletotrichum gloeosporioides*.

3.3.INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es una planta perteneciente a la familia *Caricaceae*, cultivada en la actualidad en diferentes regiones tropicales y subtropicales del mundo. Es un importante cultivo para el consumo en forma fresca o procesada y para uso en la industria farmacéutica, de cuero y textil. La fruta es una buena fuente de vitaminas y minerales, mientras que siendo baja en sodio, grasas y calorías (Annegowda y Bhat, 2016; Hewajulige, 2016). La producción mundial de papaya está altamente concentrada en diez países principalmente, como lo es la India que es el principal productor de papaya, seguido por Brasil, Indonesia, Nigeria, México, Etiopía, Congo, Colombia, Tailandia y Guatemala. Los principales países exportadores de papaya en el mundo son México, Brasil, Malasia, India y Estados Unidos (principalmente a través de reexportaciones) (FAOSTAT, 2016). Las principales variedades de papaya que dominan el comercio mundial son Solo, Sunrise, Maradol, Red Lady, Linda y Tainung (Hewajulige, 2016). La producción de papaya en México principalmente se da en los estados de Oaxaca, Veracruz, Chiapas, Colima, Tabasco, Yucatan y Campeche y sus principales variedades cultivadas son la Maradol y Red Lady (SIAP-SAGARPA, 2016).

Diversos factores contribuyen a las pérdidas postcosecha de la papaya, pudiendo ser factores biológicos, mecánicos, microbiológicos y fisiológicos. Los frutos de papaya son muy susceptibles a la invasión por ciertos hongos patógenos y bacterias debido a la alta humedad y nutrientes. El desarrollo de infecciones fúngicas durante la fase postcosecha puede depender de la edad fisiológica de la fruta, las lesiones mecánicas y las condiciones de almacenamiento. (Maqbool et al., 2011; Hewajulige, 2016). La antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. es una de las principales causas de la pérdida de papaya después de la cosecha, particularmente cuando se intenta prolongar la vida de almacenamiento. Se sabe que los síntomas de antracnosis es una infección latente, el hongo infecta los frutos inmaduros en el campo mientras que los síntomas aparecen una vez que se ha iniciado la

maduración. La incidencia de la enfermedad limita la vida útil del producto en los mercados locales y de exportación durante el proceso de maduración, almacenamiento y transporte (Maqbool et al., 2011; Hamzad et al., 2013; Maeda y Nelson, 2014; Hewajulige, 2016).

Por otro lado, la maduración de la papaya es muy rápida; sin embargo, en esta es donde el fruto alcanza su color deseable, sabor, calidad, naturaleza sabrosa y otras características texturales; pero conduce al fruto al envejecimiento fisiológico, cambios bioquímicos y deterioro microbiano (Annegowda y Bhat, 2016; Hewajulige, 2016).

Hay varios procedimientos para prolongar la vida útil de las frutas tropicales: refrigeración, métodos químicos (Madani et al., 2014; Ayón-Reyna et al., 2017), tratamientos con agua caliente (Kechinski et al., 2012; Ayón-Reyna et al., 2017), uso de agentes bio-control (Lima et al., 2013; Landero-Valenzuela et al., 2015), uso de irradiación (Rashid et al., 2015), uso de ozono (Ong et al., 2014; Ong y Ali, 2015); atmosferas modificadas y controladas dentro de ellas se encuentra el uso de recubrimientos polimericos-comestibles-biodegradables (Ali et al., 2011; Bautista-Baños et al., 2013), entre otros. Los tratamientos de agua caliente en combinación con fungicidas sintéticos generalmente se usan para reducir la incidencia de enfermedades postcosecha en diversas frutas y hortalizas. Sin embargo, los tratamientos térmicos afectan la calidad nutricional y las propiedades sensoriales, mientras que el uso continuo de fungicidas sintéticos puede conducir al desarrollo de cepas resistentes a fungicidas del patógeno. Además, los residuos de fungicidas presentes en la superficie frutal pueden suponer graves amenazas para los consumidores y el medio ambiente. Esto ha impulsado el desarrollo de enfoques no peligrosos para controlar la antracnosis postcosecha en las frutas tropicales importantes la papaya (Bosquez-Molina et al. 2010; Maqbool et al., 2011; Hamzah et al., 2013).

Uno de los métodos con potencial para conservar la vida postcosecha de frutas y hortalizas destinadas al consumo en fresco lo constituye el uso de envases activos, los cuales interactúan de una forma activa pudiendo incorporar sustancias al contenido del envase o absorbiendo componentes desde el contenido con el objeto de mejorar su calidad y aceptabilidad. Dentro de los envases activos se encuentran los recubrimientos comestibles que pueden servir como vehículos para un amplio rango de aditivos con la finalidad de proporcionar mayores atributos como es el control de microorganismos (Tavassoli-Kafran et al., 2016).

Los recubrimientos comestibles se utilizan principalmente para mejorar la apariencia de los alimentos se ha encontrado aplicación en productos alimenticios frescos y procesados, frutas y verduras, quesos, carne, salchichas y productos de panadería, ya que pueden proporcionar barreras selectivas contra la respiración, la pérdida de humedad y la descomposición (Maqbool et al., 2011; Kurek et al., 2017; Alsaggaf et al., 2017). Además, los recubrimientos también proporcionan más ventajas que los materiales sintéticos en términos de comestibilidad, biocompatibilidad, no tóxicos y de bajo costo (Bonilla et al., 2012; Azeredo y Waldron et al., 2016). Actualmente, la investigación ha llevado al desarrollo de nuevos enfoques respetuosos con el medio ambiente basados en polímeros biodegradables, que no sólo convierten los subproductos de las industrias alimentarias en componentes formadores de película de valor agregado. Sino también reducir los requisitos de envasado (Maqbool et al., 2011; Bonilla et al., 2012; Galus y Kadzińska, 2015; Azeredo y Waldron et al., 2016; Kurek et al., 2017).

El desarrollo de recubrimientos comestibles debe cumplir varios requisitos deben: ser resistentes al agua y estables durante el almacenamiento en frío; no causar agotamiento de O₂ o acumulación excesiva de acumulación de CO₂; ser mínimamente permeable al vapor de agua; poseer buenas propiedades mecánicas; tener estabilidad bioquímica, fisicoquímica y microbiana; mejorar el brillo y la apariencia del producto; no debe ser pegajoso y tener buen funcionamiento de sequía; mantener la calidad de los productos sin revelar olores no deseados; seguridad, naturaleza no contaminante; tecnología simple; tener baja viscosidad; ser translúcidos y ser económico (Varela y Firtman, 2011; Vieira et al., 2011; Arnon et al., 2014 y 2015; Salgado et al., 2015).

Diversos tipos de polímeros más comúnmente utilizados, ya sea en forma de polímeros únicos o compuestos, para la preparación de películas comestibles son lípidos, proteínas y polisacáridos. Ejemplos de polímeros lipídicos son goma laca, ceras y ésteres de ácidos grasos y ejemplos de proteínas son gelatina, caseína, proteína de soja y zeína. El almidón, la pectina, la celulosa, el alginato y el carragenano son ejemplos de polisacáridos (Cazon et al., 2017; Kurek et al., 2017; Nawab et al., 2017)

Sin embargo, carboximetilcelulosa (CMC) es una de las principales composiciones de material de embalaje (película de hidrogel), se encuentra en la lista de biopolímeros naturales (quitina, quitosano, celulosa, almidón, etc.) es la más abundante y renovable biopolímero en el mundo (Roy et al., 2012), además de que se ha utilizado en varios estudios aplicados en la calidad de Bambú, en frutos cítricos, en guayaba mínimamente

procesada, entre otros productos (Badwaik et al., 2013; Arnon et al., 2014; Forato et al., 2015; Choulitoudi et al., 2016, 2017; Lutfi et al., 2017; Shin et al., 2017).

La incorporación de probióticos en películas comestibles y revestimientos se ha propuesto como una tecnología emergente que ha generado una serie de estudios en la última década. Las películas probióticas y los recubrimientos se considerarán como materiales bioactivos, en el sentido de que pueden promover beneficios para la salud para el consumidor, debido a sus posibles propiedades probióticas. De forma concomitante, las películas y revestimientos probióticos también pueden considerarse activos, en el sentido de que pueden promover un papel activo en la extensión de la estabilidad alimentaria, que se basa en la premisa de que compuestos bioactivos presentan efectos competitivos contra microorganismos deteriorantes (Zeng et al., 2013; Chen et al., 2016; Espitia et al., 2016; Özvural et al., 2016).

Los recubrimientos con la adición de extractos últimamente han tenido gran estudio: CMC con extracto de *Impatiens balsamica* en naranja (Zeng et al., 2013), pululano con extracto de albahaca en manzana (Synowiec et al., 2014), pululano con extracto de *Bergenia crassifolia* en pimienta (Krasniewska et al., 2015), alginato con extracto de *Ficus hirta* en mandarina (Chen et al., 2016), quitosan con extracto de olivo en manzana (Khalifa et al., 2017), goma arábiga con extracto de *Tulsi* en guayaba (Murmu y Mishra, 2017), CMC con extracto de moringa en aguacate (Tsfay y Magwaza, 2017).

El extracto de hojas de guayaba contiene numerosos compuestos polifenólicos (triterpenoides, flavonoides, taninos, carotenoides y otros compuestos químicos) (Laily et al., 2015; Morais-Braga et al., 2016) que han demostrado diversos efectos, uno de ellos es su actividad antimicrobiana (Farjana et al., 2014; Dubey, 2016; Morais-Braga et al., 2016; Soliman et al., 2016) por lo que su adición a un recubrimiento podría resultar positivo para su aplicación.

Por lo que el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de un recubrimiento comestible a base de carboximetilcelulosa adicionado con extracto etanólico de hoja de guayaba (*Psidium guajava*) sobre la calidad y el control de tres especies de *Colletotrichum spp.* en papaya cv Maradol.

3.4.MATERIALES Y MÉTODOS

3.4.1. Obtención de extractos

Hojas jóvenes aparentemente sanas de *P. guajava* fueron colectadas de una propiedad privada ubicada en Pino Suárez, Zontecomatlán, Veracruz-México (20.7315985,-

98.3765157,14z), mismas que se transportaron en bolsas de papel al Laboratorio de Postcosecha de la Universidad Nacional Autónoma de México. Las hojas fueron secadas a temperatura ambiente por tres días, trituradas hasta un tamaño de partícula de 0.83 mm y almacenadas a temperatura ambiente en un frasco de vidrio cerrado herméticamente. La obtención de los extractos de hojas de guayaba se basó en el método de extracción ultrasónica desarrollado por Fernandes et al. (2014), con modificaciones. Una porción de 5g del material vegetal seco y pulverizado se colocó en un matraz de 100mL y se adicionó 25mL de la solución extractora (etanol:agua 70:30% v/v), posteriormente, se realizó la extracción ultrasónica (35 KHz) por 60 min y se procedió a filtrar por gravedad, a través de papel de filtro Whatman No. 1 que se lavó con 5mL de solución extractora. El extracto se aforó con la solución extractora a 25mL y se conservó en un frasco ámbar, cabe aclarar que el extracto se realizaba cada vez que se iba a utilizar.

3.4.2. Elaboración de recubrimiento

El recubrimiento se realizó mediante una mezcla del polisacárido (CMC 0.5%), plastificante (glicerol 1%), emulsificante (Tween 80 0.5%) y extracto etanólico de hoja de guayaba (300 ppm). La dispersión se realizó con un homogeneizador (Wiggen Hauser D-500), velocidad 3 durante 5 min.

3.4.3. Aplicación de recubrimientos

Las frutas de papayas cv. Maradol en estado de maduración $\frac{1}{4}$ verde procedentes de Oaxaca y fueron llevadas al centro de Asimilación Tecnológica de la Facultad de Estudios Superiores Cuautitlán, donde se lavaron y desinfectaron (con cloro a 200 ppm), enjuagaron (con agua esteril), secaron (con toallas esteriles). De aquí se dividieron en dos lotes: 1) frutos no inoculados (control) y 2) frutos inoculados con 50 μ L de una solución de esporas de $60 \pm 10 \times 10^4$ esporas/mL para los hongos evaluados (*Colletotrichum brevisporum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Colletotrichum truncatum*) en una zona específica del fruto (cinco zonas por fruto y se trabajó con cuatro frutos por tratamiento), se incubaron (24h a 25°C en cámara húmeda), después todos los frutos de los dos lotes fueron recubiertos (por inmersión por 3min) y finalmente se secaron (con aire por 30min), se almacenaron a 13°C por 10 d. A los frutos no inoculados se les evaluó parámetros de calidad (color, sólidos solubles totales, acidez, vitamina C, firmeza, pérdida de peso) y parámetro fisiológico (respiración), a los inoculados se les evaluó el efecto antifúngico

contra la Antracnosis (índice de severidad), parámetros químicos (fenoles) y actividad enzimática (Poligalacturonasa).

3.4.4. Parámetros de calidad

La determinación del color se llevó a cabo con un colorímetro (CM-600d, Konica Minolta) mediante el sistema Hunter Lab, reportando valores de luminosidad (L) (McGuire, 1992). Los sólidos solubles totales se midieron con un refractómetro digital (Atago, 211), los resultados se expresaron en °Brix. La acidez por titulación, expresando los resultados en porcentaje. La vitamina C se cuantificó con un método volumétrico, con la titulación de ácido ascórbico presente en la muestra con 2-6 dicloindofenol, el resultado se expresó en mg de ácido ascórbico/100 g de muestra. La firmeza se determinó con un penetrómetro manual (Tr, FT327) expresando los resultados en Newtons (N) (AOAC, 1999). La pérdida peso se midió por método gravimétrico, expresando los resultados como porcentaje de pérdida de peso (%).

3.4.5. Respiración

La respiración fue determinada tomando en cuenta la producción de CO₂ generado por los frutos de papayas utilizando un sistema cerrado (los frutos fueron colocados dentro de recipientes sellados durante una hora), posteriormente se midió la acumulación de CO₂ acumulada con el analizador de gases (Analyzer Nitec). El resultado se expresó en mg CO₂/kg peso fresco (Kader, 2002).

3.4.6. Efecto antifúngico

La gravedad de la enfermedad se midió como porcentaje de la superficie del fruto con síntomas de antracnosis. Para la incidencia y severidad de la enfermedad, se utilizaron cinco repeticiones con seis frutos por replicación. Cada repetición consistió en un círculo marcado en el fruto, y se trabajaron con seis frutos. Los datos de incidencia de la enfermedad se presentaron como el porcentaje de fruta que mostró antracnosis del número total de frutos en cada tratamiento, el inicio de esta prueba se consideró a partir de que comenzaban los signos característicos de los síntomas de antracnosis (Maqbool et al., 2011; Bill et al., 2014), mientras que la severidad de los síntomas de la enfermedad (porcentaje de severidad) se utilizó una escala de seis puntos (0-no dañado, 1: 1>20%, 2: 20>40%, 3: 40>60%, 4: 60>80, 5: 80>100, 6: 100%, cada círculo representaba una réplica

y cada uno de ellos se multiplica por el daño observado (Zavala-León y Jairo-Cristóbal, 2012).

3.4.7. Contenido de fenoles

El contenido de fenoles se determinó con un método colorimétrico (Folin y Ciocalteu, 1927). Sólo se determinó en la piel del fruto de papaya no infectada e infectada con las tres especies de *Colletotrichum* evaluadas (*C. brevisporum*, *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*). Se realizó una curva patrón previo con ácido gálico, agua destilada, folin-ciocalteu y Na_2CO_3 y la lectura se llevó a cabo en un espectrofotómetro (Thermo Spectronic Genesys 10 uv) con una absorbancia de 765 nm. Para leer el extracto se agregaron en un tubo de ensayo todos los reactivos antes mencionados, con excepción del ácido gálico que fue sustituido por el extracto obtenido previamente. Los resultados se expresaron en mg ácido gálico/ mL de extracto.

3.4.8. Actividad enzimática de poligalacturonasa

La actividad enzimática de poligalacturonasa fue determinada por cuantificación espectrofotométrica de los azúcares reductores generados tras la acción de la enzima sobre el ácido poligalacturónico por el método de Nelson (1944) modificado por Somogyi (1952). Al igual que el contenido de fenoles, ésta fue cuantificada en piel de papaya no infectada e infectada con las tres especies de *Colletotrichum* evaluadas (*C. brevisporum*, *C. gloeosporioides*, y *C. truncatum*). Como punto de partida para la medida de actividad se tomaron unas condiciones generales de acuerdo a lo encontrado en la literatura (Srivastava y Dwivedi, 2000). La técnica fue la siguiente: la mezcla de reacción contenía 125 μL de ácido poligalacturónico al 1.25% (v/v), preparado en buffer acetatos 200 mM pH 4.5, 95 μL de agua destilada y 30 μL de extracto enzimático, para un volumen final de 250 μL . Los componentes de la mezcla fueron previamente incubados y la mezcla de reacción se incubó a 37 °C por 5h. Al cabo de este tiempo se detuvo la reacción por calentamiento en un baño de agua a ebullición. Se realizaron blancos de enzima, sustrato y buffer sometidos a las mismas condiciones de la mezcla de reacción. La formación de azúcares reductores fue calculada usando D-glucosa como patrón de cuantificación, una unidad (U) de la enzima cataliza la liberación de una nmol de ácido galacturónico en 1 s en las condiciones de ensayo. La actividad específica fue expresada como U por mg de proteína.

3.4.9. Análisis estadístico

Los tratamientos se organizaron en un diseño completamente al azar. Los resultados se sometieron a un análisis de varianza (ANOVA) y una comparación de medias con la prueba de rango múltiple Tukey con un nivel de significancia de 0.05% por medio del programa estadístico SAS versión 20,0.

3.5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

3.5.1. Parámetros de calidad

Los parámetros de calidad: luminosidad, sólidos solubles totales y vitamina C, tuvieron una tendencia a aumentar con respecto al tiempo de almacenamiento y hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en cada uno de ellos. El aumento que tuvieron los frutos recubiertos (CR) del día inicial al día doce fue de 16.1, 15.8 y 32.5%, respectivamente y los no recubiertos (SR) fue de 14.8, 28.4 y 14.3%, respectivamente; además de que los valores fueron mayores en las papayas CR que en las SR (Figura 3.1).

Con estos resultados se pudo observar que los frutos recubiertos tuvieron un retado en su maduración, tal y como se obtuvo en el trabajo de Ali et al., (2011) y Chen et al., (2016). El efecto que el recubrimiento tiene sobre los frutos se puede deber principalmente a las propiedades de barrera que este presenta (permeabilidad al O₂ y al agua), ya que al mantener el oxígeno lejos del fruto, genera una atmósfera modificada, que ralentizaron la maduración, pero no cesa por completo y no perjudica la capacidad del fruto para madurar. Aunque hay autores como Zeng et al., (2013) y Arnon et al., (2014) que mencionan que el uso de recubrimientos no provoca efectos deletéreos sobre la calidad de las frutas evaluadas.

Los cambios mostrados en los resultados se pudieron deber al efecto de la maduración que el fruto está presentando (Rashid et al., 2015). En el caso de la luminosidad los resultados indicaron que la cáscara de la papaya se fue aclarando, ya que el valor de L* fue aumentando. Los valores de luminosidad obtenidos fueron similares a los determinados por Ali et al., (2011) y Hamzah et al., (2013). El cambio de color en la fruta fresca es un indicador de calidad, así mismo indica la maduración y la posible vida útil del fruto. El proceso de maduración de la papaya involucra degradación de clorofila y síntesis de pigmentos carotenoides. La degradación de la clorofila puede deberse a tres factores posibles ya sea individualmente o en secuencia (Wills et al. 2007). Estos factores

son cambios de pH (debido a fugas de ácido orgánico de las vacuolas), sistemas oxidativos y clorofilasas. Todos estos posibles mecanismos de acción se aceleran a medida que avanza el proceso de respiración y maduración (Ali et al., 2011; Hamzahd et al., 2013).

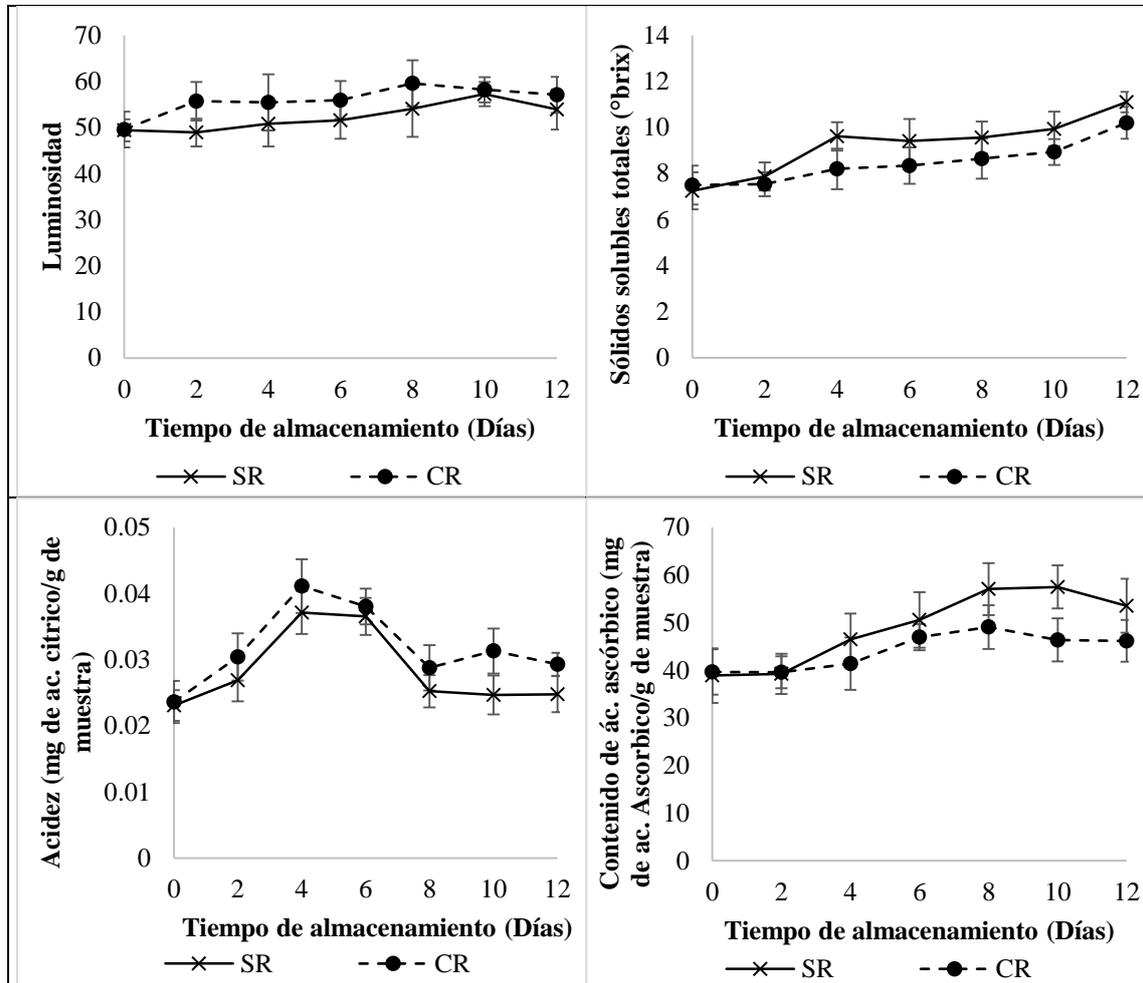


Figura 3.1. Cambios en la luminosidad (A), sólidos solubles totales (B), acidez (C) y contenido de ácido ascórbico (D) en frutos de papaya cv. Maradol sin recubrimiento (SR) y con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) durante su almacenamiento a 15°C y 85% de HR.

El aumento de la acidez se explica por la formación de ácido galacturónico en el proceso de degradación de la pared celular durante la maduración. En el climaterio ocurren reacciones relacionadas con la maduración y la senescencia y en estas a su vez, la liberación de ácidos orgánicos que pueden aumentar la acidez. Por otra parte, la disminución de la acidez de la fruta se debe probablemente a la reducción de la actividad metabólica durante el climaterio hay consumo de ácidos orgánicos, ya que la fruta no tiene reservas de almidón (Wills et al. 2007).

3.5.1.1. Firmeza

La firmeza fue un parámetro fisiológico afectado positivamente con la aplicación de recubrimiento de CMC 0.5 %, ya que mostró tener 34% menos pérdida de firmeza en comparación con los SR a los doce días de evaluación, mostrándose así diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la firmeza de los frutos evaluados; sin embargo, esta tendió a disminuir con respecto al tiempo de almacenamiento (Figura 3.2).

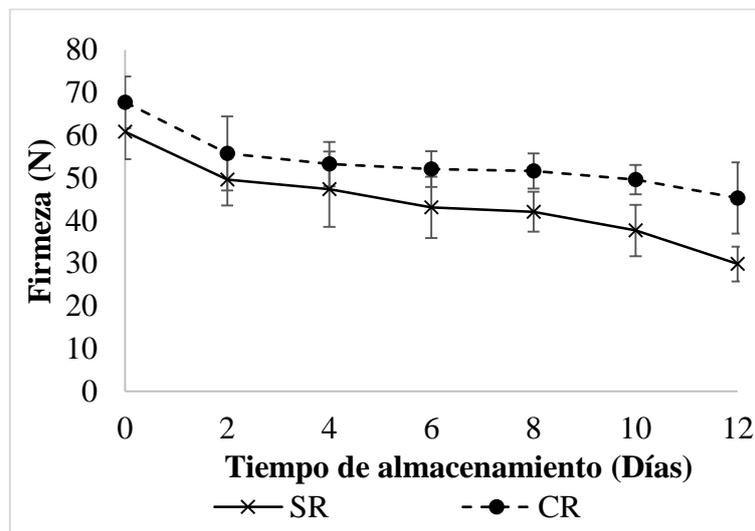


Figura 3.2. Evolución de firmeza de papaya cv Maradol sin recubrimiento (SR) y con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) su almacenamiento a 15°C y 85% de HR. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 6 frutos.

El cambio en la firmeza es uno de los principales indicadores para juzgar la calidad de la fruta y está estrechamente afectado por la maduración. La reducción de la textura de la fruta puede ocurrir a través de dos posibles mecanismos de acción. El primer mecanismo se debe a la descomposición de los carbohidratos poliméricos que ocurre durante la maduración y que provocan el debilitamiento de las paredes celulares, pérdida de integridad de la membrana, hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, así como despolimerización de pectina y almidón, que se catalizan por la acción de varias enzimas, incluyendo la poligalacturonasa, la pectina metilsesterasa, la pectato liasa, la Rhamnogalacturonasa, la b-galactosidasa y la celulasa, que disminuye la cohesión celular por desorden celular y degradación de la pectina (Wills et al., 2007). El segundo mecanismo que contribuye a la pérdida de firmeza del fruto está relacionado con la pérdida de agua por la transmisión del vapor de agua que causa pérdida en la turgencia celular (García y Barret, 2002). A pesar de que el recubrimiento proporciona sólo una baja protección contra la transmisión de agua, puede proporcionar protección temporal contra la pérdida de humedad absorbiendo agua y actuando, así como un agente de

sacrificio en vez de una barrera (Hamzah et al., 2013; Fagundes et al., 2015; Galus y Kadzińska, 2015; Tesfay y Magwaza., 2017).

Es probable que la composición gaseosa de O₂ más baja y un mayor porcentaje de CO₂ en los frutos recubiertos limiten las actividades de las enzimas oxidantes, lo que permite retener la firmeza durante el almacenamiento posterior a la cosecha (Teskay y Magwaza, 2017).

Con los resultados sugieren que la aplicación de recubrimiento retrasó la maduración del fruto de papaya, resultando en fruta más firme y concordando con los resultados de Ali et al. (2011); Bautista-Baños et al., (2003) y Hamzah et al. (2013), donde papayas recubiertas tuvieron una retención en la firmeza con respecto a las no tratadas. El efecto de los recubrimientos sobre la firmeza de la fruta no es exclusivo de la papaya y se ha informado previamente en otras frutas, donde la fruta recubierta redujo las actividades de las enzimas macerantes como la poligalacturonasa, pectinasa y celulasa, manteniendo la firmeza de los frutos analizados (Arnon et al., 2015; Tesfay y Magwaza., 2017; Khalifa et al., 2017).

La pérdida de firmeza durante la comercialización afecta negativamente a la calidad de la fruta, por lo que la aplicación de recubrimientos provoca la retención de la firmeza y por consecuencia se reduce la velocidad de reblandecimiento, lo que se convierte en un tratamiento ventajoso para prolongar la vida útil y reducir las pérdidas postcosecha (Teskay y Magwaza, 2017).

3.5.1.2. Pérdida de peso

La pérdida de humedad del fruto resulta del déficit de presión de vapor entre la atmósfera menos saturada y el fruto, que está cerca de la saturación con agua (Teskay y Magwaza., 2017).

Encontrándose en el presente trabajo una pérdida de peso del 16 y 18% para frutos CR y SR, respectivamente, teniendo que a los doce días de evaluación los frutos CR mostraron 12% menos pérdida de peso con respecto a los SR, por lo que hubo diferencia significativa ($P \leq 0.05$) en la pérdida de peso de los frutos evaluados (Figura 3.3).

Los resultados observados en el presente estudio también están de acuerdo con Zeng et al. (2013); Arnon et al. (2015) y Tesfay y Magwaza, (2017) demostraron que la CMC retarda la pérdida de humedad en las frutas que ellos estudiaron. Otros recubrimientos

con la adición de extracto también han mostrado retener la pérdida de peso (Krasniewska et al., 2015; Chen et al., 2016; Khalifa et al., 2017; Murmu y Mishra, 2017).

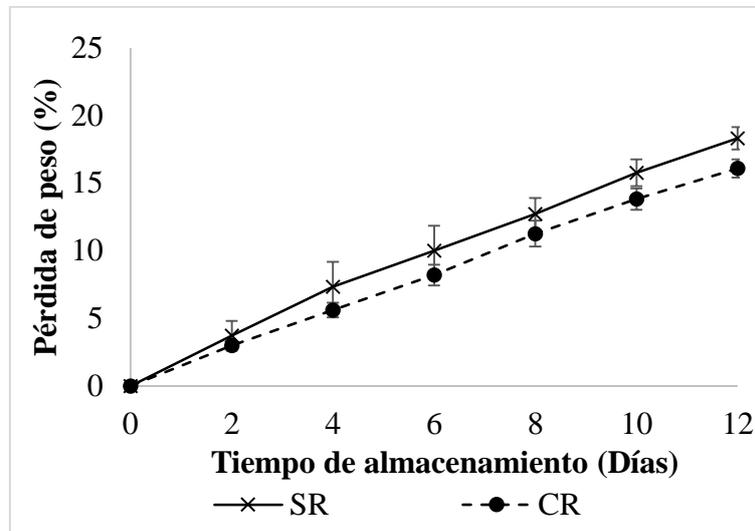


Figura 3.3. Evolución de pérdida de peso de frutos de papaya cv. Maradol sin recubrimiento (SR) y con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) durante su almacenamiento a 15°C y 85% de HR. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de seis frutos.

La transpiración es un factor crucial para preservar la fruta, una gran pérdida de peso en relación al peso inicial deprecia el valor de la apariencia de los frutos, debido a que presentan una superficie arrugada. La papaya se comercializa por unidad de peso, y la pérdida del mismo resulta en menor rendimiento. La pérdida de peso por encima del 5 % es suficiente para el deterioro de las papayas y con frecuencia esta pérdida es negligencia de la cadena de comercialización.

Sin embargo, la pérdida de peso, puede deberse a la aplicación del mismo recubrimiento, ya que depende de los ingredientes con los que es elaborado para presentar características adecuadas, de no ser así, se pueden tener resultados contraproducentes, tal es el caso de tomates cherry recubiertos con propionato de sodio y carbonato de potasio en los que hubo un aumento de la pérdida de peso en comparación con las muestras no recubiertas (Fagundes et al., 2015).

El efecto que pueden tener los recubrimientos se puede deber a la barrera de humedad intrínseca que este tiene, pero también a sus propiedades mecánicas que podrían afectarse durante el almacenamiento prolongado de la fruta. El rendimiento del recubrimiento se ve afectado por la distribución que este tiene sobre la superficie del fruto, especialmente si forma una capa continua o penetra en los poros, por la morfología de la piel del fruto

(presencia de pelos, espesor y tipo de cutícula, número de estomas, lenticelas e incluso grietas en las lenticelas), por las propiedades físicas del recubrimiento tales como tensión superficial y viscosidad (Fagundes et al., 2015; Ali et al., 2011).

3.5.2. Respiración

La tasa de respiración es un indicador importante de la actividad metabólica y proporciona una indicación inicial de la posible vida útil de los productos hortícolas (Chen et al., 2016) y los frutos climatéricos como la papaya se caracterizan por un aumento en la respiración durante la maduración (Ong et al., 2014).

En el presente estudio, encontramos que el recubrimiento de CMC aumentó significativamente los niveles de CO₂ en la atmósfera interna de las papayas, también se mostró un retardo del punto climatérico dos días después en las papayas CR con respecto a las SR (Figura 3.4), lo que indicó un aumento en la actividad metabólica del fruto.

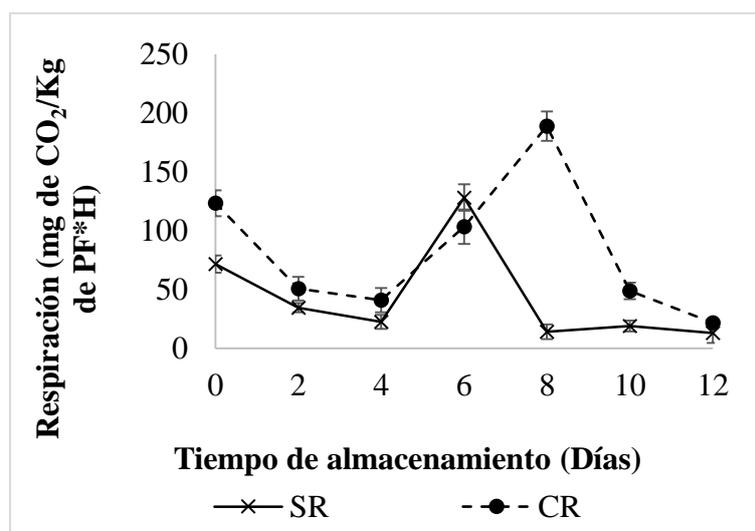


Figura 3.4. Evolución de la respiración de frutos de papaya cv. Maradol, sin recubrimiento (SR) y con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) durante su almacenamiento a 15°C y 85% de HR. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de seis frutos.

Los resultados observados en este documento son similares a los reportados en otros estudios, donde se ha demostrado que la respiración aumenta con la aplicación de recubrimientos (Arnon et al., 2014; Murmu y Mishra, 2017). Sin embargo, hay autores (Chen et al., 2016; Tesfay y Magwaza, 2017) que muestran lo contrario, mencionando que la respiración disminuye con el uso de recubrimientos.

Debido a la discrepancia entre resultados, uno de los principales problemas en el desarrollo de recubrimientos comestibles es su efecto negativo en la permeación de los gases y la consecuente modificación de la atmósfera interna del fruto, lo que resulta en la acumulación de CO₂ y en la estimulación de la respiración anaeróbica (Ali et al., 2011; Arnon et al., 2014).

Idealmente, el efecto de los revestimientos sobre la respiración de los productos hortícolas está relacionado con su capacidad para crear una barrera a la difusión de O₂ a través del recubrimiento, lo que se traduce en tasas de respiración más bajas en los frutos recubiertos. Sin embargo, la capacidad para crear esta barrera de O₂ depende en gran medida de la cantidad y naturaleza de los ingredientes menores en la formulación de revestimiento. Ingredientes adicionales, como antioxidantes o aditivos alimentarios antimicrobianos, pueden modificar su eficacia (Fagundes et al., 2015).

3.5.3. Severidad e incidencia

La incidencia de los síntomas de antracnosis presentó una tendencia ascendente con respecto al tiempo de estudio (Figura 3.5), se observó un 100% de incidencia a los seis días de evaluación en las papayas que no fueron recubiertas (SR), mientras que las recubiertas (CR) tuvieron un retraso de dos días y finalmente a los doce días de evaluación las papayas recubiertas con adición de extracto de hoja de guayaba (CRE) redujo significativamente 80% menos incidencia que los tratamientos antes mencionados, este resultado ocurrió en las tres especies de *Colletotrichum* evaluadas.

En el presente trabajo, se encontró que la adición de extracto de hoja de guayaba tuvo un efecto fungistático y no fungida debido a que el crecimiento fúngico que sólo se inhibió, pero no se evitó completamente. Esto puede deberse a la lenta y gradual difusión del agente antimicrobiano desde el revestimiento sobre la superficie de las frutas y hortalizas. (Krasniewska et al., 2015).

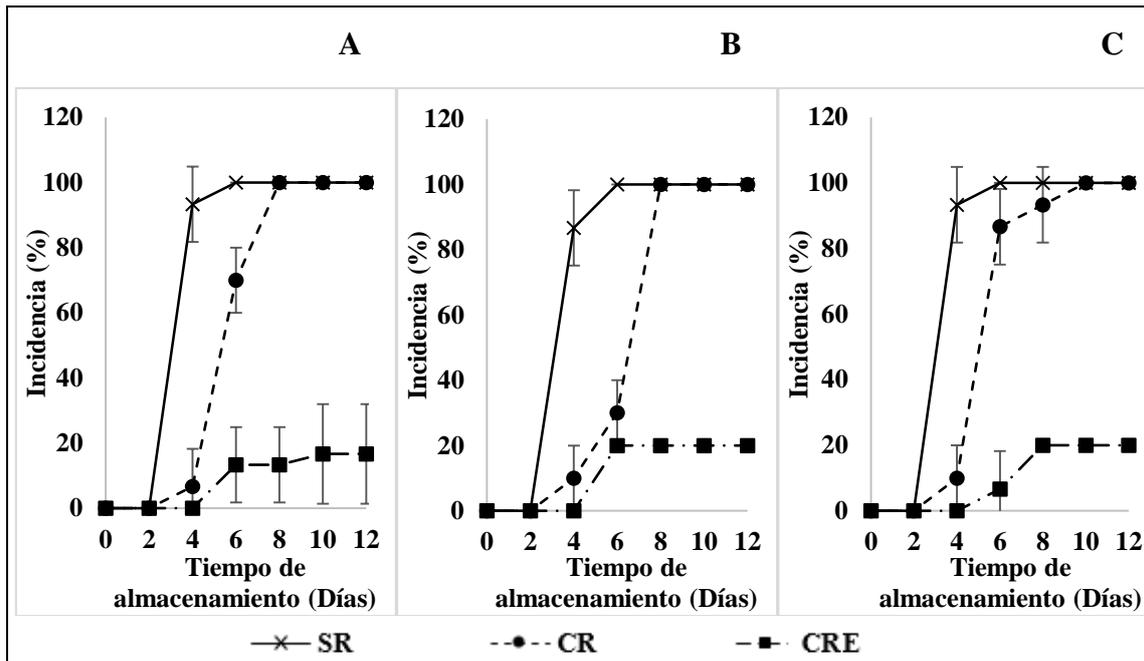


Figura 3.5. Evolución de incidencia de la antracnosis ocasionada por tres especies de *Colletotrichum* en frutos de papaya cv. Maradol. A) *C. brevisporum*, B) *C. gloeosporioides* y C) *C. truncatum*, con diferentes tratamientos: sin recubrimiento (SR), con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) y con recubrimiento más adición de 300ppm de extracto de hoja de guayaba (CRE). Las barras verticales representan \pm desviación estándar de seis frutos.

En la severidad de daño se presentó que la especie de *C. gloeosporioides* fue la cepa que ocasionó la mayor severidad en los frutos sin recubrir, seguida de *C. truncatum* y *C. brevisporum* (Figura 3.6 y 3.7). Con respecto a los tratamientos en las tres especies se observó que la severidad de las papayas recubiertas (CR) fue significativamente 20% menor en comparación con los frutos sin recubrir (SR), y 73% aún menos para los frutos recubrimientos con la adición de extractos (CRE).

En otros estudios, como el uso de CMC con extracto de *Impatiens balsamica* en naranja (Zeng et al., 2013) el uso de otros recubrimientos con la adición de diversos extractos en otros frutos (Bill et al., 2014; Guerra et al., 2015; Krasniewska et al., 2015; Chen et al., 2016; Khalifa et al., 2017) y el uso de otros recubrimientos con la adición de aceites esenciales en papaya (Maqbool et al., 2011; Bosquez-Molina et al., 2010), se ha observado un efecto fungistático selectivo similar al mostrado en el presente trabajo, que puede deberse a la actividad fungicida de los diversos extractos evaluados en cada uno de los trabajos, así mismo, si se estuviera trabajando con la misma especie vegetal habría diferencias asociadas a diversos factores como el disolvente utilizado, el órgano vegetal, la estación de cosecha, las condiciones climáticas, la concentración utilizada, el método de extracción entre otras (Zeng et al., 2013).

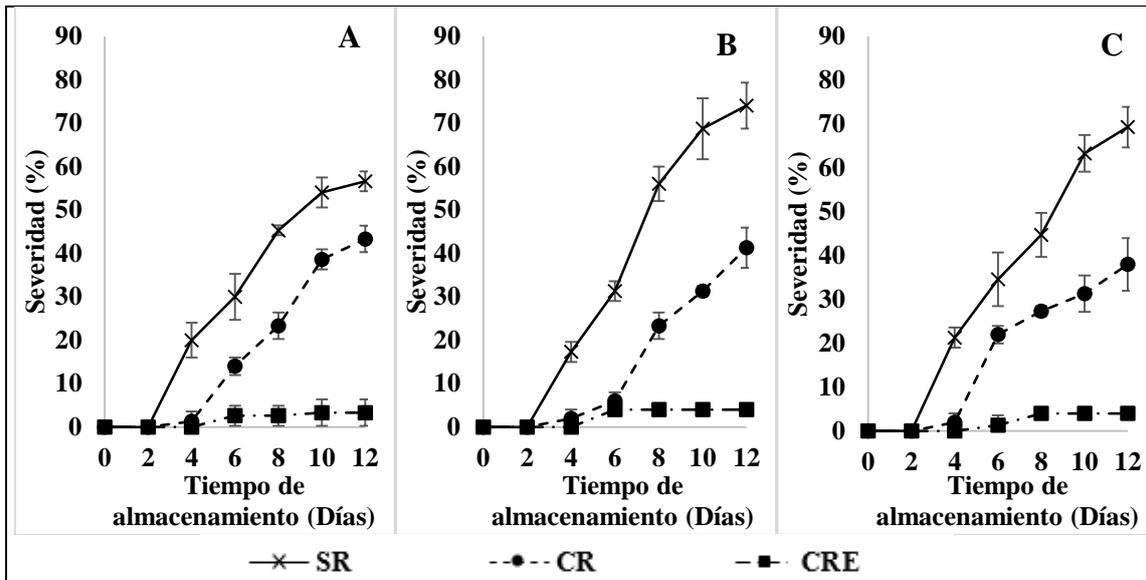


Figura 3.6. Evolución de severidad de daño de la antracnosis de tres especies de *Colletotrichum* en frutos de papaya cv. Maradol. A) *C. brevisporum*, B) *C. gloeosporioides* y C) *C. truncatum*, con diferentes tratamientos: sin recubrimiento (SR), con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) y con recubrimiento más adición de 300ppm de extracto de hoja de guayaba (CRE). Las barras verticales representan \pm desviación estándar de seis frutos.

En el presente estudio, se obtuvo efecto sinérgico con la combinación de carboximetilcelulosa con la adición de extracto de hoja de guayaba a diferencia del trabajo de Bautista-Baños et al., (2003) en el que no se mostró este mejoramiento para controlar la antracnosis evaluada utilizando quitosán.

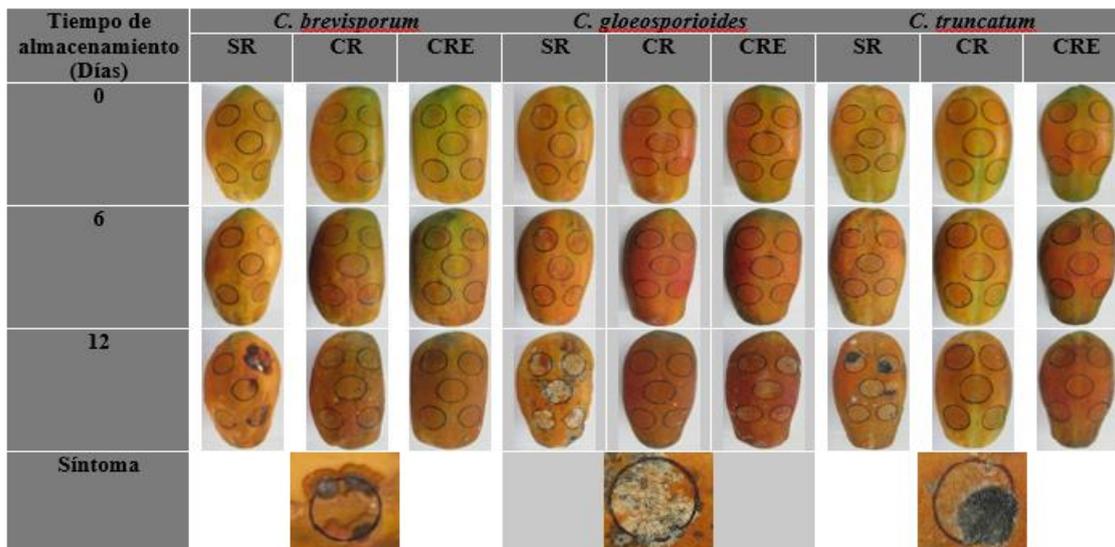


Figura 3.7. Seguimiento fotográfico del efecto de tres tratamientos (sin recubrimiento (SR), con recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% (CR) y con recubrimiento más adición de 300ppm de extracto de hoja de guayaba (CRE)) sobre la incidencia y severidad de antracnosis ocasionada por tres especies de *Colletotrichum* (*C. brevisporum*, *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*.) en frutos de papaya cv. Maradol.

El extracto de hoja de guayaba en otros trabajos ha mostrado tener efecto antimicrobiano (De Araújo et al., 2014; Farjana et al., 2014; Fernandes et al., 2014; Thirunavukkarasu-Santhoshkumar et al., 2014; Dubey, 2016; Morais-Braga et al., 2016; Soliman et al., 2016);

Con los resultados obtenidos se puede pensar que el efecto que tuvo el extracto etílico sobre los hongos evaluados pudo ser atribuido a los polifenoles presentes en el mismo. La actividad antimicrobiana de extractos de plantas depende del contenido y tipo de compuestos fenólicos y flavonoides (Karim et al., 2017). Los terpenos están involucrados en el rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos; o que los alcaloides se intercalan en la doble cadena del ADN y/o pueden penetrar la membrana plasmática combinándola y precipitando las proteínas protoplasmáticas y desnaturalizándolas y a que las lectinas y polipéptidos pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana, lo que conduce a la producción de cantidades elevadas de H₂O₂ (Pérez et al., 2011; De Araújo et al., 2014).

Por lo tanto, la aplicación de recubrimiento con CMC al 0.5% y con la adición de extracto de hoja de guayaba permite prolongar la vida útil y mejorar la calidad de la papaya durante el almacenamiento.

3.5.4. Contenido de fenoles

El contenido de fenoles en los diferentes tejidos evaluados tuvo un ascenso en la primera mitad de estudio (seis días) para después descender (Figura 3.8), así mismo en esa primera mitad de evaluación, el tejido no infectado presentó significativamente el mayor contenido de fenoles. Sin embargo, al final del experimento, el tejido infectado con *C. truncatum* mostró diferencia significativa ($P \leq 0.05$) con el tejido no infectado.

Este incremento se pudo deber a la descomposición celular que libera compuestos fenólicos que están expuestos a la oxidación enzimática (Macheix y Fleuriet, 1990).

En el trabajo de Khalifa et al., (2017), se determinaron los fenoles a tejido recubierto y estos mencionan que el recubrimiento podría funcionar como barreras protectoras en la superficie de los frutos para reducir el suministro de oxígeno y a su vez disminuir el contenido de fenoles y que estos podrían ser aumentados también con la adición de los extractos como componente básico de los recubrimientos.

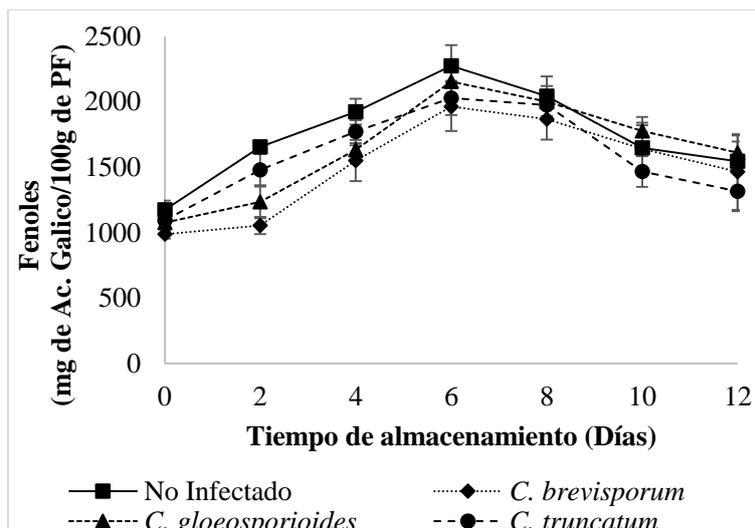


Figura 3.8. Evolución del contenido de fenoles presente en la piel de frutos de papaya cv. Maradol. Piel no infectada e infectada con tres especies de *Colletotrichum* (*C. brevisporum*, *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*). Las barras verticales representan \pm desviación estándar de seis frutos.

3.5.5. Actividad enzimática de exo-poligalacturonasa (Exo-PG)

La enzima poligalacturonasa está relacionada con el ablandamiento de los frutos, y como se sabe, uno de los efectos de los síntomas de la antracosis es el debilitamiento de la piel del fruto, a causa de la presencia de *Colletotrichum* spp, sobre la piel del fruto.

Los resultados mostraron que la Exo-PG descendió en un 90% a los doce días de evaluación con respecto a la actividad inicial, tanto para tejido no infectado como para el infectado, sin haber significancia de está al final de la evaluación (Figura 3.9).

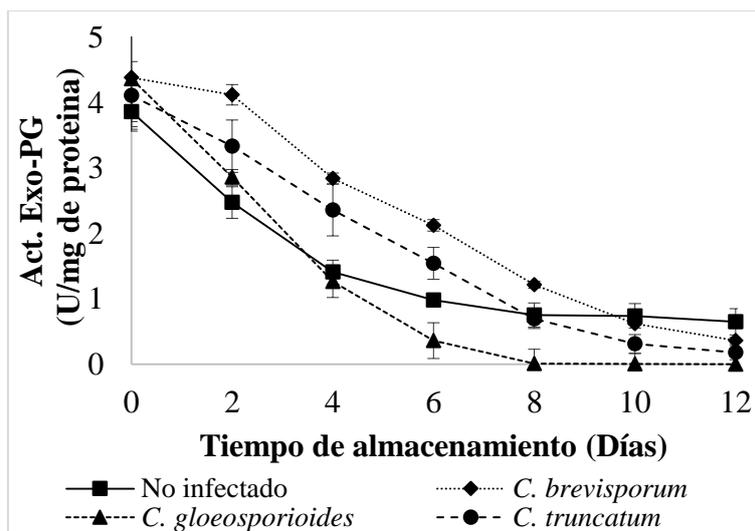


Figura 3.9. Evolución de la actividad de Exo-Poligalacturonasa presente en la piel de frutos de papaya cv. Maradol. Piel no infectada e infectada con tres especies de *Colletotrichum* (*C. brevisporum*, *C. gloeosporioides*, *C. truncatum*). Las barras verticales representan \pm desviación estándar de seis frutos.

Autores como Zeng et al., (2013) y Chen et al., (2016), han evaluado otras enzimas como peroxidasa (POD), superóxido dismutasa (SOD), quitinasa (CHI); β -1,3-glucanasa (GLU), Fenilalanina amonio liasa (PAL), para conocer los cambios bioquímicos que se generan por la adición de los recubrimientos, ya que los datos de la literatura indican que la resistencia sistémica inducida puede ser provocada por la aplicación exógena de diversos compuestos químicos y biológicos (Zeng et al., 2013).

3.6.CONCLUSIÓN

El recubrimiento de carboximetilcelulosa al 0.5% mostró ser un material conservante de papaya cv. Maradol, ya que mantuvo los parámetros de calidad (color, firmeza, pérdida de peso, vitamina C, acidez titulable y sólidos solubles totales). La adición de extracto etánolico de hoja de guayaba también presentó resultados benéficos contra los síntomas de antracnosis, por lo que este recubrimiento es prometedor como alternativa a los fungicidas sintéticos para ser utilizado en aplicaciones comerciales postcosecha para prolongar la vida de almacenamiento de la papaya, ya que es un tratamiento alternativo natural y seguro.

3.7.LITERATURA CITADA

- Ali, A., Muhammad, M.T.M., Sijam, K., Siddiqui, Y. 2011. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. Food Chemistry 124, 620-626. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.085>
- Alsaggaf, M.S., Moussa, S.H., Tayel A.A. 2017. Application of fungal chitosan incorporated with pomegranate peel extract as edible coating for microbiological, chemical and sensorial quality enhancement of Nile tilapia fillets. International Journal of Biological Macromolecules 99, 499-505. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.03.017>
- Annegowda, H.V. y Rajeev Bhat. 2015. Chapter 21: Composition of Papaya Fruit and Papaya Cultivars. In Nutricional Composition of Fruit Cultivars editado por: Simmonds Monique S.J. y Preedy Victor R. Academy Press. 497-516. <https://books.google.com.mx/books?isbn=0124080642>.
- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (1999). Official methods of analysis of AOAC International. 16Ed. 5rd rev. Washington, D.C.

- Arnon, H., Granit, R., Porat, R., Poverenov, E. 2015. Development of polysaccharides-based edible coatings for citrus fruits: A layer-by-layer approach. *Food Chemistry* 166, 465-472. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2014.06.061>
- Arnon, H., Zaitsev, Y., Porat, R., Poverenov, E. 2014. Effects of carboxymethyl cellulose and chitosan bilayer edible coating on postharvest quality of citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 87, 21-26. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.08.007>
- Ayón-Reyna, L.E., González-Robles, A., Rendón-Maldonado, J.G., Báez-Flores, M.E., López-López, M.E., Vega-García, M.O. 2017. Application of a hydrothermal-calcium chloride treatment to inhibit postharvest anthracnose development in papaya. *Postharvest Biology and Technology* 124, 85-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.10.009>
- Azeredo, H.M.C., Waldron, K.W. 2016. Crosslinking in polysaccharide and protein films and coatings for food contact e A review. *Trends in Food Science & Technology* 52, 109-122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2016.04.008>
- * Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., Wilson, C.L. 2003. Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection* 22, 1087-1092. [http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00117-0](http://dx.doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00117-0)
- Bautista-Baños, S., Sivakumar, D., Bello-Pérez, A., Villanueva-Arce, R., Hernández-López, M. 2013. A review of the management alternatives for controlling fungi on papaya fruit during the postharvest supply chain. *Crop Protection* 49, 8-20. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.02.011>
- Badwaik, L.S., Borah, P.K., Deka, S.C. 2014. Antimicrobial and enzymatic antibrowning film used as coating for bamboo shoot quality improvement. *Carbohydrate Polymers* 103, 213- 220. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2013.12.027>
- Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L., Thompson, A.K. 2014. The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection* 64, 159-167. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.06.015>
- Bonilla, J., Atares, L., Vargas, M., Chiralt, A. 2012. Edible films and coatings to prevent the detrimental effect of oxygen on food quality: Possibilities and limitations. *Journal of Food Engineering* 110, 208-213. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2011.05.034>

- Bosquez-Molina, E., Ronquillo-de Jesús, E., Bautista-Baños, S., Verde-Calvo, J.R., Morales-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. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2010.03.008>
- Cazón, P., Velazquez, G., Ramírez, J.A., Vázquez, M. 2017. Polysaccharide-based films and coatings for food packaging: A review. *Food Hydrocolloids* 68, 136-148. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2016.09.009>
- Chen, C., Peng, X., Zeng R., Chen M., Wan C., Chen J. 2016. *Ficus hirta* fruits extract incorporated into an alginate-based edible coating for Nanfeng mandarin preservation. *Scientia Horticulturae* 202, 41-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.12.046>
- Choulitoudi, E., Bravou, K., Bimpilas, A., Tsironi, T., Tsimogiannis, D., Taoukis, P., Oreopoulou, V. 2016. Antimicrobial and antioxidant activity of *Satureja thymbra* in gilthead seabream fillets edible coating. *Food and Bioprocess Processing* 100, 570-577. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2016.06.013>
- Choulitoudi, E., Ganiari, S., Tsironi, T., Ntzimani, A., Tsimogiannis, D., Taoukis, P., Oreopoulou, V. 2017. Edible coating enriched with rosemary extracts to enhance oxidative and microbial stability of smoked eel fillets. *Food Packaging and Shelf Life* 12, 107-113. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2017.04.009>
- De Araújo, A.A., Lira-Soares, L.A., Assunção-Ferreira, M.R., De Souza Neto, M.A., Ribeiro da Silva, G., Fernandes de Araújo, Jr. F., Bernardo Guerra, G.C., Nunes de Melo, M.C. 2014. Quantification of polyphenols and evaluation of antimicrobial, analgesic and anti-inflammatory activities of aqueous and acetone–water extracts of *Libidibiaferrea*, *Parapiptadeniarigida* and *Psidium guajava*. *Journal of Ethnopharmacology*, 156: 88-96.
- Dubey, S. 2016. Comparative antimicrobial efficacy of herbal alternatives (*Emblica officinalis*, *Psidium guajava*), MTAD, and 2.5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Journal of oral biology and craniofacial research*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.010>
- Espitia, P.J.P., Batista, R.A., Azeredo, H.M.C., Otoni, C.G. 2016. Probiotics and their potential applications in active edible films and coatings. *Food Research International* 90, 42-52. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2016.10.026>

- Fagundes, C., Palou, L., Monteiro, A.R., Pérez-Gago, M.B. 2015. Hydroxypropyl methylcellulose-beeswax edible coatings formulated with antifungal food additives to reduce alternaria black spot and maintain postharvest quality of cold-stored cherry tomatoes. *Scientia Horticulturae* 193, 249-257. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.07.027>
- FAO/STAT. 2016. Food and Agriculture Organization of United Nations, Statics. Consultado en septiembre del 2017. Disponible en: <http://faostat3.fao.org/faostat-gateway/go/to/download/Q/QC/E>.
- Farjana, A., Zerín, N., Kabir, Md.S. 2014. Antimicrobial activity of medicinal plant leaf extracts against pathogenic bacteria. *Asian Pacific Journal of Tropical Disease* 4(2), 920-923. [http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808\(14\)60758-1](http://dx.doi.org/10.1016/S2222-1808(14)60758-1)
- Fernandes, M.R.V, Dias, A.L.T., Carvalho, R.R., Souza, C.R.F., Oliveira, W.P. 2014. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. *Industrial Crops and Products* 60, 39-44.
- Folin O. y Ciocalteu V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The journal of biological chemistry*. LXXXIII (2): 627-650.
- Forato, L.A., de Britto, D., de Rizzo, J.S., Gastaldi, T.A., Assis, O.B.G. 2015. Effect of cashew gum-carboxymethylcellulose edible coatings in extending the shelf-life of fresh and cut guavas. *Food Packaging and Shelf Life* 5, 68-74. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2015.06.001>
- Galus, S., Kadzińska, J. 2015. Food applications of emulsion-based edible films and coatings. *Trends in Food Science & Technology* 45, 273-283. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tifs.2015.07.011>
- Garcia, E., Barret, D.M., 2002. Preservatives treatment for fresh cut fruits and vegetables. In: Lamikanra, O. (Ed.), *Fresh-Cut Fruits and Vegetables*. CRC Press, Boca Raton, FL.
- Guerra, I.C.D., de Oliveira, P.D.L., Pontes, A.L.S., Lúcio, A.S.S.C., Tavares, J.F., Barbosa-Filho, J.M., Madruga, M.S., de Souza, E.L. 2015. Coatings comprising chitosan and *Mentha piperita* L. or *Mentha × villosa* Huds essential oils to prevent common postharvest mold infections and maintain the quality of cherry tomato fruit. *International Journal of Food Microbiology* 214, 168-178. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2015.08.009>

- Hamzah, H.M., Osman, A., Tan, C.P., Ghazali, F.M. 2013. Carrageenan as an alternative coating for papaya (*Carica papaya* L. cv. Eksotika). *Postharvest Biology and Technology* 75, 142-146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.08.012>
- Hewajulige, 2016. Papayas. In *Encyclopedia of Food and Health*. Editado por: Caballero B., Finglas P.M, y Toldrá F. Vol. 1. Elsevier-Academy Press. Reino Unido. 209-212. <https://books.google.com.mx/books?isbn=0123849535>.
- Kader, A.A. 2002. Modified atmospheres during transport and storage. In: Kader. A.A. (Ed.), *Postharvest technology of horticultural crops*. 3rd edition. University of California, Agriculture and Natural Resources. USA. Publication 3311: 135-145.
- Kader, Adel A. 2009. Papaya. Recommendations for maintaining postharvest quality. Postharvest Technology Research Information Center, Department of Plant Sciences, University of California, Davis, CA, USA. <http://postharvest.ucdavis.edu/Produce/ProduceFacts/Fruit/papaya.shtml>
- Karim, H., Boubaker, H., Askarne, L., Cherifi, K., Lakhtar, H., Msanda, F., Boudyach, E.H., Ait Ben Aoumar, A. 2017. Use of *Cistus aqueous* extracts as botanical fungicides in the control of Citrus sour rot. *Microbial Pathogenesis* 104, 263-267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.041>
- Kechinski, C.P., Montero, C.R.S., Guimarães, P.V.R., Noreña, C.P.Z., Marczak, L.D.F., Tessaro I.C., Bender R.J. 2012. Effects of ozonized water and heat treatment on the papaya fruit epidermis. *Food and Bioproducts Processing* 90, 118-122. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2011.01.005>
- Khalifa, I., Barakat, H., El-Mansy, H.A., Soliman, S.A. 2017. Preserving apple (*Malus domestica* var. Anna) fruit bioactive substances using olive wastes extract-chitosan film coating. *Information Processing in Agriculture* 4, 90-99. <http://dx.doi.org/10.1016/j.inpa.2016.11.001>
- Kraśniewska, K., Gniewosz, M., Synowiec A., Przybył, J.L., Bączek, K., Węglarz, Z. 2015. The application of pullulan coating enriched with extracts from *Bergenia crassifolia* to control the growth of food microorganisms and improve the quality of peppers and apples. *Food and Bioproducts Processing* 94, 422-433. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fbp.2014.06.001>
- Kurek, M., Ščetar, M., Galić, K. 2017. Edible coatings minimize fat uptake in deep fat fried products: A review. *Food Hydrocolloids* 71, 225-235. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2017.05.006>

- Laily, N., Kusumaningtyas, R.W., Sukarti, L., Kartika Rini, M.R.D. 2015. The Potency of Guava *Psidium guajava* (L.) Leaves as a functional Immuno stimulatory Ingredient. *Procedia Chemistry* 14, 301-307.
- Landero-Valenzuela, N., Nieto-Angel, D., Téliz-Ortiz, D., Alatorre-Rosas, R., Ortíz-García C.F., Orozco-Santos M. 2015. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. *Biological Control* 91, 88-93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.08.002>
- Lima J.R., Gondim D.M.F., Oliveira J.T.A., Oliveira, F.S.A., Gonçalves L.R.B., Viana F.M.P. 2013. Use of killer yeast in the management of postharvest papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology* 83, 58-64. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.03.014>
- Lutfi, Z., Nawab, A., Alam, F., Hasnain, A., Haider, S.Z. 2017. Influence of xanthan, guar, CMC and gum acacia on functional properties of water chestnut (*Trapa bispinosa*) starch. *International Journal of Biological Macromolecules* 103, 220–225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.046>
- McGuire, G. 1992. Reporting of objective color measurements. *Hort Science* 27, 1254-1255.
- Macheix J.J. 1990. *Fleuriet A. Fruit Phenolics*. USA: CRC Press LLC.
- Madani, B., Mohamed, M.T.M., Biggs, A.R., Kadir, J., Awang, Y., Tayebimeigooni, A., Shojaei, T.R. 2014. Effect of pre-harvest calcium chloride applications on fruit calcium level and post-harvest anthracnose disease of papaya. *Crop Protection* 55, 55-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.009>
- Maeda, C., Nelson, S. 2014. Anthracnose of Papaya in Hawaii. *Plant Disease* 103, 1-6.
- Maqbool, M., Ali, A., Alderson, P.G., Mohamed, M.T.M., Siddiqui, Y., 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 (2011) 71–76. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2011.04.002>
- Morais-Braga, M.F.B., Sales, D.L., Carneiro, J.N.P., Machado, A.J.T., dos Santos, A.T.L., Audilene de Freitas, M., Morais, A.G., Martins, B., Figueiredo Leite, N.L.S. de Matos, Y.M., Tintino, S.R., Souza, D.S.L., Menezes, I.R.A., Ribeiro-Filho, J., Costa, J.G.M., Coutinho, H.D.M. 2016. *Psidium guajava* L. and *Psidium brownianum* Mart ex DC.: Chemical composition and anti e *Candida* effect in association with fluconazole. *Microbial Pathogenesis* 95, 200-207. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.04.013>

- Murmu, S.B., Mishra, H.N. 2017. Optimization of the arabic gum based edible coating formulations with sodium caseinate and tulsi extract for guava. *LWT - Food Science and Technology* 80, 271-279. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.02.018>
- Nawab, A., Alam, F., Hasnain, A. 2017. Mango kernel starch as a novel edible coating for enhancing shelf- life of tomato (*Solanum lycopersicum*) fruit. *International Journal of Biological Macromolecules* 103, 581-586. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.057>
- Ong, M.K., Ali, A. 2015. Antifungal action of ozone against *Colletotrichum gloeosporioides* and control of papaya anthracnose. *Postharvest Biology and Technology* 100, 113–119. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.09.023>
- Ong, M.K., Ali, A., Alderson, P.G., Forney, C.F. 2014. Effect of different concentrations of ozone on physiological changes associated to gas exchange, fruit ripening, fruit surface quality and defence-related enzymes levels in papaya fruit during ambient storage. *Scientia Horticulturae* 179, 163-169. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2014.09.004>
- Özvural E.B., Huang, Q., Chikindas, M.L. 2016. The comparison of quality and microbiological characteristic of hamburger patties enriched with green tea extract using three techniques: Direct addition, edible coating and encapsulation. *LWT - Food Science and Technology* 68, 385-390. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2015.12.036>
- Pérez, C. Rojas, A., Jhanna, C.S. Chamorro, A.L., Pérez, P. Katy. 2011. Evaluation of the antifúngi activity of *Melia azederachon* isolated of *Colletotrichum* spp. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 3(2), 309-320.
- Rashid, M.H.A., Grout, B.W.W., Continella, A., Mahmud, T.M.M. 2015. Low- dose gamma irradiation following hot water immersion of papaya (*Carica papaya* linn.) fruits provides additional control of postharvest fungal infection to ext end shelf life. *Radiation Physics and Chemistry* 110, 77-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.01.024>
- Roy, N., Saha, N., Kitano, T., Saha, P. 2012. Biodegradation of PVP–CMC hydrogel film: A useful food packaging material. *Carbohydrate Polymers* 89, 346- 353. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2012.03.008>
- Salgado, P.R., Ortiz, C.M., Musso, Y.S., Giorgio, L.D., Mauri A.N. 2015. Edible films and coatings containing bioactives. *Current Opinion in Food Science* 5, 86-92. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cofs.2015.09.004>

- Shin, S-H., Chang, Y., Lacroix, M., Han, J. 2017. Control of microbial growth and lipid oxidation on beef product using an apple peel-based edible coating treatment. *LWT - Food Science and Technology* 84, 183-188. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.05.054>
- SIAP/SAGARPA 2016. Servicio de información y estadística agroalimentaria y pesquera. Secretaria de agricultura, ganadería, desarrollo rural, pesca y alimentación. Consultado en: septiembre 2017. Disponible en: <http://www.siap.sagarpa.gob.mx>
- Soliman, F.M., Fathy, M.M., Salama, M.M., Saber, F.R. 2016. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. *Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University*. In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.06.003>
- Soradech, S., Nunthanid, J., Limmatvapirat, S., Luangtana-anan, M. 2017. Utilization of shellac and gelatin composite film for coating to extend the shelf life of banana. *Food Control* 73, 1310-1317. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodcont.2016.10.059>
- Somogyi, M. 1952. Notes on sugar determination. *J. Biol. Chemistry* 195, 19-25.
- Srivastava, M.K., Dwivedi, U.N. 2000. Delayed ripening of banana fruit by salicylic acid. *Plant Science* 158, 87-96.
- Synowiec, A., Gniewosz, M., Kraśniewska, K., Przybył, K.L., Bączek, K., Węglarz, Z. 2014. Antimicrobial and antioxidant properties of pullulan film containing sweet basil extract and an evaluation of coating effectiveness in the prolongation of the shelf life of apples stored in refrigeration conditions. *Innovative Food Science and Emerging Technologies* 23, 171-181. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2014.03.006>
- Tavassoli-Kafrani, E., Shekarchizadeh, H., Masoudpour-Behabadi, M. 2016. Development of edible films and coatings from alginates and carrageenans. *Carbohydrate Polymers* 137, 360-374. <http://dx.doi.org/10.1016/j.carbpol.2015.10.074>
- Tesfay, S.Z., Magwaza, L.S. 2017. Evaluating the efficacy of moringa leaf extract, chitosan and carboxymethyl cellulose as edible coatings for enhancing quality and extending postharvest life of avocado (*Persea americana* Mill.) fruit. *Food Packaging and Shelf Life* 11, 40-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fpsl.2016.12.001>
- Thirunavukkarasu-Santhoshkumar, Rahuman, A.A., Jayaseelan, C., Rajakumar, G., Marimuthu, S., Kirthi, A.V., Velayutham, K., Thomas, J., Venkatesan, J., Kim, S-K. 2014. Green synthesis of titanium dioxide nanoparticles using *Psidium guajava* extract and its antibacterial and antioxidant properties. *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine* 2014, 968-976. [http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645\(14\)60171-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60171-1)

- Varela, P., Fiszman, S.M. 2011. Hydrocolloids in fried foods. A review. Food Hydrocolloids 1-12. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodhyd.2011.01.016>
- Vieira, M.G.A., da Silva, M.A., dos Santos, L.O., Beppu, M.M. 2011. Natural-based plasticizers and biopolymer films: A review. European Polymer Journal 47, 254-263. <http://dx.doi.org/10.1016/j.eurpolymj.2010.12.011>
- Wills, R.B.H., McGlasson, W.B., Graham, D., Joyce, D.C., 2007. Postharvest: An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit and Vegetables and Ornamentals. CABI, Oxfordshire, UK.
- Zavala-León, M.J., Jairo-Cristóbal, A. 2012. Escala logarítmica diagramática de severidad de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en papaya (*Carica papaya*). Fitosanidad 16(2), 83-86. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209126216004>
- Zeng, R., Zhang A., Chen, J., Fu, Y. 2013. Impact of carboxymethylcellulose coating enriched with extract of *Impatiens balsamina* stems on preservation of 'Newhall' navel orange. Scientia Horticulturae 160, 44-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2013.05.015>

4. CAPITULO IV. Efecto inhibitorio de extractos etílicos de plantas medicinales de Brasil en el control *in vitro* de *Colletotrichum sp.*

Lira-Vargas A.A.¹, Rebouças-São José A.², Nieto-Ángel D.^{1*}; Suene de Jesus-Nolasco D.²

¹ Colegio de Posgraduados, Posgrado Fitosanidad-Fitopatología, Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo, Texcoco, 56230, Edo. de México.

² Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório Biofábrica de Microrganismos. Estrada do Bem Querer, km 04, bairro Universidade, 95, 45031-900, Vitória da Conquista-Bahia, Brasil

*Autor de correspondencia: dnieto@colpos.mx

4.1.RESUMEN

La severidad de la antracnosis causada por el hongo del género *Colletotrichum* en los frutos ha llevado a los productores a realizar aplicaciones de fungicidas y en muchas ocasiones sobre dosificaciones, causando contaminación ambiental, por lo que el uso de extractos de plantas con propiedades fungicidas o fungiestáticas puede considerarse como una alternativa en el control de dicha enfermedad y sustitución de tratamientos químicos. Por lo que el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antifúngica de cinco plantas medicinales de uso frecuente en Brasil (*Annona muricata*, *Azadirachta indica*, *Baccharis trimera*, *Guarea trichilioides*, *Zingiber officinale*) de forma *In vitro* sobre *Colletotrichum sp.* para el control de la antracnosis. En la obtención de extractos se utilizaron hojas de dichas plantas y se obtuvieron por el método de maceración, la cual consistió en mezclar 15 g de tejido vegetal con 25 mL de etanol al 70 %, dicha mezcla se dejó reposar por 24 h a 21 °C y su actividad antifúngica se realizó con el método de microdilución-difusión en agar, probando cinco concentraciones del extracto (0, 50, 100, 150 y 200 ppm) contra *Colletotrichum sp.* previamente aislado e identificado de frutos de papaya. El extracto de hojas de guanábana (*A. muricata*) presentó el mayor contenido de fenoles y provocó la mayor actividad antimicrobiana sobre *Colletotrichum sp.*, a una concentración de 200 ppm de este mismo extracto ya que se obtuvo el 100% de inhibición del mismo hongo, por lo que se sugiere que estas hojas son una fuente importante de compuestos bioactivos con el potencial como un agente antimicrobiano natural. Por lo que el uso de extractos de hojas de plantas medicinales son una alternativa para el control de *Colletotrichum sp.* en frutos de papaya y sustitución de tratamientos químicos, debido a los polifenoles presentes en el extracto.

Palabras clave: Extracto vegetal, Actividad antifúngica, *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.2. ABSTRACT

The severity of the anthracnose caused by the fungus of the genus *Colletotrichum* in the fruits has led to the producers to carry out applications of fungicides and in many occasions on dosages, causing environmental contamination, reason why the use of extracts of plants with fungicidal or fungistatic properties can be considered as an alternative in the control of this disease and substitution of chemical treatments. The objective of the present investigation was to evaluate the antifungal activity of five medicinal plants commonly used in Brazil (*Annona muricata*, *Azadirachta indica*, *Baccharis trimera*, *Guarea trichilioides*, *Zingiber officinale*) in vitro on *Colletotrichum* sp. for the control of anthracnose. The leaves were obtained from the plants and obtained by the maceration method, which consisted in mixing 5g of plant tissue with 25 mL of 70% ethanol, the mixture was allowed to stand for 24 hours at 21 ° C and its antifungal activity was carried out using the microdilution-diffusion agar method, testing five concentrations of the extract (0, 50, 100, 150 and 200 ppm) against *Colletotrichum* sp. previously isolated and identified of papaya fruits. The extract of guanabana leaves (*A. muricata*) presented the highest phenol content and caused the highest antimicrobial activity on *Colletotrichum* sp., At a concentration of 200 ppm of this same extract since 100% inhibition of the same fungus was obtained , so it is suggested that these leaves are an important source of bioactive compounds with potential as a natural antimicrobial agent. Therefore the use of leaf extracts of medicinal plants are an alternative for the control of *Colletotrichum* sp. in papaya fruits and substitution of chemical treatments, due to the polyphenols present in the extract.

Key words: Vegetable extract, Antifungal activity, *Colletotrichum gloeosporioides*.

4.3. INTRODUCCIÓN

La antracnosis es causada principalmente por *Colletotrichum gloeosporioides*; sin embargo, es posible encontrar otras especies de *Colletotrichum* causando enfermedades en un mismo cultivo (Hu et al., 2015; Han et al., 2016; Saini et al., 2016; Tapia-Tussell et al., 2016). Las enfermedades inducidas por este hongo aparte de la antracnosis incluyen: marchitamiento, pudrición radical, mancha foliar, pudrición de flores y tizón en plántulas, las cuales están presentes en una amplia gama de hospedantes (Liu et al., 2013; Jiang et al., 2014; Velho et al., 2015).

Algunas de las alternativas más empleadas en el control de la antracnosis son los tratamientos físicos y químicos, éstos últimos implican el uso constante de sustancias desarrolladas sintéticamente que pueden inducir la resistencia en el patógeno o mayor agresividad del mismo y algunos incluso pueden causar daños a la salud y/o al medio ambiente, deteriorando en ocasiones la calidad del producto con manchas, olores y sabores desagradables, además el alto costo de los tratamientos químicos han obligado a los investigadores a buscar nuevos ingredientes activos biodegradables, para la implementación de medidas de manejo con menor impacto ambiental y económico (Dubey et al., 2016). Una de esas alternativas, es el uso de derivados botánicos a partir de extractos de plantas con propiedades fungicidas o fungistáticas que puede considerarse una alternativa en el control de dicha enfermedad y el control de otros agentes patogénicos (Dubey, 2016; Soliman et al., 2016),

Los extractos de plantas medicinales se utilizan comúnmente para tratar las infecciones en la medicina tradicional y varían de un país a otro, las formulaciones herbales pueden incluir extractos de la raíz, la corteza o las hojas de varias plantas (Sulaiman et al., 2014). Sin embargo, recientemente se han utilizado como conservantes de alimentos crudos y procesados (Mesomo et al., 2013). Las plantas medicinales se han utilizado durante muchos años y son la fuente de nuevas sustancias activas y nuevos fármacos de interés farmacéutico (Ferreira et al., 2014; Cristo et al., 2016). Los fitoconstituyentes bioactivos como, fenoles, alcaloides, taninos, terpenoides, polipéptidos, entre otros, son los principales responsables de la actividad medicinal (Chakotiya et al., 2017), que se utilizan cada vez más ampliamente por su posible valor quimioterapéutico y nutricional, ya que las plantas en su evolución han desarrollado mecanismos de defensa como los metabolitos secundarios producidos por ellas que constituyen una de esas barreras contra insectos, hongos, bacterias y otros organismos patogénicos (Dubey et al., 2016; Soliman et al., 2016).

En Brasil, el estudio de plantas medicinales es de gran importancia ya que es uno de los países con mayor diversidad biológica. A pesar de su relevancia, sólo se han realizado algunos estudios (Lima et al., 2011). Por lo que, se ha aumentado el interés de los investigadores en extractos con potencial actividad antimicrobiana, ya que tienen una menor incidencia de reacciones adversas en comparación con compuestos sintéticos (Mesomo et al., 2013; Akeel et al., 2017), además de que se demostrado que son eficaces para controlar el crecimiento de una amplia variedad de microorganismos incluyendo

hongos, levaduras y bacterias (Mesomo et al., 2013). Algunas de las plantas que podrían tener potencial para la realización de extractos se encuentran: *Annona muricata*, *Azadirachta indica*, *Baccharis trimera*, *Guarea trichilioides* y *Zingiber officinale*.

Annona muricata L., también conocida como graviola y guanábana, es un árbol de hoja perenne que se ve en las zonas tropicales y subtropicales. La planta se ha utilizado durante mucho tiempo en diferentes países como tratamiento etnomedicinal para diversas afecciones que incluyen cistitis, fiebre, dolores de cabeza, insomnio, reumatismo, trastornos gastrointestinales, hipertensión, e infección por parásitos (Coria-Tellez et al., 2016; Liu et al., 2016). Actualmente tiene las propiedades para tratar la diabetes (Tsofack et al., 2014), infecciones virales (Florence et al., 2014), el cáncer (Sun et al., 2017), tiene actividad larvicida (Santhos et al., 2015), antimicrobiana (Pinto et al., 2017), nematicida (Bustos et al., 2017).

Azadirachta indica es un árbol versátil de la familia *Meliaceae*, también conocida como neem, nim o margosa. Algunos estudios han demostrado que esta planta presenta propiedades medicinales. Es un producto multi-funcional, así como multi-utilidad natural y sin ningún efecto secundario. Los estudios mostraron actividad antiséptica, antihelmíntico, tónico, antidiabético, antibacteriana y antitumoral e inductora de interferón antipirético, antiinflamatorio, e insecticida (Cristo et al., 2016; Akeel et al., 2017).

Marinhero (*Guarea trichilioides*) ha sido una planta muy poco estudiada, más sus estudios realizados han demostrado que contiene diterpenos (Furlan et al., 1996), que la hacen ser una planta toxica (Andrade et al., 1976), y debido a eso se ha realizado un estudio como insecticida contra *Spodoptera frugiperda* en el cultivo de maíz (Brito et al., 2004). El género *Baccharis trimera* comprende 150 especies, conocidas coloquialmente como carqueja, bacárida y bacórida cacália. Las acciones alelopáticas, analgésicas, antifúngicas, antiinflamatorias, antimicrobianas, anti mutagénicas, antioxidantes, antivirales e insecticidas han sido descritas en estas especies (Fernandez et al., 2013). Es popularmente consumido como té, y está ampliamente desarrollado en Candiota, una de las regiones carboníferas más importantes del Brasil. Esta planta tiene una alta capacidad de adsorción de metales (cobalto, el níquel y el manganeso), por lo que el consumo implica un riesgo para la salud humana (Menezes et al., 2016).

El jengibre (*Zingiber officinale*) es una planta que pertenece a la familia *Zingiberaceae* y es ampliamente utilizado en la producción de alimentos, así como en otros sectores

industriales. Su rizoma es un ingrediente común en la medicina popular como anti-inflamatorio, antiemético, antitumoral, analgésico, anti-hemorrágico, protector de células neuronales, anti-reumática, antimicóticos (Srinivasan, 2017) y agente antibacteriano (Almaki et al., 2017; Chakotiya et al., 2017).

Debido a lo antes mencionado, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la actividad antifúngica de cinco plantas medicinales ocupadas en Brasil (*Annona muricata*, *Azadirachta indica*, *Baccharis trimera*, *Guarea trichilioides*, *Zingiber officinale*) de forma *in vitro* sobre *Colletotrichum* spp. para el control de la antracnosis.

4.4.MATERIAL Y MÉTODOS

4.4.1. Obtención de extractos

Hojas jóvenes aparentemente sanas de guanábana (*Annona muricata*), neem (*Azadirachta indica*), carqueja (*Baccharis trimera*), marinhero (*Guarea trichilioides*) y raíz de jengibre (*Zingiber officinale*) las cuales fueron colectadas en Vitoria da Conquista, Bahia-Brasil, mismas que se transportaron en bolsas de papel al Laboratorio da Biofábrica-UESB, campus Vitória da Conquista-BA para posteriormente ser lavadas con agua corriente y jabón, y ser escurridas. La obtención de los extractos se basó en el método de extracción por maceración (Fernandes et al., 2014), con modificaciones. Una porción de 15 g del material vegetal de cada planta se mezcló con 25 mL de etanol:agua al 70:30% v/v, posteriormente, se realizó la extracción por 24 h a 21 ± 2 °C y después se procedió a filtrar por gravedad, a través de papel de filtro Whatman No. 1. El extracto se aforó con la solución extractora a 25 mL y se conservó en un frasco ámbar.

4.4.2. Determinación de fenoles

Los fenoles totales fueron cuantificados usando el método colorimétrico de Folin-Ciocalteu reportado por Folin y Ciocalteu (1927), en el cual se utiliza ácido gálico como estándar. El método se basa en la capacidad de los fenoles para reaccionar con agentes oxidantes. Una disolución patrón de ácido gálico se preparó 0.1 g/L, para ser utilizada como curva patrón y se leyó la absorbancia a 765 nm. La absorbancia de las muestras fue leída e interpolada en la curva estándar, los resultados se expresaron en mg de ácido gálico/mL de extracto para finalmente realizar el cálculo necesario para obtener el volumen necesario de los extractos para la generación de ciertas partes por millón, considerando que 1 ppm= $\mu\text{g/mL}$.

4.4.3. Efecto antifúngico

El efecto inhibidor de los compuestos fenólicos en el crecimiento de los hongos se ensayó usando el método de microdilución-difusión en agar. El hongo de *Colletotrichum* sp. fue previamente aislado e identificado de fruta de papaya cv. Sunrise en el Laboratorio da Biofábrica-UESB, campus Vitória da Conquista-BA. El método consistió en diluir y difundir el volumen calculado para cada uno de los extractos obtenidos por separado a una concentración de 0, 50, 100, 150 y 200 ppm en medio de cultivo de papa dextrosa agar (PDA), una vez solidificado el medio de cultivo, al centro de la placa se colocó un biodisco de 0.4 cm de hongo previamente crecido durante ocho días de edad en medio de PDA. La incubación se llevó a cabo a 23 ± 2 °C durante 10 d. El porcentaje de inhibición del crecimiento radial de los hongos se calculó según la fórmula: porcentaje de inhibición = $(DC - DT) / DC \times 100$, donde DC fue el diámetro de hongo crecido en PDA con la adición de agua y DT fue el diámetro de las colonias tratadas con los extractos (Sagwan et al., 2012).

4.4.4. Análisis estadístico

El contenido de fenoles, así como la actividad antifúngica de los extractos, se analizó mediante un diseño de bloques completamente al azar. En el contenido de fenoles se realizaron cinco extracciones de cada planta para tener así cinco replicas. En la actividad antifúngica se montaron dos experimentos, cada uno con tres replicas. La diferencia entre tratamientos se determinó con estadísticas descriptivas, análisis de varianza (ANOVA) con pruebas de separación de medias por mínimos cuadrados, ajustadas por Tukey con una probabilidad de error del 5% con el programa estadístico SISVAR versión 13.1.

4.5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.5.1. Contenido de fenoles

El mayor contenido de fenoles lo presentó el extracto de hojas de guanábana y marinhoiro sin presentar diferencia significativa entre ellos, mismos que tuvieron significativamente 50, 79 y 84% mayor contenido de fenoles que el extracto de hojas de neem, carqueja completa y raíz de jengibre y hojas de carqueja, respectivamente (Figura 4.1).

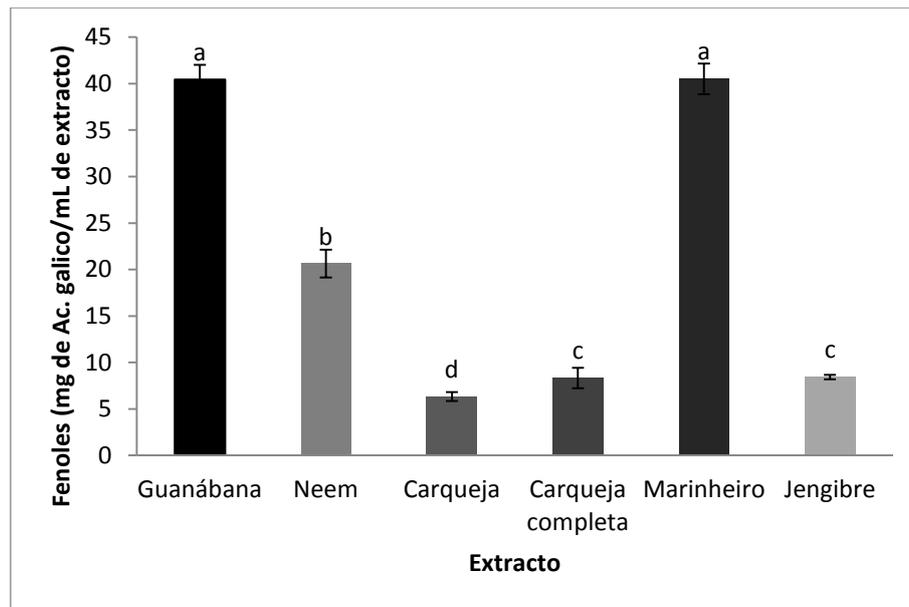


Figura 4.1. Contenido de fenoles de extractos etílicos. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 5 réplicas. Las letras sobre las barras indican diferencia significativa entre tratamientos ($\alpha = 0.05$).

Los fenoles son metabolitos secundarios que regulan la actividad metabólica de las plantas, la importancia de ellos radica en que producen soporte mecánico a las plantas, contribuyen en la coloración de las flores y frutos, protegen contra patógenos y herbívoros y tienen una gran efectividad protegiendo los tejidos frente a la radiación ultravioleta (Gil-Ramírez et al., 2016).

En las hojas, la regulación de la síntesis de compuestos fenólicos es una parte importante del desarrollo de dicho órgano. Por otro lado, el destino de los carbohidratos formados durante la fotosíntesis, parte de los cuales se emplearán en la conformación estructural de la planta (metabolismo primario) y otros en el metabolismo secundario, tendrán una gran influencia en la cantidad y calidad de los compuestos fenólicos producidos (Jang et al., 2014; Laily et al., 2015; Diaz de Cerio et al., 2016). Las condiciones de obtención (método de extracción, solvente empleado, concentración de solvente, tiempo de extracción, entre otros), también pueden provocar que el contenido de fenoles sea variado (Kalidindi et al., 2015).

4.5.2. Efecto antifúngico

El bioensayo realizado mostró que el extracto de hoja de guanábana fue el que mayor porcentaje de inhibición casi todas sus concentraciones evaluadas con respecto a las demás plantas evaluadas (Figura 4.2), así mismo se presentó que con la concentración de

200 ppm de este mismo extracto se logró inhibir al 100% el crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp.

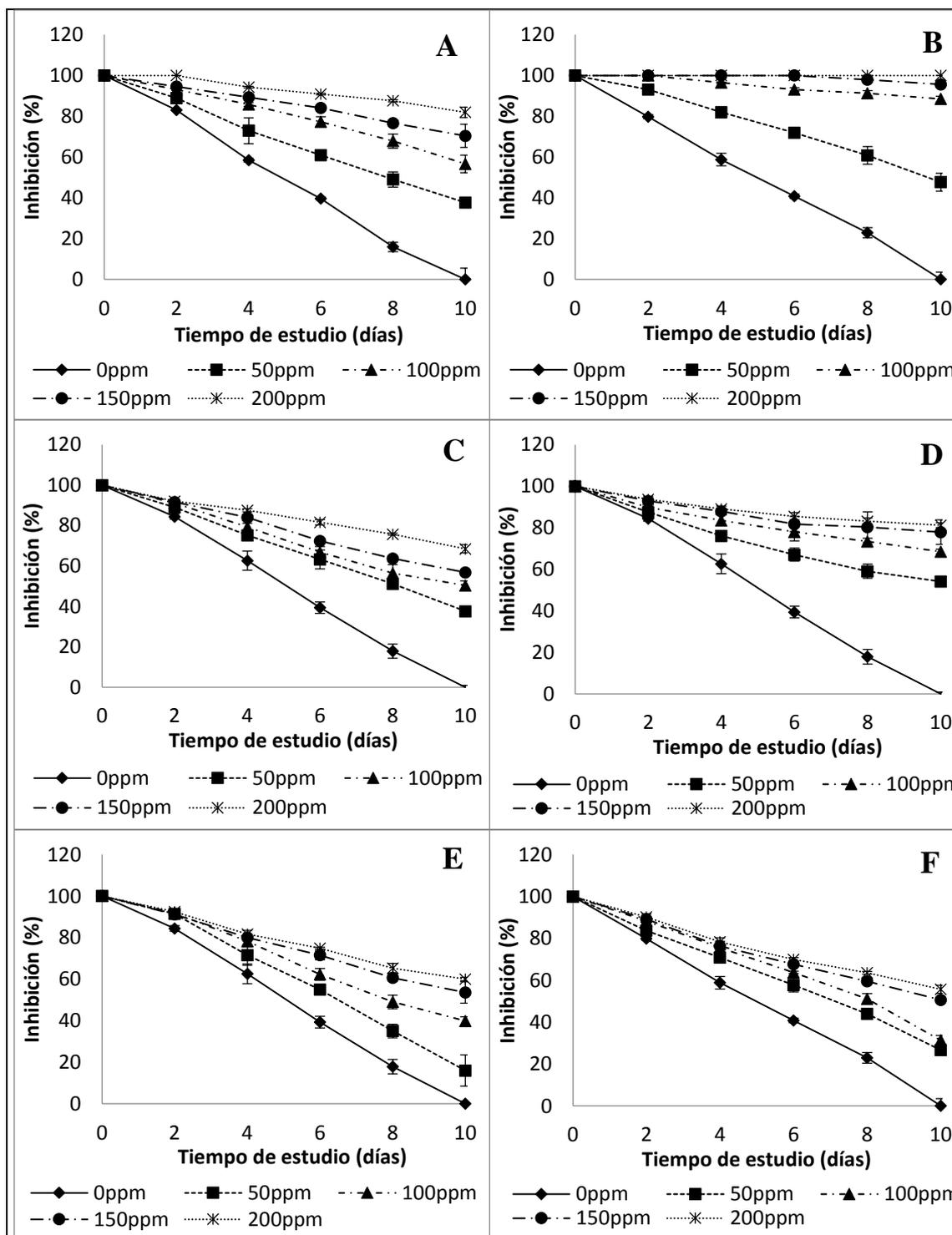


Figura 4.2. Inhibición de crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. con el uso de extractos etílicos a diferentes concentraciones. A) hojas de neem, B) hojas de guanábana, C) hojas de carqueja, D) carqueja completa, E) raíz de jengibre, F) hojas de marinheiro. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de 6 réplicas.

Con respecto a las concentraciones utilizadas, a 50 ppm el extracto que mayor efecto antifúngico mostró fue el extracto de carqueja completa, seguido del de hojas de guanábana, hojas de neem y carqueja y finalmente las hojas de marinheiro y la raíz de jengibre. Con las demás concentraciones (100, 150 y 200 ppm) el orden con respecto a su actividad antimicrobiana fue el siguiente: extracto de hojas de guanábana, carqueja completa, hojas de neem, hojas de carqueja, raíz de jengibre y hojas de marinheiro. Con hojas de guanábana se obtuvo un 100 % de inhibición y 81 % en carqueja completa a la concentración de 200 ppm. Estadísticamente se tuvo diferencia significativa tanto por la planta como por la concentración utilizada.

Algunos autores sugieren que la actividad antimicrobiana es efecto de los fenoles presentes en las plantas; sin embargo, en el presente trabajo se encontró que no necesariamente debe estar esta relación, ya que el extracto de marinheiro presentó al igual que el extracto de hojas de guanábana el mayor contenido de fenoles y su actividad del primero no correspondió dejándolo con la menor actividad antifúngica en comparación con las demás plantas estudiadas.

El uso de los extractos empleados principalmente de guanábana, jengibre y neem en el presente trabajo se han utilizado ampliamente en el control de bacterias (Chakotiya et al., 2017; Almaki et al., 2017; Pinto et al., 2017), pero no contra hongos. El efecto bactericida que estos extractos tienen es probablemente debido a su capacidad para formar complejos con proteínas solubles y extracelulares, generando una disrupción de la pared celular de los hongos. Otra posibilidad es la inhibición de rutas enzimáticas vitales, como el sistema enzimático P450 oxidasa-dependiente, mediante el bloqueo de las enzimas hidrolasas esteroides de esta ruta por los flavonoides presentes en el extracto de hoja de guayaba (Rodriguez et al., 2017; De Corato et al., 2017); o porque los terpenos están involucrados en el rompimiento de la membrana a través de los compuestos lipofílicos; o que los alcaloides se intercalan en la doble cadena del ADN y/o pueden penetrar la membrana plasmática combinándola y precipitando las proteínas protoplasmáticas y desnaturalizándolas y a que las lectinas y polipéptidos pueden formar canales iónicos en la membrana microbiana. Lo que provoca la inhibición de la germinación de los conidios y la inactivación de la síntesis de aminoácidos esenciales causada por la interferencia en las reacciones del fosfoenolpiruvato, la eritrosa-4-fosfato y el ácido shiquímico, lo cual favorece la producción de triptófano y disminuye la producción de fenilalanina o tirosina (Chakotiya et al., 2017; Pinto et al., 2017).

Los resultados antes descritos también se pueden observar en el Cuadro 4.1, en la que se muestra el seguimiento fotográfico del crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. a los 10 días de evaluación sometido a las diferentes concentraciones de diversos extractos etílicos.

Cuadro 4.1. Seguimiento fotográfico del crecimiento micelial de *Colletotrichum* sp. a los 10 días de evaluación sometido a las diferentes concentraciones de diversos extractos etílicos.

Concentración	Extracto					
	Neem (<i>Azadirachta indica</i>)	Guanábana (<i>Annona muricata</i>)	Marinheiro (<i>Guarea trichilioides</i>)	Carqueja (<i>Baccharis trimera</i>)	Carqueja completa (<i>Baccharis trimera</i>)	Gengibre (<i>Zingiber officinale</i>)
0						
50						
100						
150						
200						

4.6. CONCLUSIÓN

El extracto de hojas de guanábana presentó el mayor contenido de fenoles y también presentó la mayor actividad antimicrobiana sobre *Colletotrichum* sp., a una concentración de 200 ppm de este mismo extracto y se obtuvo el 100% de inhibición del mismo hongo, por lo que estas hojas son una fuente importante de compuestos bioactivos con el potencial como un agente antifúngico natural. Estos resultados podrían ser útiles para el desarrollo de nuevos biofungicidas inofensivos tanto para el hombre como para el ambiente y como una nueva fuente de control de *Colletotrichum* sp., en el manejo integrado de antracnosis.

4.7.LITERATURA CITADA

- Akeel R.A., Mateen A., Janardhan K., Gupta V.C. 2017. Analysis of anti-bacterial and antioxidative activity of *Azadirachta indica* bark using various solvents Extracts. Saudi Journal of Biological Sciences 24, 11-14. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2015.08.006>
- Almalki E., Al-Shaebi E.M., Al-Quarishy S., El-Matbouli M., Abdel-Baki A-A.S. 2017. In vitro effectiveness of *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* extracts on *Echinococcus* protoscoleces Saudi Journal of Biological Sciences 24, 90-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.05.007>
- Andrade S., Linardim.C.F., Assad R., Ladeira A.M. 1976. Inflammatory Action and Toxicity of *Guarecl trichilioides* L. in Rats. Toxicology and Applied Pharmacology 38, 39-46.
- Bustos A.V.G., Jiménez M.G., Mora R.M.S. 2017. The *Annona muricata* leaf ethanol extract affects mobility and reproduction in mutant strain NB327 *Caenorhabditis elegans*. Biochemistry and Biophysics Reports 10, 282-286. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.04.016>
- Brito S.H. Mezzomo J.A., Luna B.J., Barbosa L. M. do S., Takao M.A. 2004. Bioatividade de extratos vegetais aquosos sobre *Spodoptera frugiperda* em condições de laboratorio. Manejo Integrado de Plagas y Agroecología 71, 41-45.
- Cannon P.F., Damm U., Johnston P.R., Weir B.S. 2012. *Colletotrichum* – Current status and future directions. Studies in Mycology, 73: 181-213.
- Chakotiya A.S., Tanwar A., Narula A., Sharma R.K.2017. *Zingiber officinale*: Its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and mode of action evaluated by flow cytometry. Microbial Pathogenesis 107, 254-260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.029>
- Coria-Télez A.V., Montalvo-González E., Yahia E.M., Obledo-Vázquez E.N. 2016. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. Arabian Journal of Chemistry. In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>
- Cristo J.S., Matias E.F.F., Figueredo F.G., Santos J.F.S., Pereira N.L.F., Junior J.G.A.S., Aquino P.E.A., Nogueira M.N.F., Ribeiro-Filho J., Cunha F.A.B., Costa M.S., Campina F.F., Tintino S.R., Salgueiro C.C.M., Coutinho H.D.M. 2016. HPLC profile and antibiotic-modifying activity of *Azadirachta indica* A. Juss, (*Meliaceae*). Industrial Crops and Products 94, 903-908- <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2016.10.001>

- De Corato U., Salimbeni R., De Pretis A., Avella N., Patruno G. 2017. Antifungal activity of crude extracts from brown and red seaweeds by a supercritical carbon dioxide technique against fruit postharvest fungal diseases. *Postharvest Biology and Technology* 131, 16-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.04.011>
- Díaz de Cerio E., Gómez-Caravaca A.M., Verardo V., Fernández-Gutiérrez A., Segura-Carretero A. 2016. Determination of guava (*Psidium guajava* L.) leaf phenolic compounds using HPLC-DAD-QTOF-MS. *Journal of Functional Foods*, 22: 376–388. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2016.01.040>
- Dubey S. 2016. Comparative antimicrobial efficacy of herbal alternatives (*Emblica officinalis*, *Psidium guajava*), MTAD, and 2.5% sodium hypochlorite against *Enterococcus faecalis*: An in vitro study. *Journal of oral biology and craniofacial research*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.jobcr.2015.12.010>
- Fernandes M.R.V, Dias A.L.T., Carvalho R.R., Souza C.R.F., Oliveira W.P. 2014. Antioxidant and antimicrobial activities of *Psidium guajava* L. spray dried extracts. *Industrial Crops and Products*, 60: 39-44.
- Fernandes L.S., Duarte F.L., Ronie M.E., Faria de O. N.J., Robson D.E. 2013. Effect of aqueous extracts of *Baccharis trimera* on development and hatching of *Rhipicephalus microplus* (Acaridae) eggs. *Veterinary Parasitology* 194, 79-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.vetpar.2012.12.025>
- Ferreira Z.A.A., Isidoro H.C.W., Alberti A., Nogueira A., Mottin D.I., Granato D. 2014. A comparative study of the phenolic compounds and the in vitro antioxidant activity of different Brazilian teas using multivariate statistical techniques. *Food Research International* 60, 246-254. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2013.09.010>
- Florence N.T., Benoit M.Z., Jonas K., Alexandra T., Désiré D.D.P., Pierre K., Théophile D. 2014. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (Annonaceae), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats *Journal of Ethnopharmacology* 151, 784-790. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.021>
- Folin O. y Ciocalteu V. (1927). On tyrosine and tryptophane determinations in proteins. *The journal of biological chemistry*. LXXXIII (2): 627-650.
- Furlan M., Nasser L.M., Batista F.J., Rubens P.J. 1996. Diterpenes from *Guarea trichilioides*. *Phytochemistry*, 41 (4), 1159-1161.

- Gil-Ramírez A., Pavo-Caballero C., Baeza E., Baenas N., Garcia-Viguera C., Marín F.R., Soler-Rivas C. 2016. Mushrooms do not contain flavonoids. *Journal of Functional Foods*, 25: 1-13
- Han Y.C., Zeng X.G., Xiang F.Y., Ren L., Chen F.Y., Gu Y.C. 2016. Distribution and Characteristics of *Colletotrichum* spp. Associated with Anthracnose of Strawberry in Hubei, China. *Plant Disease*, 100(5): 996-1006. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-09-15-1016-RE>.
- Hu M-J., Grabke a., Schnabel G. 2015. Investigation of the *Colletotrichum gloeosporioides* species complex causing anthracnose fruit rot of peach in South Carolina. *Plant Disease*, 99:797-805. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-14-1076-RE>.
- Jang M., Jeong S-W., Cho S.K., Yang H.J., Yoon D-S., Kim J-C., Park K-H. 2014. Improvement in the anti-inflammatory activity of guava (*Psidium guajava* L.) leaf extracts through optimization of extraction conditions. *Journal of Functional Foods*, 10: 161-168. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jff.2014.06.006>
- Jiang J., Zhai H., Li H., Wang Z., Chen Y., Hong N., Wang G., Nchongboh Chofong G., Xu W. 2014. Identification and characterization of *Colletotrichum fructicola* causing black spots on young fruits related to bitter rot of pear (*Pyrus bretschneideri* Rehd.) in China. *Crop Protection*, 58: 41-48. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2014.01.003>.
- Kalidindi N., Venkataswamy T.N., Venkataramareddy J.N., Nandeeep R., Swetha S., Kalidindi B. 2015. Antifungal and antioxidant activities of organic and aqueous extracts of *Annona squamosa* Linn. Leaves. *Journal of Food and Drug Analysis* 23, 795-802. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfda.2015.04.012>
- Laily N., Kusumaningtyas R.W., Sukarti L., Kartika Rini M.R.D. 2015. The Potency of Guava *Psidium guajava* (L.) Leaves as a functional Immunostimulatory Ingredient. *Procedia Chemistry*, 14: 301-307.
- Liu F., Damm U., Cai L., Crous P.W. 2013. Species of the *Colletotrichum gloeosporioides* Complex associated with anthracnose diseases of *Proteaceae*. *Fungal Diversity*, 61:89–105. <http://doi10.1007/s13225-013-0249-2>.
- Liu N., Yang H.L., Wang P., Lu Y.C., Yang Y.J., Wang L., Lee S.C. 2016. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. *Journal of Ethnopharmacology* 189, 210-217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.045>

- Maeda C. y Nelson S. 2014. Anthracnose of Papaya in Hawaii. *Plant Disease*, 103: 1-6.
- Menezes A.P.S., da Silva J., Fisher C., da Silva F.R., Reyes J.M., Picada J.N., Ferraz A.G., Correa D.S., Premoli S.M., Dias J.F., de Souza C.T., Ferraz A.B.F. 2016. Chemical and toxicological effects of medicinal *Baccharis trimera* extract from coal burning area. *Chemosphere* 146, 396-404. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chemosphere.2015.12.028>
- Mesomo M.C., Corazza M.L., Ndiaye P.M., Dalla Santa O.R., Cardozo L., Scheer A. de P. 2013. Supercritical CO₂ extracts and essential oil of ginger (*Zingiber officinale* R.): Chemical composition and antibacterial activity. *J. of Supercritical Fluids* 80, 44-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.supflu.2013.03.031>
- Pinto N.C.C., Campos L.M., Evangelista A.C.S., Lemos A.S.O., Silva T.P., Melo R.C.N., de Lourenço C.C., Salvador M.J., Apolônio A.C.M., Scio E., Fabri R.L. 2017. Antimicrobial *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Industrial Crops & Products* 107, 332-340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.054>
- Rodríguez de J.D., Salas-Méndez E. de J., Rodríguez-García R., Hernández-Castillo F.D., Díaz-Jiménez M.L.V., Sáenz-Galindo A., González-Morales S., Flores-López M.L., Villarreal-Quintanilla J.A., Peña-Ramos F.M., Carrillo-Lomelí D.A. 2017. Antifungal activity in vitro of ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Flourensia* spp. against postharvest fungi. *Industrial Crops & Products*, In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.054>
- Sagwan, S, Rao, D.V., Sharma, R.A. 2012. In vivo and in vitro proportional antimicrobial activity in karanj (*Pongamiapinnata*): an imperative leguminous tree. In *International Research Journal of Pharmaceutical and Applied Sciences* 2(6), 981-95.
- Saini T.J., Gupta S.G., Char B.R., Zehr U.B., Anandalakshmi R. 2016. First report of chilli anthracnose caused by *Colletotrichum karstii* in India. *New Disease Report*, 34(6): X-X. <http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2016.034.006>.
- Santhosh S.B., Ragavendran C., Natarajan D., 2015. Spectral and HRTEM analyses of *Annona muricata* leaf extract mediated silver nanoparticles and its Larvicidal efficacy against three mosquito vectors *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 153, 184-190. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.09.018>

- Siddiqui Y. y Ali A. 2014. Chapter 11. *Colletotrichum gloeosporioides* (Anthracnose). In Postharvest Decay. Control Strategies. Editado por: Bautista-Baños S. Elsevier-Academic Press. Estados Unidos de América. 337-371. <https://books.google.com.mx/books?isbn=0124115683>.
- Soliman F.M., Fathy M.M., Salama M.M., Saber F.R. 2016. Comparative study of the volatile oil content and antimicrobial activity of *Psidium guajava* L. and *Psidium cattleianum* Sabine leaves. Bulletin of Faculty of Pharmacy, Cairo University. In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bfopcu.2016.06.003>
- Srinivasan K. 2017. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. Pharma Nutrition 5, 18-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2017.01.001>
- Sulaiman F.A., Kazeem M.O., Waheed A.M., Temowo S.O., Azeez I.O., Zubair F.I., Adeyemi T.A., Nyang A., Adeyemi O.S. 2014. Antimicrobial and toxic potential of aqueous extracts of *Allium sativum*, *Hibiscus sabdariffa* and *Zingiber officinale* in Wistar rats. Journal of Taibah University for Science 8, 315-322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.05.004>
- Sun S., Liu J., Sun X., Zhu W., Yang F., Felczak L., Ping Dou Q., Zhou K. 2017. Novel Annonaceous acetogenins from Graviola (*Annona muricata*) fruits with strong anti-proliferative activity. Tetrahedron Letters 58, 1895-1899. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.04.016>
- Tapia-Tussell R., Cortés-Velázquez A., Valencia-Yah T., Navarro C., Espinosa E., Moreno B., Perez-Brito D. 2016. First Report of *Colletotrichum magnum* Causing Anthracnose in Papaya in Mexico. Plant disease. Posted online. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-03-16-0324-PDN>.
- Tsofack F.N., Zibi B.M., Jonas K., Alexandra T., Paul D.D.D., Pierre K., Théophile D. 2014. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (*Annonaceae*), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats. Journal of Ethnopharmacology 151, 784-790. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.021>
- Velho A.C., Alaniz S., Casanova L., Mondorino P., Stadnik M.J., 2015. New insights into the characterization of *Colletotrichum* species associated with Apple diseases in southern Brazil and Uruguay. Fungal Biology, 1-6. <http://dx.doi.org/10.1016/j.funbio.2014.12.009>.

5. CAPITULO V. Tratamientos químicos, agentes de control biológico y extractos vegetales en postcosecha sobre la calidad y control de antracnosis en papaya cv. Sunrise de Brasil

Lira-Vargas A.A.¹, Rebouças-São José A.², Nieto-Ángel D.^{1*}; Suene de Jesus-Nolasco D.²

¹ Colegio de Posgraduados, Posgrado Fitosanidad-Fitopatología, Carretera México-Texcoco Km 36.5, Montecillo, Texcoco, 56230, Edo. de México.

² Universidade Estadual do Sudoeste da Bahia, Laboratório Biofábrica de Microrganismos. Estrada do Bem Querer, km 04, bairro Universidade, 95, 45031-900, Vitória da Conquista-Bahia, Brasil

*Autor de correspondencia: dnieto@colpos.mx

5.1.RESUMEN

La papaya es una fruta de gran importancia económica en Brasil, es vulnerable a la antracnosis, de la cual se han estudiado varias medidas de control. En este trabajo se evaluaron diversos tratamientos (Agentes de control biológico: *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, químico: azoxistrobin, cloruro de calcio, fosfito de potasio; extracto vegetal: extracto comercial de jengibre y de guanábana), en la calidad y control de antracnosis en papaya cv. Sunrise. El estudio tuvo dos fases: en la primera se seleccionaron los tres mejores tratamientos, uno de cada tipo (biológico, químico, extracto vegetal) en función de su efecto antifúngico sobre *Colletotrichum* sp. y en la segunda se evaluó el efecto postcosecha que cada tratamiento seleccionado sobre los parámetros de calidad (pérdida de peso, color, firmeza, sólidos solubles totales (SST), pH, acidez titulable (AT), contenido de ácido ascórbico (AA)). Como resultado de la primera fase se obtuvo que los tres mejores métodos de cada tipo para el control de antracnosis fueron: *T. longibrachiatum*, cloruro de calcio y extracto comercial de jengibre, con los que se disminuyó un 67, 42 y 60 % el menor índice de severidad, respectivamente con respecto al control. En la segunda fase, *T. longibrachiatum* mantuvo significativamente menor pérdida de peso, además se preservó por mayor tiempo el color, permitió mantener la mayor firmeza. En los demás parámetros (pH, SST, AT, AA) no se mostró significancia entre los diferentes métodos evaluados. Se concluye que el control biológico es un método prometedor para controlar antracnosis en papaya cv. Sunrise.

Palabras clave: Extracto vegetal, Actividad antifúngica, *Colletotrichum gloeosporioides*.

5.2. ABSTRACT

Papaya is a fruit of great economic importance in Brazil, but it is vulnerable to anthracnose, from which a number of control measures have been studied. In this work, several treatments (Biological control agents: *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, chemical: azoxystrobin, calcium chloride, potassium phosphite, vegetable extracts: commercial extract of ginger and guanabana) were evaluated. the quality and control of anthracnose in papaya cv. Sunrise. The study had two phases: in the first one the three best treatments were selected, one of each type (biological, chemical, vegetal extract) as a function of its antifungal effect on *Colletotrichum* sp. (weight loss, color, firmness, total soluble solids (SST), pH, titratable acidity (AT), ascorbic acid (AA) content), and in the second, the post-harvest effect of each selected treatment on the quality parameters. As a result of the first phase it was obtained that the three best methods of each type for anthracnose control were: *T. longibrachiatum*, calcium chloride and commercial extract of ginger, with which a 67, 42 and 60% lower index was decreased of severity, respectively with respect to the control. In the second phase, *T. longibrachiatum* maintained significantly less weight loss, kept the color longer, caused the greatest firmness. In the other parameters (pH, SST, AT, AA) no significance was shown between the different methods evaluated. We conclude that biological control is a promising method to control anthracnose in papaya cv. Sunrise.

Key words: Vegetable extract, Antifungal activity, *Colletotrichum gloeosporioides*.

5.3.INTRODUCCIÓN

La papaya (*Carica papaya* L.) es una fruta importante cultivada en áreas tropicales y subtropicales (Hewajulige, 2016). La India es el principal país productor de papaya, mientras que Brasil ocupa el segundo lugar, proporcionando el 44% y el 12.5% de la producción total, respectivamente (FAOSTAT, 2014). Esta fruta tiene una importante actividad antioxidante y su consumo proporciona beneficios para la salud, particularmente por sus propiedades medicinales, y una mejor digestión. El cultivar ha ganado popularidad en el mercado local y de exportación (Annegowda y Bhat, 2016). Sin embargo, debido a que la papaya es una fruta climatérica, sufre algunos problemas como maduración rápida y susceptibilidad al estrés biótico y abiótico. El ablandamiento

relacionado con la maduración hace que este tipo de fruta sea vulnerable a una amplia gama de enfermedades postcosecha, incluyendo la antracnosis (Maeda y Nelson, 2014). La antracnosis es una enfermedad causada por *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz & Sacc. que provoca grandes pérdidas económicas, ya que afecta a la producción y comercialización de la papaya, es uno de los patógenos más devastadores en almacenamiento para la papaya. Los síntomas de la antracnosis en la papaya se caracterizan por lesiones depresivas pardas y, en algunos casos, áreas de color salmón formadas por las masas de conidios que cubren la lesión (Maeda y Nelson, 2014; Ayon-Reyna et al., 2017)

En la actualidad, las medidas de control de la antracnosis en los productos frescos durante las prácticas anteriores y posteriores a la cosecha se basan principalmente en productos químicos sintéticos (Kilani-Feki et al., 2016; Ayon-Reyna et al., 2017; Calvo et al., 2017). Los fungicidas más recientes, pirimetanil (scala 400, Bayer), fludioxonil (Switch 62.5, Syngenta) y azoxistrobina (Amistar, Syngenta), difenoconazol (Score, Syngenta) y combinaciones de azoxistrobina con difenoconazol (Amistar TOP, Syngenta), que se clasifican como compuestos de riesgo reducido, fueron aprobados por la EPA de los Estados Unidos para el uso posterior a la cosecha en varias frutas (Wang et al., 2016; Cerioni et al., 2017; Craven et al., 2017; Watson et al., 2017).

El uso de productos químicos es cada vez más problemático debido a la legislación más estricta (Dir. 91/414 / CEE) ya la creciente presión pública resultante de sus riesgos toxicológicos para la salud humana (Dir. 2009/128 / CE), especialmente la salud de los niños (US National Research Council) y la posible contaminación ambiental. Otro factor limitante para la aplicación de productos químicos es el desarrollo de cepas resistentes a los fungicidas para los principales hongos fitopatógenos. En consecuencia, los investigadores están buscando actualmente métodos alternativos no tóxicos, seguros, biodegradables y eficaces para controlar las enfermedades postcosecha, conservando la calidad física y nutricional (Ayon-Reyna et al., 2017; Calvo et al., 2017; Gotor-Vila et al., 2017; Siamoshteh et al., 2017).

Otro método químico para controlar las enfermedades postcosecha es el uso de sales de calcio. Se ha informado que el calcio mantiene la estructura de la pared celular al interactuar con la pectina para producir complejos de pectato de calcio, lo que puede mantener la firmeza del fruto y reducir la accesibilidad de los patógenos fúngicos (Ayon-Reyna et al., 2017). Algunos informes han demostrado que el calcio es antagonista de C.

gloeosporioides y puede ser utilizado como un tratamiento alternativo para el control de la enfermedad (Madani et al., 2014).

El uso de fosfito de potasio (KPhi) es otro método de control químico, aunque en la agricultura es un fertilizante y activador de resistencia natural o resistencia sistémica. KPhi se transloca tanto en los tejidos de xilema como del floema, actúa sobre el patógeno mediante la estimulación de respuestas de defensa del hospedante para inhibir el crecimiento y alterar el metabolismo del patógeno, también puede inducir la acumulación de moléculas de defensa como la fitoalexina, que se produce como sustancia química defensiva para la resistencia a enfermedades y para superar el ataque de patógenos (Liljeroth et al., 2016; Ramezani et al., 2017), especialmente a patógenos de plantas pertenecientes a los géneros *Peronospora*, *Phytophthora*, *Plasmopara* y *Pythium*. Además, el control de patógenos fúngicos como *Alternaria* y *Penicillium* también ha sido reportado en varios estudios (Martinez, 2016). Recientemente, también se consideró que el fosfito era un buen ajuste en el manejo integrado de las enfermedades postcosecha debido a sus fuertes actividades antimicrobianas, menos toxicidad ambiental y menores costos de producción (Lai et al., 2017).

En los últimos años, el comercio mundial de productos agrícolas se ha convertido en un método ecológico para la producción de cultivos debido a su naturaleza menos tóxica, bajos niveles de resistencia a enfermedades y bajos problemas de residuos. El control biológico de plagas y enfermedades es el método más eficiente y responsable para mantener los cultivos libres de plaguicidas (Osouli y Afsharmanesh, 2016).

El control biológico, que incluye el uso de microorganismos antagonistas (BCAs: agentes de control biológico) como levaduras (*Pichia* spp.), hongos (*Trichoderma* spp., *Candida* spp.) y bacterias (*Bacillus* spp., *Pseudomonas* spp., *Streptomyces* spp.), ha sido una alternativa prometedora a los fungicidas sintéticos, ya que es más seguro para la salud humana y el ecosistema (Chen et al., 2016; Calvo et al., 2017; Fan et al., 2017). Los BCA son microorganismos seguros que se pueden encontrar ubicuos en el medio ambiente, presentan versatilidad en la protección de las plantas contra la infección por patógenos y tienen excelentes habilidades para colonizar y esporular; los mecanismos de biocontrol de BCAs implican la capacidad para producir diversos metabolitos tales como antibióticos, lipopéptidos, enzimas que degradan las paredes celulares, compuestos volátiles, colonización, competencia de nutrientes y el fenómeno de resistencia sistémica inducida (ISR) en las plantas hospedantes (Chen et al., 2016; Kilani-Feki et al., 2016). El

antagonista ideal debe tener ciertas características, como la estabilidad genética, la eficacia a bajas concentraciones frente a una amplia gama de patógenos en los productos frutales, las necesidades nutricionales simples, la supervivencia en condiciones ambientales adversas, el crecimiento en sustratos baratos en fermentadores, la falta de patogenicidad para el hospedante-planta y falta de toxigenicidad para los seres humanos, resistencia a los pesticidas más utilizados y compatibilidad con otros tratamientos químicos y físicos (Siamoshteh et al., 2017).

Otros métodos que se están utilizando en la actualidad, son los extractos de hierbas de varias plantas han sido evaluados como un método alternativo contra los hongos fitopatógenos, debido a sus efectos nocivos mínimos contra el medio ambiente (Wianowska et al., 2016; De Corato et al., 2017; Jasso de Rodriguez et al., 2017). El jengibre (*Zingiber officinale Roscoe*) es una planta que pertenece a la familia *Zingiberaceae* y es ampliamente utilizado en la producción de alimentos, en productos tales como mermeladas, encurtidos, chutneys, bebidas y productos de panadería, así como en otros sectores industriales. Su rizoma es un ingrediente común en la medicina popular como anti-inflamatorio, antiemético, antitumoral, analgésico, anti-hemorrágico, protector de células neuronales, anti-reumática, antimicóticos (Srinivasan, 2017) y agente antibacteriano (Sulaiman et al., 2014; Almaki et al., 2017; Chakotiya et al., 2017). *Annona muricata* L., también conocida como graviola y guanábana, es un árbol de hoja perenne que se ve en las zonas tropicales y subtropicales. Los frutos de la planta son comestibles y se utilizan para preparar jarabes, dulces, bebidas, helados y batidos. La planta se ha utilizado durante mucho tiempo en diferentes países como tratamiento etnomedicinal para diversas afecciones que incluyen cistitis, fiebre, dolores de cabeza, insomnio, reumatismo, trastornos gastrointestinales, hipertensión, e infección por parásitos (Coria-Tellez et al., 2016; Liu et al., 2016). Actualmente tiene las propiedades para tratar el cáncer (Liu et al., 2016; Sun et al., 2017), la diabetes (Florence et al., 2014), infecciones virales (Florence et al., 2014; Pinto et al., 2017), tiene actividad antimicrobiana (Pinto et al., 2017), nematicida (Bustos et al., 2017), larvicida (Santhos et al., 2015).

Debido a lo antes mencionado, el objetivo principal de este estudio fue comparar diversos tratamientos (BCAs: *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, químico: azoxistrobin, cloruro de calcio, fosfito de potasio; extractos vegetales: extracto comercial de jengibre y de guanábana), en la calidad

y control de antracnosis en papaya. El estudio fue seleccionar los tres mejores tratamientos, uno de cada tipo (BCAs, químico, extractos vegetales) en función de su efecto antifúngico sobre *Colletotrichum* sp. y evaluar el efecto postcosecha que cada tratamiento seleccionado sobre los parámetros de calidad.

5.4.MATERIALES Y MÉTODOS

5.4.1. Aislamiento de *Colletotrichum* sp.

El aislamiento del hongo se realizó con el método de aislamiento monospórico con la técnica de diluciones sucesivas, cuando los frutos presentaban los síntomas con abundante masa de esporas. El método consistió en colocar la masa de esporas que quedó en una aza de siembra en 2 mL de agua destilada estéril, sucesivamente se hicieron dos diluciones más, donde los conidios fueron contables (10-20 conidios/mL) con la ayuda de un microscopio empleando objetivos de 4x y 10x posteriormente se depositaron en una caja Petri con medio agar papa dextrosa (PDA), las cajas se incubaron a 28 °C por 24-48 h, el conidio germinado y monoconidial se transfirieron a nuevas placas de PDA y se hicieron crecer durante 10 días a 28 °C.

5.4.2. Material biológico

Los frutos de papayas cv. Sunrise en estado de maduración ¼ verde procedentes de Espírito Santo-Brasil se obtuvieron en la Central de Abastecimiento CEASA del municipio de Vitória da Conquista-BA, Brasil. Los frutos fueron llevados al Laboratorio da Biofábrica-UESB, campus Vitória da Conquista-BA, donde se lavaron (agua y jabón), desinfectaron (cloro a 200 ppm), enjuagaron (agua estéril) y secaron (toallas estériles).

5.4.3. Efecto antifúngico

Para evaluar el índice de severidad, se utilizaron 55 frutos a los que se les marcaron cinco círculos, para dar un total de 25 réplicas por cada tratamiento, a cada círculo se le colocaron 50 µL de solución de esporas de $60 \pm 10 \times 10^4$ esporas de *Colletotrichum* sp./mL, después de la inoculación los frutos se incubaron (24 h a 25 °C en cámara húmeda), después los frutos se dividieron en lotes de cinco y fueron sometidos a los diversos tratamientos (Cuadro 5.1). Todos los tratamientos fueron expuestos por inmersión por cinco min, se dejaron secar y se almacenaron a 20 ± 2 °C por cinco días. El índice de severidad se determinó con el uso de una escala de seis puntos (0-no dañado, 1: $1 > 20\%$,

2: 20>40%, 3: 40>60%, 4: 60>80, 5: 80>100, 6: 100% de daño (Zavala-León y Jairo-Cristóbal, 2012).

Cuadro 5.1. Tratamientos aplicados a papaya para el control de antracnosis.

Tratamiento	Nombre, Marca	Cantidad aplicada
Testigo	Agua	2L
Agente de control biológico		
<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Biofungi	5g/L
<i>Trichoderma harzianum</i>	Biofungi	5g/L
<i>Bacillus subtilis</i>	Serenade (Bayer)	1mL/L
<i>Bacillus amyloliquefaciens</i>	Eficaz Premium (Simbiose Agrotecnología biológica)	1mL/L
Químico		
Azoxistrobin	Amistar® (Syngenta)	2g/L
Fosfito de potasio	Fitasio, Aginovasiencie	200mL/L
Cloruro de calcio	Cloruro de calcio, Dihidratado (Vetec)	20g/L
Extractos vegetales		
Extracto de jengibre	Extracto de jengibre (Bom mel)	1mL/L
Extracto de guanábana	Extracto de graviola (Bom mel)	1mL/L

5.4.4. Parámetros de calidad

Una vez concluida la parte de la severidad de la enfermedad y seleccionado los tres mejores tratamientos de cada tipo, nuevamente se adquirieron los frutos en el mismo lugar y de la misma procedencia, los frutos nuevos fueron tratados igual que los anteriores frutos, a excepción de que no fueron inoculados e incubados con el hongo de *Colletotrichum* sp. ya que de esta fase sólo se quería ver el efecto en los parámetros de calidad. Los parámetros evaluados fueron: la pérdida peso fue evaluada con una balanza semianalítica (50010, A&D Co, Japón), expresando los resultados como porcentaje de pérdida de peso (%); la determinación del color se llevó a cabo con un colorímetro (CM-400, Konica Minolta) mediante el sistema Hunter Lab, reportando valores de luminosidad (L) croma y tono (°hue); la firmeza se determinó con un penetrómetro (Fruit firmnes tester, Tr, Italia) expresando los resultados en Newtons (N); los sólidos solubles totales se midieron con un refractómetro digital (r² mini, Reichert, Japón), los resultados se expresaron en °Brix; el pH medido con el potenciómetro (pH21, Hanna, Rumania); la acidez titulable se determinó con el método de titulación directa con NaOH 0.1N, utilizando fenolftaleína como indicador, expresando los resultados en mg de ácido

cítrico/100g de peso fresco; el contenido de ácido ascórbico se cuantificó con un método volumétrico, con la titulación de ácido ascórbico presente en la muestra con 2-6 dicloindofenol, el resultado se expresó en mg de ácido ascórbico/100 g de muestra (AOAC, 1999).

5.4.5. Análisis estadístico

El estudio de la severidad de la enfermedad en los frutos de papaya se analizó mediante un diseño de bloques completamente al azar. La diferencia entre tratamientos se determinó mediante un análisis de varianza (ANOVA) y una separación de medias mediante la prueba de comparación múltiple de Tukey con una probabilidad de error del 5% con el programa estadístico SISVAR versión 13.1

5.5.RESULTADOS Y DISCUSIÓN

5.5.1. Efecto antifúngico

El índice de severidad, indicó que los tratamientos biológicos tuvieron mejor control contra *Colletotrichum* sp., seguido de los tratamientos con extractos vegetales y finalmente los químicos (Figura 5.1). En el tratamiento biológico el mejor agente fue *Trichoderma longibrachiatum* y *Bacillus subtilis*, los cuales no presentaron diferencia significativa entre ellos, presentando 67% menos índice de severidad con respecto al testigo, por otra parte, tampoco presentaron significancia entre *Bacillus amyloliquefaciens* y *Trichoderma harzianum*, mostrando 50% menos severidad que el testigo.

Resultados obtenidos en el presente trabajo son consistentes con los encontrados por Landero-Valenzuela et al., (2015), Abdelrahman et al., (2016), De Souza et al., (2016), que trabajaron con *T. longibraquiatum* contra *Colletotrichum gloeosporioides* en papaya, *Fusarium oxysporum* en cebolla y *Fusarium guttiforme* en piña, respectivamente. También fueron similares a los reportados por Ben Khedher et al., (2015), Waewthingrak et al., (2016) y Fan et al., (2017), que trabajaron con *Bacillus subtilis* contra *Rhizoctonia solani* en papa, *Penicillium digitatum* en cítricos y *Botryosphaeria* en manzana, respectivamente. A pesar de que los resultados hayan mostrado que *Bacillus amyloliquefaciens* y *Trichoderma harzianum* tuvieron menor eficacia sobre el control de *Colletotrichum*, en estudios como el de Calvo et al., (2017), Gotar-Vila et al., (2017) y Masmoudi et al., (2017) se ha comprobado el efecto benéfico que *Bacillus*

amyloliquefaciens tiene sobre diversos hongos en postcosecha, *Monilinia* en cereza y *Botrytis cinerea* en tomate, respectivamente. También el efecto positivo de *Trichoderma harzianum* se ha demostrado en los trabajos de You et al., (2016), Ben Amira et al., (2017) y Zhang et al. (2017), contra *Botrytis cinerea* en tomate, *Fusarium solani* en oliva y *Fusarium oxysporum* en soya, respectivamente.

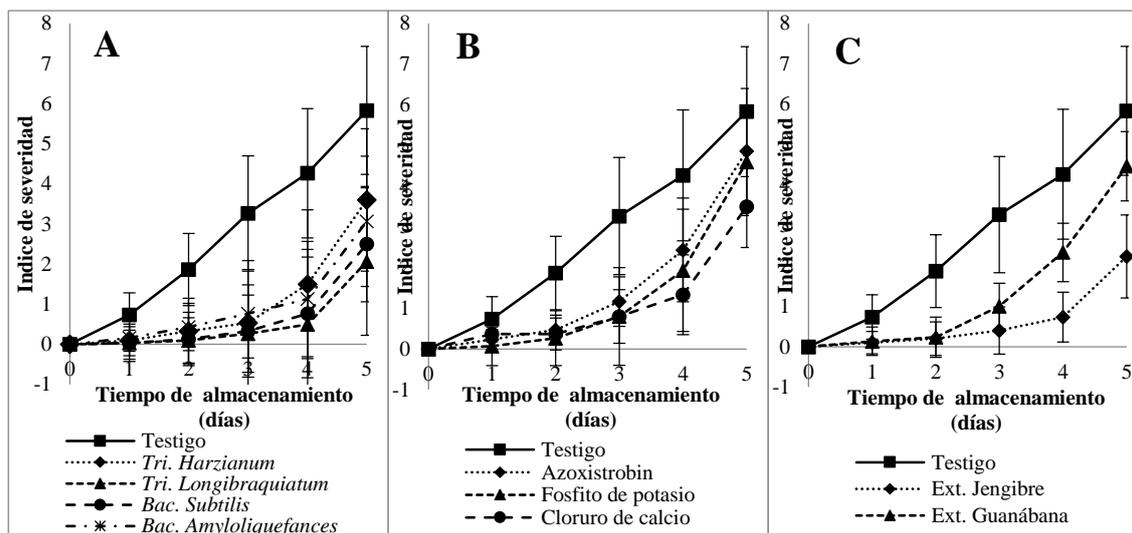


Figura 5.1. Efecto de diversos agentes en diferentes tratamientos, A) Agentes de control biológico: *Trichoderma longibrachiatum*, *Trichoderma harzianum*, *Bacillus subtilis*, *Bacillus amyloliquefaciens*, B) químico: azoxistobin, cloruro de calcio, fosfito de potasio; C) extractos vegetales: extracto comercial de jengibre y de guanábana, sobre el índice de severidad en frutos de papaya cv. Sunrise ocasionado por *Colletotrichum* sp.

La actividad antagonista de las cepas de *Trichoderma* está generalmente relacionada con la actividad de enzimas hidrolíticas de degradación de la pared celular extracelular de los hongos, especialmente las celulasas, proteasas, quitinasas y glutanasas. Estas enzimas están estrechamente relacionadas con el micoparasitismo y, por otro lado, están contribuyendo a la resistencia sistémica inducida por el hospedante-hospedante (ISR) a la infección por patógenos, al competir por el espacio y los nutrientes, e inhibir y / o parasitar a los patógenos usando antibióticos altamente fungitóxicos (Saravanakumar et al., 2016; You et al., 2016). Además, *Trichoderma* spp. exhibe habilidades biostimulantes, induciendo mecanismos de resistencia de plantas y desarrollo de raíces y crecimiento de plantas. Se supone que el reconocimiento de plantas de *Trichoderma* desencadena la activación de una señal en cascada que a su vez activa una variedad de respuestas de defensa, incluyendo la secreción de especies de oxígeno reactivo antimicrobiano (ROS), numerosos metabolitos secundarios tales como fitoalexinas y proteínas relacionadas con la patogénesis, deposiciones calosas y el posible desarrollo de

un tipo de muerte celular programada (PCD) conocida como respuesta hipersensible (HR) (Landro-Valenzuela et al., 2015; Abdelrahman et al., 2016; De Souza et al., 2016; Saravanakumar et al., 2016; Zhang et al., 2017). Los productos de *Trichoderma* utilizados son: Binab TF basado en la mezcla de *T. harzianum* y *T. polysporum* (Binab Bio Innovación AB), Mu-Mei-Su basado en *T. viride*, Sentinel basado en *T. atroviride* (Novozymes), y Supresivit (Borregaard Bioplant) y Trichodex (Makhteshim Agan de Norteamérica, EE.UU.) basados en *T. harzianum* (You et al., 2016).

El mecanismo de acción de *Bacillus* contra patógenos, incluye antibiosis, competencia de nutrientes, sitios de exclusión e infección, parasitismo y/o inducción de resistencia sistémica en la planta hospedante, producción de volátiles, lipopéptidos, biosurfactantes, quitinasa, quitosanas y otras enzimas que interactúan con los fosfolípidos en las membranas y alteran así la estructura y permeabilidad de la membrana celular de hongos (Chen et al., 2016; Kilani-Feki et al., 2016; Osouli y Afsharmanesh, 2016; Calvo et al., 2017; Fan et al., 2017; Gotor-Vila et al., 2017). *Bacillus* también es capaz de producir algunos policétidos con alta actividad antifúngica, tales como difcultidina y bacilisin (Calvo et al., 2017). Los antagonistas suprimen la producción de aflatoxina disminuyendo el crecimiento de hongos, las especies de *Bacillus* son capaces de degradar la aflatoxina a sustancias no tóxicas secretando enzimas oxidativas tales como la lacasa que puede escindir el anillo de lactona de la aflatoxina (Siamoshteh et al., 2017). *B. subtilis* es la especie más utilizada contra las enfermedades de las plantas y el 4% del 5% de su genoma está dedicado a la producción de antibióticos. Algunas cepas se han empleado para desarrollar productos comerciales tales como Subtilex® (*B. subtilis* MBI 600, BASF), registrado en los EE.UU. por la EPA y utilizado para el control de enfermedades de frutas, hierbas y vegetales; Serenade® Max (*B. Subtilis* QST 713, AgraQuest Inc., California, EE.UU. y BASF, Ludwigshafen, Alemania), actualmente registrado para el uso contra *B. cinerea*, *Pseudomonas spp.*, *Sclerotinia spp.*, *Venturia spp.* y *Monilinia spp.* Por otro lado, en más de 20 países de Europa, África, Oriente Medio, Asia y América Latina. *B. amyloliquefaciens*, estrechamente relacionado con *B. subtilis*, ya que tiene el 8,5% de su genoma, tiene productos como Taegro® (*B. amyloliquefaciens* FZB24); Novozymes (Copenhague, Dinamarca) y Syngenta (Basilea, Suiza), recomendados para suprimir enfermedades seleccionadas del suelo y foliares de frutas y hortalizas de hojas, cucurbitáceas y plantas ornamentales por la EPA (Calvo et al., 2017).

En el tratamiento químico, el cloruro de calcio tuvo 47% menos índice de severidad con respecto al testigo y presentó diferencia con respecto a fosfito de potasio y azoxistrobin que sólo tuvieron 17% menor índice de severidad y no presentaron diferencia entre ellos.

El efecto que tuvo el cloruro de calcio, es porque el calcio es un nutriente clave de las plantas que tiene un papel importante en las funciones celulares, incluyendo la reducción del ablandamiento y la senescencia de las frutas (Irfan et al., 2013; Madani et al., 2014). Los iones de calcio pueden formar enlaces cruzados de puente salino que evitan la acción de enzimas degradantes de la pared celular, la firmeza de la fruta (Ayon-Reyna et al., 2017). Madani et al. (2014) sugirió que el calcio reduce la antracnosis en la papaya debido a un efecto tóxico, ya que altas concentraciones de calcio extracelular pueden aumentar el nivel de calcio en el citosol, afectando el balance osmótico de las células fúngicas. En la postcosecha de la papaya, hay algunos informes que evidencian que el calcio es antagonista sobre la enfermedad de la antracnosis, y que éste podría tener un uso potencial como un método alternativo en el manejo integrado de la enfermedad (Madani et al., 2014, Ayon-Reyna et al., 2017). También se ha reportado que el cloruro de calcio ha sido eficaz en la calidad de higo (*Ficus carica* L.) y manzana (Infan et al., 2013; Gago et al., 2016).

Los resultados obtenidos con el uso de fungicida comercial (Amistar®) fueron contrarios a los encontrados por Gillard y Ranatunga (2013), quienes encontraron que este producto reduce la severidad de la antracnosis en frijol seco, a los de Wang et al. (2016); Cerioni et al. (2017); Tomazoni et al. (2017) y Watson et al. (2017), quienes también evidenciaron la eficacia del producto contra *Alternaria alternata* en tabaco, *Diplodia* y *Phomopsis* en limón, *Alternaria solani* et tomate y *Cercospora* en zanahoria, respectivamente. El modo de acción de las estrobilurinas es a través de la inhibición de la respiración mitocondrial bloqueando la transferencia de electrones en el complejo citocromo bc1 en el hongo, aunque también se han registrado casos de resistencia a enfermedades fúngicas causadas por *Alternaria*, *Didymella*, *Mycosphaerella spp.* entre otros (Watson et al., 2017). En otros trabajos también se ha reportado que la aplicación de azoxistrobina mejora de la resistencia del tallo y del retraso de la senescencia en el sorgo (Craven et al., 2017).

El uso de fosfito de potasio en el presente trabajo evidencio su poco efecto contra la antracnosis en papaya, resultados contradictorios a los encontrados por Liljerath et al., (2016) que evaluaron KPhi contra *Phytophthora infestans* en papa, Martinez et al. (2016) contra enfermedades en arroz, Lai et al. (2017) *Penicillium expansum* en manzana y

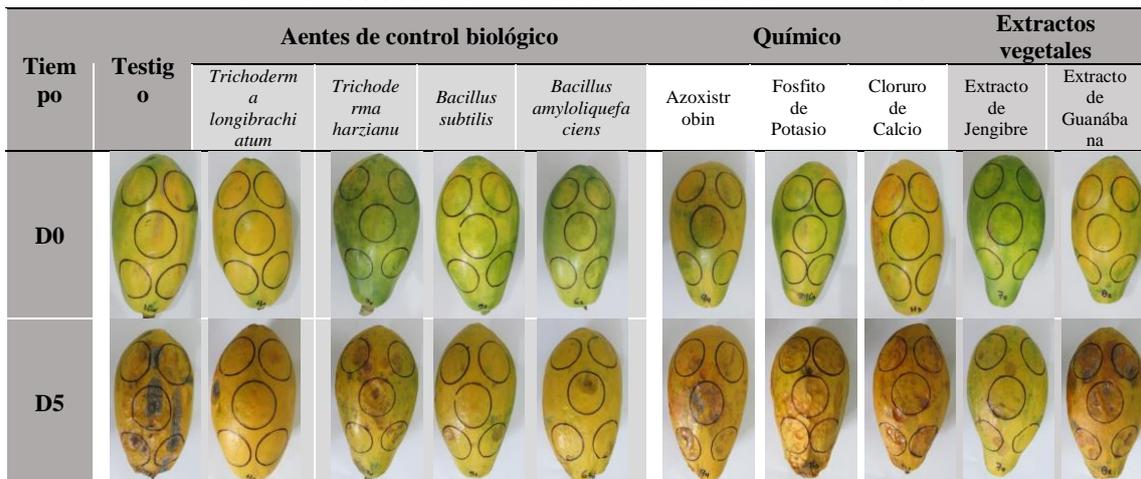
Romezani et al. (2017) contra *Pseudomonas cubensis* en pepino. Las sales de fosfitos son inductores de resistencia sistémica adquirida en muchas especies de plantas, tienen efectos fungicidas contra diferentes patógenos principalmente de la clase Oomycetes, aunque con menos éxito que con los fungicidas convencionales, aunque podría haber sinergismo entre las sales de fosfito y los fungicidas o rendimientos similares (Martinez, 2016). Los modos de acción de los fosfitos son muy complejos y todavía poco conocidos, pero ocasionan indirectamente la inducción de respuestas de defensa a través de su efecto sobre el patógeno como la deposición de callosa y la producción de peróxido de hidrógeno. Aunque también pueden provocar la inhibición del crecimiento del patógeno causando cambios morfológicos en la pared de la hifa del mismo (Lai et al., 2017; Ramezani et al., 2017).

Con respecto al tratamiento de extractos vegetales, el extracto de jengibre presentó 60% menos índice de severidad con respecto al testigo y presentó diferencia con respecto al extracto de guanábana que tuvo 20% menor índice de severidad.

El uso de los dos extractos empleados en el presente trabajo se han utilizado ampliamente en el control de bacterias (Sulaiman et al., 2014; Chakotiya et al., 2017; Almaki et al., 2017; Pinto et al., 2017), pero no contra hongos. El efecto bactericida que estos extractos tienen es por la presencia de los flavonoides, terpenoides, alcaloides, taninos, saponinas, antraquinonas y compuestos fenólicos que estos contienen, ya que afectan la permeabilidad de la membrana bacteriana, así como a la actividad de reflujo de las células bacterianas (Chakotiya et al., 2017; Pinto et al., 2017). Sin embargo, Jasso de Rodriguez et al., (2017) reportó el efecto antifúngico de extractos de las raíces y las hojas de *Flourensia* spp. contra *Fusarium oxysporum* y *Rhizopus stolonifer*, así mismo De Corato et al., (2017) evaluó extractos de *Laminaria digitata*, *Undaria pinnatifida*, *Porphyra umbilicalis*, *Eucheuma denticulatum* y *Gelidium pusillum* contra *Botrytis cinerea*, *Monilinia laxa* y *Penicillium digitatum*. El efecto antifúngico también se lo atribuyen a los compuestos fenólicos presentes en los extractos, ya que estos compuestos producen una inhibición enzimática por su oxidación y los taninos que inhiben la síntesis de proteínas en la célula.

Los resultados antes descritos también se pueden observar en el Cuadro 5.2, en la que se muestra el seguimiento que se tuvo del día inicial del estudio hasta los cinco días que acabo.

Cuadro 5.2. Seguimiento fotográfico del control de *Colletotrichum* sp. con diferentes tratamientos sobre el índice de severidad de antracnosis.



5.5.2. Parámetros de calidad

5.5.2.1. Pérdida de peso

La pérdida de peso es la pérdida de humedad del fruto y es el resultado del déficit de presión de vapor entre la atmósfera menos saturada y el fruto, que está cerca de la saturación con agua y en el presente trabajo se observó que la pérdida de peso estuvo en ascenso durante el tiempo de almacenamiento al igual que en el trabajo de Ali et al., (2011). A los diez días de evaluación se observó una pérdida de peso del 10% en papayas testigo, mientras que las que fueron tratadas con cloruro de calcio y extracto de jengibre tuvieron 10% más pérdida que las testigos, sin mostrar diferencia significativa ($P \geq 0.05$) entre ellas. Mientras que los frutos tratados con *Trichoderma longibrachiatum* mostraron significativamente 13% menos pérdida que los testigos (Figura 5.2).

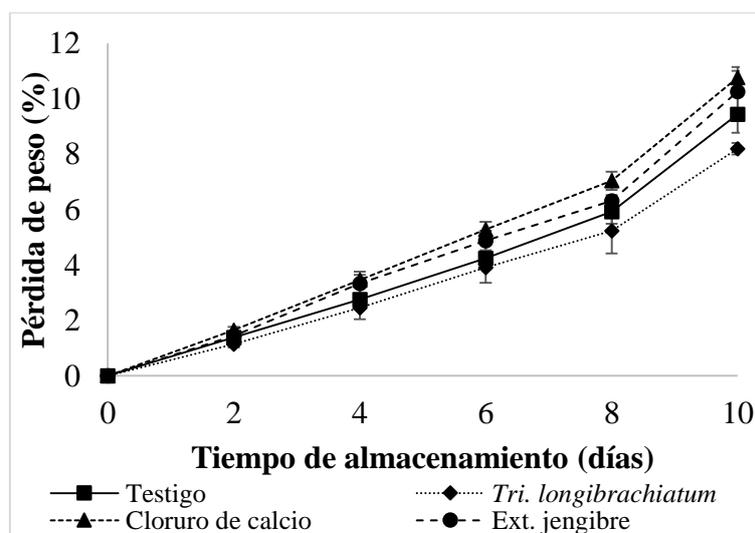


Figura 5.2. Firmeza de los frutos de papaya cv. Sunrise sometida a diversos tratamientos postcosecha (*Trichoderma longibrachiatum*, cloruro de calcio, extracto de

jengibre) durante su almacenamiento a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 85% de HR. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de ocho réplicas.

La transpiración es un factor crucial para preservar la fruta, una gran pérdida de peso en relación al peso inicial deprecia el valor de la apariencia de los frutos, debido a que presentan una superficie arrugada. La papaya se comercializa por unidad de peso, y la pérdida de peso en la misma resulta en menor rendimiento. La pérdida de peso por encima del 5 % es suficiente para el deterioro de las papayas y con frecuencia esta pérdida es negligencia de la cadena de comercialización (Irfan et al., 2013).

5.5.2.2. Color

La luminosidad también llamada claridad mostró una tendencia ascendente con respecto al tiempo de estudio en todos los tratamientos aplicados (Figura 5.3a). Las papayas testigo, tratadas con cloruro de calcio y extracto de jengibre mostraron su máxima luminosidad a los ocho días de evaluación ($L = 72.5$), para después declinar a los diez de estudio ($L = 68$), sin presentar diferencia significativa, indicando con este descenso el inicio de la senescencia de los frutos evaluados, mientras que las frutas tratadas con *T. longibrachiatum* mostraron significativamente 13% menos luminosidad que las papaya testigo a los ocho días de evaluación, con lo que se indicó que se retrasó la maduración. Otro parámetro de color fue el croma, el cual es el grado de diferencia existente entre un color y un gris, lo que corresponde con la saturación del color percibido, mostró la misma tendencia presentada en la luminosidad (Figura 5.3b). A los ocho días de estudio los frutos tratados con *Trichoderma* tuvieron significativamente 18% menos croma que los demás tratamientos evaluados. El tono es grado en el cual un estímulo puede ser descrito como similar o diferente, mostró que las papayas evaluadas durante el experimento tuvieron un ascenso del tono para después descender (Figura 5.3c), comportamiento que se presentó a los cuatro, seis y ocho días de estudio en las frutas testigo, tratadas con extracto de jengibre y cloruro de calcio, respectivamente, mientras que las tratadas con *T. longibrachiatum* tuvieron sólo un efecto ascendente.

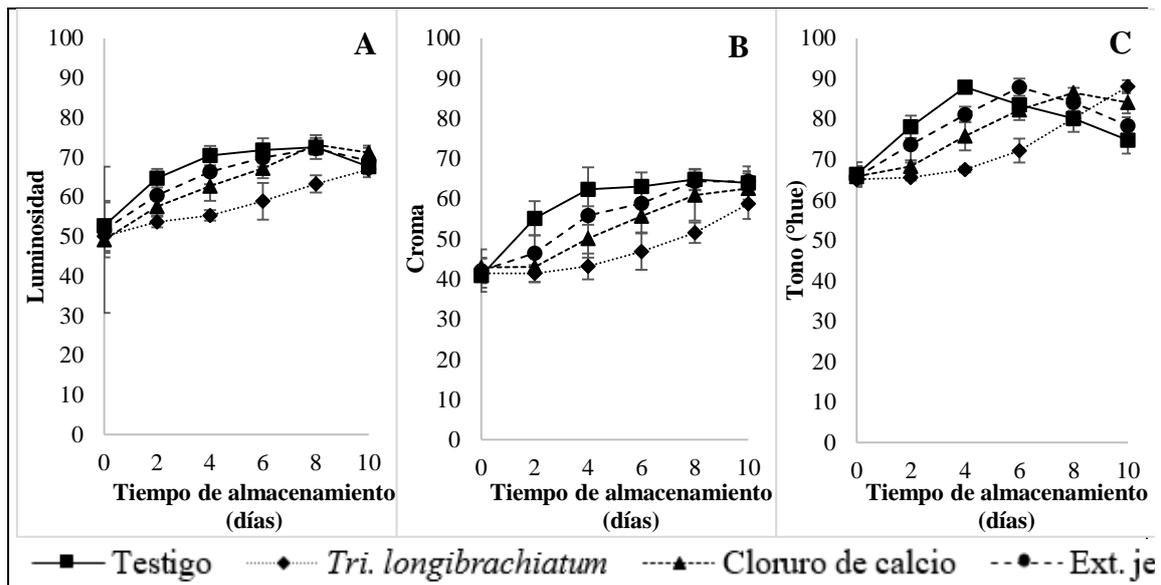


Figura 5.3. Color de frutos de papaya cv. Sunrise sometida a diversos tratamientos postcosecha (*Trichoderma longibrachiatum*, cloruro de calcio, extracto de jengibre) durante su almacenamiento a $20\pm 2^{\circ}\text{C}$ y 85% de HR. A) Luminosidad, B) Cromo D) Tono. Las barras verticales representan \pm desviación estándar de ocho réplicas.

Los cambios mostrados en los resultados se pudieron deber al efecto de la maduración que el fruto está presentando (Rashid et al., 2015). En el caso de la luminosidad los resultados indicaron que la cáscara de la papaya se fue aclarando, ya que el valor de L^* fue aumentando. Los valores de luminosidad obtenidos fueron similares a los determinados por Ali et al., (2011) y Hamzah et al., (2013). El cambio de color en la fruta fresca es un indicador de calidad, así mismo indica la maduración y la posible vida útil del fruto. El proceso de maduración de la papaya involucra degradación de clorofila y síntesis de pigmentos carotenoides. La degradación de la clorofila puede deberse a tres factores posibles ya sea individualmente o en secuencia (Wills et al. 2007). Estos factores son cambios de pH (debido a fugas de ácido orgánico de las vacuolas), sistemas oxidativos y clorofilasas. Todos estos posibles mecanismos de acción se aceleran a medida que avanza el proceso de respiración y maduración (Ali et al., 2011; Hamzah et al., 2013). En el caso de croma y tono, estos están relacionados con las coordenadas de a^* y b^* , y un aumento en a^* indica que la cáscara se vuelve más roja y más alta b^* indica más amarillo. Por lo tanto, para el proceso de optimización, los valores más bajos de L , a y b se utilizaron como indicadores de calidad en el retraso de la maduración y posterior prolongación de la vida útil. (Hamzah et al., 2013).

Los resultados antes descritos también se pueden observar en el Cuadro 5.3, en la que se muestra el seguimiento fotográfico que se tuvo del día inicial del estudio hasta los diez días que finalizo.

Cuadro 5.3. Aspecto visual de la aplicación de *Trichoderma longibrachiatum*, cloruro de calcio y extracto de jengibre en frutos de papaya cv. Sunrise, durante su almacenamiento a 20±2 °C y 85 % de HR.

Tratamiento/ Tiempo de almacenamiento (días)	Testigo	<i>Trichoderma longibrachiatu m</i>	Cloruro de calcio	Extracto de jengibre
D0				
D10				

5.5.2.3. Firmeza

La firmeza es la cualidad que los frutos tienen para indicar que tan firmes están, mostrando que las papayas evaluadas en el presente estudio tuvieron un declive en su firmeza inicial con respecto a la final reportada a los diez días de evaluación (Figura 5.4). Mostrando a este día que la firmeza de las papayas testigo no tuvo diferencia significativa con las tratadas con extracto de jengibre, mientras que las tratadas con cloruro de calcio y *T. longibrachiatum* reportaron el doble (55) y el triple (140%) mayor firmeza que las antes mencionadas, respectivamente.

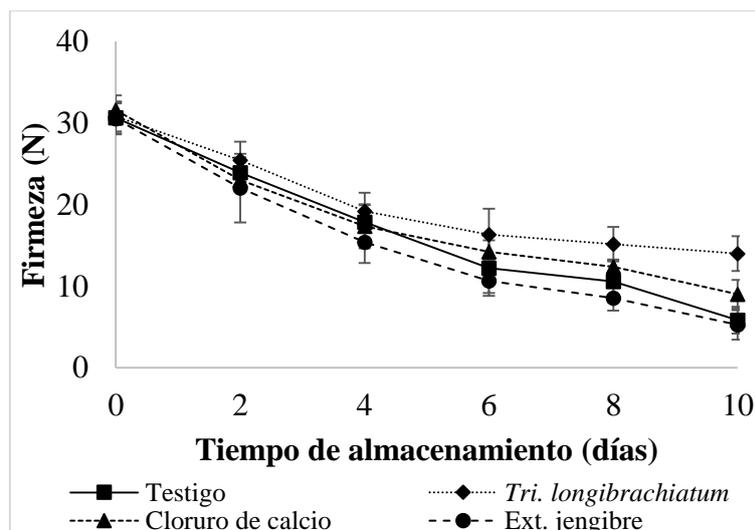


Figura 5.4. Firmeza de frutos de papaya cv. Sunrise sometida a diversos tratamientos postcosecha (*Trichoderma longibrachiatum*, cloruro de calcio, extracto de jengibre) durante su almacenamiento a 20±2 °C y 85 % HR.

El cambio en la firmeza es uno de los principales indicadores para juzgar la calidad de la fruta y está estrechamente afectado por la maduración. La reducción de la textura de la fruta puede ocurrir a través de dos posibles mecanismos de acción. El primer mecanismo se debe a la descomposición de los carbohidratos poliméricos que ocurre durante la maduración y que provocan el debilitamiento de las paredes celulares, pérdida de integridad de la membrana, hidrólisis de celulosa y hemicelulosa, así como despolimerización de pectina y almidón, que se catalizan por la acción de varias enzimas, incluyendo la poligalacturonasa, la pectinmetilesterasa, la pectatoliasa, la Rhamnogalacturonasa, la b-galactosidasa y la celulasa, que disminuye la cohesión celular por desorden celular y degradación de la pectina (Wills et al., 2007). El segundo mecanismo que contribuye a la pérdida de firmeza del fruto está relacionado con la pérdida de agua por la transmisión del vapor de agua que causa pérdida en la turgencia celular.

Con los resultados obtenidos se sugieren que la aplicación de *Trichoderma longibrachiatum* retrasó la maduración de la papaya, resultando en fruta más firme, lamentablemente no se encontraron trabajos en los que se haya evaluado estos parámetros para contrarrestar los resultados obtenidos, ya que el principal uso le dan a *Trichoderma* es el uso de control biológico (Landeró-Valenzuela et al., 2015).

5.5.2.4. Sólidos solubles totales, pH, acidez titulable, contenido de ácido ascórbico

El contenido de sólidos solubles totales (SST) y pH, tuvieron una tendencia a aumentar con respecto al tiempo de almacenamiento, a los diez días de evaluación (Cuadro 5.4), los SST de las papayas tratadas con *Trichoderma longibrachiatum* mostraron significativamente 10% menos °Brix con respecto a las testigos y las tratadas con extracto de jengibre, pero no con las tratadas con cloruro de calcio, con respecto al pH nuevamente las frutas tratadas con *T. longibrachiatum* presentaron significativamente menor pH que los demás tratamientos. La tendencia de la acidez titulable fue inversa a los parámetros anteriores sin presentar diferencia significativa en su contenido por los diferentes tratamientos aplicados durante el tiempo de estudio. El contenido de ácido ascórbico tampoco presentó diferencia significativa a lo largo del estudio, pero presentó un incremento hasta los seis de evaluación para después declinar.

Cuadro 5.4. Cambios en los sólidos solubles totales, pH, acidez titulable y contenido de ácido ascórbico en frutos de papaya cv. Sunrise tratada con *Trichoderma longibrachiatum*, cloruro de calcio y extracto de jengibre, durante su almacenamiento a 20±2 °C y 85 % de HR.

Tiempo de almacén (Días)	Testigo	<i>Trichoderma longibrachiatum</i>	Cloruro de calcio	Extracto de jengibre
Sólidos solubles totales (°Brix)				
0	5.95±0.50 ab	6.23±1.08 ab	5.48±0.43 a	6.59±0.80 b
2	8.65±0.88 bc	7.46±1.30 ab	7.24±0.88 a	9.06±0.68 c
4	9.21±0.60 bc	7.90±0.40 a	8.26±1.27 ab	10.08±0.74 c
6	9.76±0.42 bc	8.48±1.10 a	8.85±0.83 ab	10.61±0.92 c
8	10.66±0.82 b	9.00±.88 a	9.23±0.61 a	10.85±0.63 b
10	11.35±1.12 ab	10.29±0.46 a	10.50±0.87 ab	11.58±0.68 b
pH				
0	5.34±0.10 a	5.36±0.05 a	5.39±0.08 a	5.38±0.06 a
2	5.50±0.05 b	5.42±0.05 a	5.46±0.04 ab	5.45±0.02 ab
4	5.59±0.08 c	5.45±0.04 a	5.48±0.08 ab	5.54±0.03 bc
6	5.64±0.05 b	5.50±0.02 a	5.53±0.06 a	5.61±0.06 b
8	5.76±0.09 b	5.60±0.06 a	5.68±0.04 ab	5.74±0.05 b
10	5.79±0.07 b	5.68±0.05 a	5.77±0.04 b	5.76±0.06 b
Acidez titulable (mg de ácido cítrico/100 g de peso fresco)				
0	14.10±1.43 a	13.84±1.26 a	13.32±0.45 a	13.14±0.94 a
2	11.66±1.33 a	11.49±1.44 a	12.97±0.64 a	11.66±1.52 a
4	11.49±1.34	10.97±0.72	11.57±1.23	11.14±0.98
6	10.97±1.10 a	10.44±0.98 a	11.23±1.08 a	10.70±1.05 a
8	9.31±0.98 a	10.18±0.64 ab	10.70±1.05 b	9.92±0.89 ab
10	8.88±1.33 a	9.83±0.69 a	8.53±1.16 a	8.35±1.12 a
Contenido de ácido ascórbico (mg de ácido ascórbico/100 g de peso fresco)				
0	36.85±9.14 a	42.55±7.47 a	37.66±7.18 a	41.05±9.14 a
2	50.68±9.61 a	47.42±9.38 a	45.02±8.61 a	46.77±7.87 a
4	73.84±8.59 a	79.98±9.73 a	76.17±9.72 a	71.74±6.40 a
6	95.73±7.70 a	98.71±6.35 ab	105.78±8.20 b	92.30±6.99 a
8	91.95±8.23 a	94.87±9.99 a	95.55±6.22 a	91.10±9.07 a
10	72.19±5.16 a	89.38±9.26 b	82.83±9.45 b	70.37±3.64 a

Los valores obtenidos en el presente trabajo fueron consistentes con los obtenidos por Ali et al., (2011) quienes trabajaron con recubrimiento de quitosano en papaya y con Rashid et al., (2015) quienes evaluaron irradiación gama combinado con tratamiento hidrotermico en papaya. El aumento de SST se puede deber a los cambios que la papaya sufre dentro de la maduración, es un buen estimador del contenido de azúcar en las frutas, ya que ésta representa más del 90% de la materia soluble en la mayoría de ellas, el

incremento de ellos durante el estudio indica un alto contenido de azúcares provenientes de una degradación de carbohidratos complejos. La disminución de la acidez de la fruta se debe probablemente a la reducción de la actividad metabólica durante el climaterio hay consumo de ácidos orgánicos, ya que la fruta no tiene reservas de almidón (Wills et al. 2007) y por lo tanto un aumento en el pH.

5.6. CONCLUSIÓN

En la primera fase, se demostró que el control biológico presentó mejores resultados que el control químico y los extractos vegetales, siendo *Trichoderma longibrachiatum* el agente con mayor efecto antifúngico. En la segunda fase, nuevamente se observó que *Trichoderma. longibrachiatum* ocasionó la menor pérdida de peso, la mayor firmeza, retuvo por mayor tiempo la coloración de los frutos, por lo que este agente podría ser prometedor para el control de antracnosis, así como tratamiento postcosecha en frutos de papaya cv. Sunrise.

5.7. LITERATURA CITADA

- Abdelrahman M., Abdel-Motaal F., El-Sayed M., Jogaiah S., Shigyo M., Ito S-I., Phan Tran L-S. 2016. Dissection of *Trichoderma longibrachiatum*-induced defense in onion (*Allium cepa* L.) against *Fusarium oxysporum* f. sp. cepa by target metabolite profiling. Plant Science 246, 128-138. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plantsci.2016.02.008>
- Ali, A., Muhammad, M.T.M., Sijam, K., Siddiqui, Y. 2011. Effect of chitosan coatings on the physicochemical characteristics of Eksotika II papaya (*Carica papaya* L.) fruit during cold storage. Food Chemistry 124, 620-626. <http://dx.doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.085>
- Almalki E., Al-Shaebi E.M., Al-Quarishy S., El-Matbouli M., Abdel-Baki A-A.S. 2017. In vitro effectiveness of *Curcuma longa* and *Zingiber officinale* extracts on *Echinococcus* protoscoleces Saudi Journal of Biological Sciences 24, 90-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.sjbs.2016.05.007>
- Annegowda, H.V. y Rajeev Bhat. 2015. Chapter 21: Composition of Papaya Fruit and Papaya Cultivars. In Nutricional Composotion of Fruit Cultivars editado por: Simmonds Monique S.J. y Preedy Victor R. Academy Press. 497-516. <https://books.google.com.mx/books?isbn=0124080642>

- AOAC. Association of Official Analytical Chemists. (1999). Official methods of analysis of AOAC International. 16Ed. 5rd rev. Washington, D.C.
- Ayón-Reyna L.E., González-Robles A., Rendón-Maldonado J.G., Báez-Flores M.E., López-López M.E., Vega-García M.O. 2017. Application of a hydrothermal-calcium chloride treatment to inhibit postharvest anthracnose development in papaya. *Postharvest Biology and Technology* 124, 85-90. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2016.10.009>
- Ben Amira M., Lopez D., Mohamed A.T., Khouaja A., Chaar H., Fumanal B., Gousset-Dupont A., Bonhomme L., Label P., Goupil P., Ribeiro S., Pujade-Renaud V., Julien J-L., Auguin D., Venisse J-S. 2017. Beneficial effect of *Trichoderma harzianum* strain Ths97 in biocontrolling *Fusarium solani* causal agent of root rot disease in olive trees. *Biological Control* 110, 70-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.04.008>
- Ben Khedher S., Kilani-Feki O., Dammak M., Jabnoun-Khiareddine H., Daami-Remadi M., Tounsi S. 2015. Efficacy of *Bacillus subtilis* V26 as a biological control agent against *Rhizoctonia solani* on potato. *Comptes Rendus Biologies* 338, 784-792. <http://dx.doi.org/10.1016/j.crv.2015.09.005>
- Bustos A.V.G., Jiménez M.G., Mora R.M.S. 2017. *The Annona muricata* leaf ethanol extract affects mobility and reproduction in mutant strain NB327 *Caenorhabditis elegans*. *Biochemistry and Biophysics Reports* 10, 282-286. <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrep.2017.04.016>
- Calvo H., Marco P., Blanco D., Oria R., Venturini M.E. 2017. Potential of a new strain of *Bacillus amyloliquefaciens* BUZ-14 as a biocontrol agent of postharvest fruit diseases. *Food Microbiology* 63, 101-110. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2016.11.004>
- Cerioni L., Bennasar P.B., Lazarte D., Sepulveda M., Smilanick J.L., Ramallo J., Rapisarda V.A. 2017. Conventional and reduced-risk fungicides to control postharvest *Diplodia* and *Phomopsis* stem-end rot on lemons. *Scientia Horticulturae* 225, 783-787. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.08.008>
- Chakotiya A.S., Tanwar A., Narula A., Sharma R.K. 2017. *Zingiber officinale*: Its antibacterial activity on *Pseudomonas aeruginosa* and mode of action evaluated by flow cytometry. *Microbial Pathogenesis* 107, 254-260. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2017.03.029>
- Chen X., Zhang Y., Fu X., Li Y., Wang Q. 2016. Isolation and characterization of *Bacillus amyloliquefaciens* PG12 for the biological control of apple ring rot. *Postharvest*

Biology and Technology 115, 113-121.
<http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.021>

- Coria-Télez A.V., Montalvo-González E., Yahia E.M., Obledo-Vázquez E.N. 2016. *Annona muricata*: A comprehensive review on its traditional medicinal uses, phytochemicals, pharmacological activities, mechanisms of action and toxicity. Arabian Journal of Chemistry xxx, xxx–xxx. <http://dx.doi.org/10.1016/j.arabjc.2016.01.004>
- Craven M., Smith K., Berner J., Morey L., McLaren N.W. 2017. Evaluation of fungicides for potential growth regulating properties on sorghum. Crop Protection 101, 43-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2017.07.003>
- De Corato U., Salimbeni R., De Pretis A., Avella N., Patruno G. 2017. Antifungal activity of crude extracts from brown and red seaweeds by a supercritical carbon dioxide technique against fruit postharvest fungal diseases. Postharvest Biology and Technology 131, 16-30. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.04.011>
- De Souza J.T., Trocoli R.O., Monteiro F.P. 2016. Plants from the Caatinga biome harbor endophytic *Trichoderma* species active in the biocontrol of pineapple fusariosis. Biological Control 94, 25-32. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.12.005>
- Fan H., Ru J., Zhang Y., Wang Q., Li Y. 2017. Fengycin produced by *Bacillus subtilis* 9407 plays a major role in the biocontrol of apple ring rot disease. Microbiological Research 199, 89-97. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.03.004>
- FAOSTAT 2016. Base de datos de producción mundial y comercio internacional. Disponible en: <http://faostat.fao.org/faostat>
- Florence N.T., Benoit M.Z., Jonas K., Alexandra T., Désiré D.D.P., Pierre K., Théophile D. 2014. Antidiabetic and antioxidant effects of *Annona muricata* (*Annonaceae*), aqueous extract on streptozotocin-induced diabetic rats Journal of Ethnopharmacology 151, 784-790. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2013.09.021>
- Gago C.M.L., Guerreiro A.C., Miguel C., Panagopoulos T., da Silva M.M., Antunes M.D.C. 2016. Effect of Calcium chloride and 1-MCP (Smartfresh™) postharvest treatment on ‘Golden Delicious’ apple cold storage physiological disorders. Scientia Horticulturae 211, 440-448. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2016.09.017>
- Gillard C.L., Ranatunga N.K. 2013. Interaction between seed treatments, surfactants and foliar fungicides on controlling dry bean anthracnose (*Colletotrichum lindemuthianum*). Crop Protection 45, 22-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2012.11.019>

- Gotor-Vila, Teixidó N., Di Francesco A., Usall J., Ugolini L., Torres R., Mari M. 2017. Antifungal effect of volatile organic compounds produced by *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 against fruit pathogen decays of cherry. Food Microbiology 64, 219-225. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fm.2017.01.006>
- Gotor-Vila, Usall, J., Torres, R., Solsona, C., Teixidó, N. 2017. Biocontrol products based on *Bacillus amyloliquefaciens* CPA-8 using fluid-bed spray-drying process to control postharvest brown rot in stone fruit. LWT - Food Science and Technology 82, 274-282. <http://dx.doi.org/10.1016/j.lwt.2017.04.034>
- Hamzah, H.M., Osman, A., Tan, C.P., Ghazali, F.M. 2013. Carrageenan as an alternative coating for papaya (*Carica papaya* L. cv. Eksotika). Postharvest Biology and Technology 75, 142-146. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2012.08.012>
- Hewajulige, 2016. Papayas. In Encyclopedia of Food and Health. Editado por: Caballero B., Finglas P.M, y Toldrá F. Vol. 1. Elsevier-Academy Press. Reino Unido. 209-212. <https://books.google.com.mx/books?isbn=0123849535>.
- Irfan P.K., Vanjakshi V., Keshava Prakash M.N., Ravi R., Kudachikar V.B. 2013. Calcium chloride extends the keeping quality of fig fruit (*Ficus carica* L.) during storage and shelf-life. Postharvest Biology and Technology 82, 70-75. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2013.02.008>
- Jasso de Rodríguez D., Salas-Méndez E. de J., Rodríguez-García R., Hernández-Castillo F.D., Díaz-Jiménez M.L.V., Sáenz-Galindo A., González-Morales S., Flores-López M.L., Villarreal-Quintanilla J.A., Peña-Ramos F.M., Carrillo-Lomelí D.A. 2017. Antifungal activity in vitro of ethanol and aqueous extracts of leaves and branches of *Flourensia* spp. against postharvest fungi. Industrial Crops & Products. In press. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.04.054>
- Kilani-Feki O., Ben Khedher S., Dammak M., Kamoun A., Jabnoun-Khiareddine H., Daami-Remadi M., Tounsi S. 2016. Improvement of antifungal metabolites production by *Bacillus subtilis* V26 for biocontrol of tomato postharvest disease. Biological Control 95, 73-82. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.01.005>
- Lai T., Wang Y., Fan Y., Zhou Y., Bao Y., Zhou T. 2017. The response of growth and patulin production of postharvest pathogen *Penicillium expansum* to exogenous potassium phosphite treatment. International Journal of Food Microbiology 244, 1-10. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.12.017>

- Landero-Valenzuela N., Nieto-Angel D., Téliz O.D., Alatorre R.R., Ortíz G.C.F., Orozco S.M. 2015. Biological control of anthracnose by postharvest application of *Trichoderma* spp. on maradol papaya fruit. *Biological Control* 91, 88–93. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2015.08.002>
- Liljeroth E., Lankinen A., Wiik L., Burra D.D., Alexandersson E., Andreasson E. 2016. Potassium phosphite combined with reduced doses of fungicides provides efficient protection against potato late blight in large-scale field trials. *Crop Protection* 86, 42-55. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.04.003>
- Liu N., Yang H.L., Wang P., Lu Y.C., Yang Y.J., Wang L., Lee S.C. 2016. Functional proteomic analysis reveals that the ethanol extract of *Annona muricata* L. induces liver cancer cell apoptosis through endoplasmic reticulum stress pathway. *Journal of Ethnopharmacology* 189, 210-217. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2016.05.045>
- Madani B., Mohamed M.T.M., Biggs A.R., Kadir J., Awang Y., Tayebimeigooni A., Shojaei T.R. 2014. Effect of pre-harvest calcium chloride applications on fruit calcium level and post-harvest anthracnose disease of papaya. *Crop Protection* 55, 55-60. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2013.10.009>
- Maeda, C., Nelson, S. 2014. Anthracnose of Papaya in Hawaii. *Plant Disease* 103, 1-6.
- Martínez S. 2016. Effects of combined application of potassium phosphite and fungicide on stem and sheath disease control, yield, and quality of rice. *Crop Protection* 89, 259-264. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.08.002>
- Martínez-Medina A., Roldán A., Pascual J.A- 2011. Interaction between arbuscular mycorrhizal fungi and *Trichoderma harzianum* under conventional and low input fertilization field condition in melon crops: Growth response and *Fusarium* wilt biocontrol. *Applied Soil Ecology* 47, 98-105. <http://dx.doi.org/10.1016/j.apsoil.2010.11.010>
- Masmoudi F., Ben Khedher S., Kamoun A., Zouari N., Tounsi S., Trigui M. 2017. Combinatorial effect of mutagenesis and medium component optimization on *Bacillus amyloliquefaciens* antifungal activity and efficacy in eradicating *Botrytis cinerea*. *Microbiological Research* 197, 29-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micres.2017.01.001>
- Osouli S., Afsharmanesh H. 2016. To evaluate the effects of secondary metabolites produced by *Bacillus subtilis* mutant M419 against *Papilio demoleus* L. and *Aspergillus flavus*. *Acta Ecologica Sinica* 36, 492-496. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chnaes.2016.08.002>

- Pinto N.C.C., Campos L.M., Evangelista A.C.S., Lemos A.S.O., Silva T.P., Melo R.C.N., de Lourenço C.C., Salvador M.J., Apolônio A.C.M., Scio E., Fabri R.L. 2017. Antimicrobial *Annona muricata* L. (soursop) extract targets the cell membranes of Gram-positive and Gram-negative bacteria. *Industrial Crops & Products* 107, 332-340. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2017.05.054>
- Ramezani M., Rahmani F., Dehestani A. 2017. The effect of potassium phosphite on PR genes expression and the phenylpropanoid pathway in cucumber (*Cucumis sativus*) plants inoculated with *Pseudoperonospora cubensis*. *Scientia Horticulturae* 225, 366-372. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.07.022>
- Rashid, M.H.A., Grout, B.W.W., Continella, A., Mahmud, T.M.M. 2015. Low- dose gamma irradiation following hot water immersion of papaya (*Carica papaya* linn.) fruits provides additional control of postharvest fungal infection to extend shelf life. *Radiation Physics and Chemistry* 110, 77-81. <http://dx.doi.org/10.1016/j.radphyschem.2015.01.024>
- Santhosh S.B., Ragavendran C., Natarajan D., 2015. Spectral and HRTEM analyses of *Annona muricata* leaf extract mediated silver nanoparticles and its Larvicidal efficacy against three mosquito vectors *Anopheles stephensi*, *Culex quinquefasciatus*, and *Aedes aegypti*. *Journal of Photochemistry & Photobiology, B: Biology* 153, 184-190. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jphotobiol.2015.09.018>
- Saravanakumar K., Li Y., Yu C., Wang Q-G., Wang M., Sun J., Gao J-X., Chen J. 2016. Effect of *Trichoderma harzianum* on maize rhizosphere microbiome and biocontrol of *Fusarium* Stalk rot. *Scientific Reports* 7, 1771-1784. <http://dx.doi:10.1038/s41598-017-01680-w>
- Siahmoshteh F., Siciliano I., Banani H., Hamidi-Esfahani, Z., Razzaghi-Abyaneh M., Gullino M.L., Spadaro D. 2017. Efficacy of *Bacillus subtilis* and *Bacillus amyloliquefaciens* in the control of *Aspergillus parasiticus* growth and aflatoxins production on pistachio. *International Journal of Food Microbiology* 254, 47-53. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2017.05.011>
- Sulaiman F.A., Kazeem M.O., Waheed A.M., Temowo S.O., Azeez I.O., Zubair F.I., Adeyemi T.A., Nyang A., Adeyemi O.S. 2014. Antimicrobial and toxic potential of aqueous extracts of *Allium sativum*, *Hibiscus sabdariffa* and *Zingiber officinale* in Wistar rats. *Journal of Taibah University for Science* 8, 315-322. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jtusci.2014.05.004>

- Sun S., Liu J., Sun X., Zhu W., Yang F., Felczak L., Ping Dou Q., Zhou K. 2017. Novel Annonaceous acetogenins from Graviola (*Annona muricata*) fruits with strong anti-proliferative activity. *Tetrahedron Letters* 58, 1895-1899. <http://dx.doi.org/10.1016/j.tetlet.2017.04.016>
- Srinivasan K. 2017. Ginger rhizomes (*Zingiber officinale*): A spice with multiple health beneficial potentials. *Pharma Nutrition* 5, 18-28. <http://dx.doi.org/10.1016/j.phanu.2017.01.001>
- Tomazoni E.Z., Pauletti G.F., Ribeiro R.T.S., Moura S., Schwambach J. 2017. In vitro and in vivo activity of essential oils extracted from *Eucalyptus staigeriana*, *Eucalyptus globulus* and *Cinnamomum camphora* against *Alternaria solani* Sorauer causing early blight in tomato. *Scientia Horticulturae* 223, 72-77. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2017.04.033>
- Waewthongrak W., Pisuchpen S., Leelasuphakul W. 2015. Effect of *Bacillus subtilis* and chitosan applications on green mold (*Penicillium digitatum* Sacc.) decay in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology* 99, 44-49. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2014.07.016>
- Wang H., Huang Y., Wang J., Chen X., Wei K., Wang M., Shang S. 2016. Activities of azoxystrobin and difenoconazole against *Alternaria alternata* and their control efficacy. *Crop Protection* 90, 54-58. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.08.022>
- Wang X., Wang J., Jin P., Zheng Y. 2013. Investigating the efficacy of *Bacillus subtilis* SM21 on controlling *Rhizopus* rot in peach fruit. *International Journal of Food Microbiology* 164, 141-147. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2013.04.010>
- Watson A., Pung H., Hall B.H. 2017. Managing leaf diseases of carrots with traditional and alternative fungicides including baseline sensitivity studies. *Crop Protection* 93, 52-59. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2016.11.017>
- Wianowska D., Garbaczewska S., Cieniecka-Roslonkiewicz A., Dawidowicz A.L., Jankowska A. 2016. Comparison of antifungal activity of extracts from different *Juglans regia* cultivars and juglone *Microbial Pathogenesis* 100, 263-267. <http://dx.doi.org/10.1016/j.micpath.2016.10.009>
- Wills, R.B.H., McGlasson, W.B., Graham, D., Joyce, D.C., 2007. *Postharvest: An Introduction to the Physiology and Handling of Fruit and Vegetables and Ornamentals*. CABI, Oxfordshire, UK.

- You J., Zhang J., Wu M., Yang L., Chen W., Li G. 2016. Multiple criteria-based screening of *Trichoderma* isolates for biological control of *Botrytis cinerea* on tomato. *Biological Control* 101, 31-38. <http://dx.doi.org/10.1016/j.biocontrol.2016.06.006>
- Zavala-León, M.J., Jairo-Cristóbal, A. 2012. Escala logarítmica diagramática de severidad de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) en papaya (*Carica papaya*). *Fitosanidad* 16(2), 83-86. <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=209126216004>
- Zhang F., Chen C., Zhang F., Gao L., Liu J., Chen L., Fan X., Liu C., Zhang K., He Y., Chen C., Ji X. 2017. *Trichoderma harzianum* containing 1-aminocyclopropane-1-carboxylate deaminase and chitinase improved growth and diminished adverse effect caused by *Fusarium oxysporum* in soybean. *Journal of Plant Physiology* 210, 84-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jplph.2016.10.012>