



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL



**Centro Interdisciplinario de Investigación para
el Desarrollo Integral Regional
Unidad Michoacán**

**EFFECTO ANTIFÚNGICO DE ANTOCIANINAS DE
FRUTOS DE FRESA vs HONGOS
FITOPATÓGENOS**

T E S I S

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS EN PRODUCCIÓN AGRÍCOLA
SUSTENTABLE

PRESENTA:

Diego Rafael Huerta Pérez

DIRECTORES DE TESIS:

Dra. María Valentina Angoa Pérez

Dr. Jorge Molina Torres

Jiquilpan, Michoacán, México, enero, 2016



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO
ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Jiquilpan, Michoacán siendo las 12:00 horas del día 4 del mes de Diciembre del 2015 se reunieron los miembros de la Comisión Revisora de la Tesis, designada por el Colegio de Profesores de Estudios de Posgrado e Investigación de CIIDIR Unidad Michoacán para examinar la tesis titulada:

"Efecto antifúngico de antocianinas de frutos de fresa vs hongos fitopatógenos"

Presentada por el alumno:

Huerta Pérez Diego Rafael
Apellido paterno Apellido materno Nombre

Table with 7 columns: B, 1, 3, 1, 0, 3, 3

aspirante de:

Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable

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

LA COMISIÓN REVISORA
Directores de tesis

Dra. María Valentina Angoa Pérez

Dr. Jorge Molina Torres

Dr. Pedro Damián Loeza Lara

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

M. en C. Guadalupe Oyoque Salcedo

Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE PROFESORES.





INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL
SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

CARTA CESIÓN DE DERECHOS

En la Ciudad de Jiquilpan de Juárez, Michoacán el día 14 del mes de Diciembre del año 2015, el (la) que suscribe Diego Rafael Huerta Pérez alumno(a) del Programa de Maestría en Ciencias en Producción Agrícola Sustentable, con número de registro B131033, adscrito(a) al C.I.I.D.I.R. I.P.N. Unidad Michoacán, manifiesto(a) que es el (la) autor(a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del (de la, de los) Dra. María Valentina Angoa Pérez y Dr. Jorge Molina Torres y cede los derechos del trabajo titulado “Efecto antifúngico de antocianinas de frutos de fresa vs hongos fitopatógenos”, al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del (de la) autor(a) y/o director(es) del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a las siguientes direcciones: valeangoa@hotmail.com, jmolina@ira.cinvestav.mx, diegoucmhuerta@gmail.com. Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Diego Rafael Huerta Pérez

Agradecimientos

Al Instituto Politécnico Nacional por permitirme dar un paso más en mi carrera profesional y por el apoyo para la realización de esta tesis.

A CONACYT por otorgarme las becas de estudio y de movilidad, la cual fue indispensable para la realización de este trabajo.

Al CINVESTAV-Irapuato, por permitirme realizar parte de esta investigación en sus instalaciones.

A la Dra. María Valentina Angoa Pérez por su asesoría y por su incansable apoyo, paciencia y motivación.

Dr. Jorge Molina Torres por su asesoría y por permitirme formar parte de su equipo de trabajo durante la estancia en su laboratorio.

Al Mtro. Enrique Ramírez Chávez por su asesoría y apoyo durante la estancia en el laboratorio de Biotecnología y bioquímica del CINVESTAV-Irapuato.

A la Dra. Hortencia Gabriela Mena Violante y a la Mtra. Guadalupe Oyoque Salcedo por formar parte de mi comité tutorial y por su apoyo constante.

Dedicatoria

A mis Padres, Guadalupe del Carmen Pérez Gómez y Rafael Huerta Anguiano,
por su incansable apoyo y motivación diaria.

A mis hermanos, María de los Ángeles y Oscar Hugo por ser parte de mi
motivación para cumplir esta meta.

A mi novia Julia Cecilia Rodríguez Rodríguez por apoyarme en todo momento.

Índice general

Índice de figuras.....	i
Índice de tablas.....	iii
Resumen.....	iv
Abstract.....	v
Capítulo I. Introducción.....	1
1.1. Hongos fitopatógenos.....	3
1.1.1 Importancia de los hongos fitopatógenos.....	3
1.1.2 <i>Botrytis cinerea</i>	4
1.1.2.1 Descripción del género <i>Botrytis</i>	4
1.1.2.2 Importancia de <i>B. cinerea</i>	4
1.1.2.3 Características morfológicas de <i>B.cinerea</i>	5
1.1.2.4 Clasificación taxonómica de <i>B. cinerea</i>	8
1.1.2.5 Ciclo biológico de <i>B. cinerea</i>	9
1.1.2.6 Ciclo de infección de <i>B. cinerea</i>	10
1.1.3 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	11
1.1.3.1 Descripción del género <i>Colletotrichum</i>	11
1.1.3.2 Importancia de <i>C. gloeosporioides</i>	12
1.1.3.3 Características morfológicas de <i>C. gloeosporioides</i>	12
1.1.3.4 Clasificación taxonómica de <i>C. gloeosporioides</i>	12
1.1.3.5 Ciclo biológico de <i>C. gloeosporioides</i>	13
1.1.3.6 Ciclo de infección de <i>C. gloeosporioides</i>	14
1.2. Métodos de control de hongos fitopatógenos.....	15
1.2.1 Control cultural.....	15
1.2.2 Control químico.....	16
1.2.2.1 Consecuencias del uso de fungicidas químico sintéticos....	16
1.2.3 Extractos vegetales.....	17

1.2.3.1 Posibles mecanismos de acción usados para el bicontrol por extractos vegetales.....	19
1.3 Metabolismo secundario de las plantas.....	21
1.3.1 Compuestos fenólicos.....	22
1.3.1.1 Funciones de los compuestos fenólicos.....	24
1.3.2 Flavonoides.....	24
1.3.3 Antocianinas.....	25
1.3.3.1 Química de las antocianinas.....	25
1.3.3.1 Funciones de las antocianinas.....	27
1.4 La fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>).....	28
1.4.1 Historia de <i>F. x ananassa</i>	28
1.4.2 Taxonomía <i>F. x ananassa</i>	29
1.4.3 Descripción botánica de <i>F. x ananassa</i>	30
1.4.4 Importancia nutricional de <i>F. x ananassa</i>	32
1.4.5 Importancia económica de <i>F. x ananassa</i>	32
1.4.6 <i>F. x ananassa</i> como fuente de compuestos bioactivos.....	34
2.0 Hipótesis.....	36
2.1 Objetivos.....	36
2.1.1 Objetivo general.....	36
2.1.2 Objetivos específicos.....	36
Capítulo III. Materiales y métodos.....	37
3.1 Material biológico.....	37
3.2 Obtención de hongos fitopatógenos.....	37
3.3 Extracción y cuantificación de antocianinas.....	38
3.4 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de antocianinas totales.....	39
3.4.1 Ensayos de inhibición <i>in vitro</i> de extractos de antocianinas totales vs hongo.....	39

3.4.2 Porcentajes de inhibición.....	40
3.5 Fraccionamiento e Identificación de compuestos bioactivos presentes en los extractos de antocianinas totales	41
3.5.1 Cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos de antocianinas totales.....	41
3.5.2 Cromatografía en columna (CC) de los extractos de antocianinas totales.....	43
3.5.3 Ensayos de inhibición in vitro de las fracciones obtenidas por CC del extracto de antocianinas totales de fresa.....	43
3.5.4 TLC preparativa de las fracciones más activas.....	44
3.5.5 Ensayos de inhibición <i>in vitro</i> de las fracciones obtenidas por TLC preparativa.....	45
3.5.6 Identificación de los compuestos responsables de la actividad antifúngica por espectrometría de masas (MALDI-TOF).....	45
3.6 Análisis estadístico.....	45
Capítulo IV. Resultados.....	46
4.1 Extracción y cuantificación de antocianinas totales de fresa.....	46
4.2 Ensayos de inhibición <i>in vitro</i> de antocianinas totales de frutos de fresa contra <i>B. cinerea</i>	46
4.3 Ensayos de inhibición in vitro de antocianinas totales de frutos de fresa contra <i>C. gloeosporioides</i>	48
4.4 Cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos de antocianinas totales... 49	
4.5 Fraccionamiento por CC de los extractos de antocianinas totales.....	52
4.6 Ensayos de inhibición in vitro de las fracciones obtenidas por CC contra <i>B. cinerea</i>	53
4.7 Ensayos de inhibición in vitro de las fracciones obtenidas por CC contra <i>C. gloeosporioides</i>	53
4.8 TLC preparativa de fracciones con mayor actividad antifúngica.....	54
4.9 Identificación de las bandas obtenidas por TLC preparativa más activas contra <i>B. cinerea</i> y <i>C. gloeosporioides</i>	55
4.10 Identificación de los compuestos responsables de la actividad antifúngica por espectrometría de masas MALDI-TOF	55

Capítulo V. Discusión.....	58
Capítulo VI. Conclusiones.....	61
Capítulo VII. Bibliografía.....	62

Índice de figuras

Figura 1. Micelio de <i>B. cinerea</i>	5
Figura 2. Conidióforos y conidios de <i>B. cinerea</i>	6
Figura 3. Microconidióforos y microconidios de <i>B. cinerea</i>	7
Figura 4. Esclerocios de <i>B. cinerea</i>	8
Figura 5. Ciclo biológico de <i>B. cinerea</i>	10
Figura 6. Hifas de <i>Rhizoctonia solani</i> afectadas por un extracto de <i>Desmos chinensis</i>	20
Figura 7. Células de <i>Rhizoctonia solani</i> afectadas por un extracto de <i>Desmos chinensis</i>	20
Figura 8. Principales rutas de biosíntesis (simplificadas) de los metabolitos secundarios en plantas.....	22
Figura 9. Ruta general biosintética de los compuestos fenólicos y sus principales subgrupos.....	23
Figura 10. Estructura básica de los flavonoides.....	25
Figura 11. Estructura básica de las antocianinas.....	26
Figura 12. Esqueleto básico de una antocianina y posibles variaciones en cuanto a la posición de sustituyentes hidroxilo y/o metoxilo.....	27
Figura 13. Descripción morfológica de <i>F. vesca</i>	28
Figura 14. Morfología de <i>F. chiloensis</i>	29
Figura 15. Morfología de <i>F. x ananassa</i>	31
Figura 16. Estados de maduración de la fresa según su coloración (NMX-FF-062-SCFI-2002)	37
Figura 17. Equipo para cromatografía en capa fina (TLC) (CAMAG®).....	42
Figura 18. TLC de extractos totales de frutos de fresa. Placa desarrollada con el sistema de solventes I.....	50
Figura 19. TLC de extractos totales de frutos de fresa. Placas desarrolladas con el sistema de solventes II.....	50
Figura 20. TLC de extractos totales de frutos de fresa. Placas desarrolladas con el sistema de solventes III.....	51

Figura 21. Placa de TLC de los extractos totales de antocianinas de fresa con aplicaciones de 1-5 μ l.....	51
Figura 22. Fracciones de los extractos obtenidas por Cromatografía en columna (CC)	52
Figura 23. TLC preparativa de fracciones con mayor actividad antifúngica de ambos extractos.....	54
Figura 24. Perfil de compuestos presentes en la fracción 5 del extracto de fresa variedad Festival.....	56
Figura 25. Perfil de compuestos presentes en la banda 3, obtenida por TLC preparativa de la fracción 5 del extracto de fresa variedad Festival.....	56

Índice de tablas o cuadros

Tabla 1. Clasificación taxonómica de <i>Botrytis cinerea</i>	9
Tabla 2. Clasificación taxonómica de <i>C. gloeosporioides</i>	13
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>F. x ananassa</i>	30
Tabla 4. Contenido nutrimental de la fresa por cada 100 g de fruto fresco.....	32
Tabla 5. Exportación de fresa mexicana.....	33
Tabla 6. Tratamientos utilizados para evaluar la actividad antifúngica de los extractos totales.....	40
Tabla 7. Sistemas de solventes evaluados para desarrollar las placas de Cromatografía en capa fina (TLC)	41
Tabla 8. Tratamientos utilizados para evaluar la actividad antifúngica de las fracciones más activas obtenidas por CC.....	44
Tabla 9. Concentración final de los extractos totales de frutos de fresa en mg de extracto	46
Tabla 10. Porcentajes de inhibición de los extractos de antocianinas totales frente a <i>B. cinerea</i>	47
Tabla 11. Porcentajes de inhibición de los extractos de antocianinas totales frente a <i>B. cinerea</i> (segunda prueba).....	47
Tabla 12. Porcentajes de inhibición de los extractos de antocianinas totales frente a <i>C. gloeosporioides</i>	48
Tabla 13. Porcentajes de inhibición de los extractos de antocianinas totales frente a <i>C. gloeosporioides</i> (segunda prueba).....	49
Tabla 14. Porcentajes de inhibición de las fracciones más activas de extractos de antocianinas totales frente a <i>B. cinerea</i>	53
Tabla 15. Porcentajes de inhibición de las fracciones más activas de extractos de antocianinas totales frente a <i>C. gloeosporioides</i>	54

Resumen

El fruto de fresa (*Fragaria x ananassa*) es frecuentemente atacado por hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides*. Una alternativa para su control es la aplicación de extractos de plantas. El control de fitopatógenos con extractos de plantas en parte es atribuido a la presencia de alcaloides, taninos, quinonas, cumarinas, fitoalexinas y compuestos fenólicos, entre los que destacan los flavonoides presentes en extractos de uva, aloe y guamúchil. Sin embargo, no se han encontrado trabajos que reporten el uso de antocianinas (del grupo de los flavonoides) para el control de fitopatógenos. Por lo anterior, el objetivo de este trabajo fue evaluar el efecto de extractos totales de antocianinas de frutos de fresa de las variedades Festival y Zamorana, así como también fracciones de los mismos sobre el crecimiento de los hongos *B. cinerea* y *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*. Se probaron distintas dosis del extracto total y de las fracciones hasta obtener la concentración mínima inhibitoria del crecimiento de los fitopatógenos, las cuales se colocaron en discos de papel filtro estéril de 10 mm sobre placas de Petri con medio Agar Papa-Dextrosa. En el centro de las placas se colocó 0.5 cm³ de PDA con *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*. Como control se usaron placas con el patógeno y con etanol acidificado. Se usaron 3 placas por tratamiento. Las placas fueron incubadas a 28°C y se revisaron diariamente durante 8 días para medir el halo de inhibición del crecimiento del patógeno y posteriormente los datos se convirtieron a porcentajes. Se realizó un análisis por cromatografía de gases acoplado a masas de las fracciones probadas de ambas variedades de fresa para determinar los compuestos a los que pudiera atribuirse la actividad antimicrobiana. Los resultados mostraron una inhibición del crecimiento de *B. cinerea* del 31.52% con los extractos totales de la var. Festival y un 30.8% con la var. Zamorana y un 100% de inhibición del crecimiento micelial de este hongo con las fracciones de ambos extractos. En el caso de *C. gloeosporioides*, tanto los extractos totales como las fracciones de ambas variedades permitieron una inhibición del crecimiento del 100%. Los compuestos con los pico mayoritarios presentes en las fracciones de ambas variedades analizadas correspondieron a la cianidina 3 glucósido y la pelargonidina 3 glucósido, ambas antocianinas presentes en frutos de fresa.

Abstract

The strawberry (*Fragaria x ananassa*) fruit is frequently attacked by pathogenic fungi as *Botrytis cinerea* and *Colletotrichum gloeosporioides*. An alternative to control of this pathogens is the application of plant extracts. The control of phytopathogenic plant extracts is partly attributed to the presence of alkaloids, tannins, quinones, coumarins, phytoalexins and phenolic compounds, among them the flavonoids in grape extracts, aloe and guamáchil. However, no report found studies using anthocyanin (flavonoid group) for the control of phytopathogens. Therefore, the aim of this study was to evaluate the effect of total anthocyanins extracts of strawberry fruit from the varieties Zamorana and Festival, as well as its fractions on the growth of the fungus *B. cinerea* and *C. gloeosporioides* in vitro. Different doses of total extract and its fractions were tested in order to obtain the minimum inhibitory concentration, which were placed on filter paper disks on sterile 10 mm Petri dishes with Potato Dextrose Agar. In the center of the plates 0.5 cm³ PDA with *B. cinerea* and *C. gloeosporioides* was placed. As a control plates with the pathogen and with acidified ethanol they were used. Three plates were used per treatment. The plates were incubated at 28 ° C and were checked daily for 8 days to measure the growth inhibition halo of the pathogen and subsequently data were converted to percentages. An analysis by gas chromatography coupled to mass of the fractions of both tested strawberry varieties were performed to determine the compounds that could be attributed to antimicrobial activity. The results showed a growth inhibition of 31.52% *B. cinerea* with total extracts of var. Festival and 30.8% with var. Zamora and 100% inhibition of mycelial growth of the fungus with fractions of both extracts. In the case of *C. gloeosporioides*, total extracts and its fractions from both varieties allowed growth inhibition of 100%. The compounds present in the major peak fractions analyzed both varieties corresponded to cyanidin 3 glucoside and pelargonidin 3 glucoside, both anthocyanins presents in strawberry fruits.

I.0 Introducción

Dentro de los microorganismos que afectan en la agricultura, los hongos son el grupo que más enfermedades suelen ocasionar a las plantas cultivadas, debido a que pueden afectar tanto a los tejidos radicales como a los tejidos aéreos (tallos, hojas, flores y frutos). Además, la mayoría de los géneros y especies de hongos fitopatógenos poseen una gran capacidad de adaptación y distribución. De esta manera, los daños ocasionados por los fitopatógenos pueden ser muy diversos y van desde la disminución de la producción de las plantas hasta la muerte de las mismas, lo cual puede representar pérdidas económicas significativas para los agricultores ([Juarez, Sosa y López, 2010](#)).

El principal método utilizado para controlar o erradicar a estos microorganismos ha sido la utilización de fungicidas químicos sintéticos, principalmente debido a su rápida acción, amplio espectro de acción y efectividad. Sin embargo, la utilización masiva y muchas veces errónea de estos productos se ha visto reflejada negativamente en el ambiente con la contaminación de diversos cuerpos de agua, la eliminación de microorganismos benéficos y daños a la salud humana, entre otros. Además, se ha visto que el uso de estos productos ha incrementado la población de organismos fitopatógenos resistentes, lo cual conlleva a un aumento significativo de los costos de producción debido a que se hace necesario aumentar el número de aplicaciones de dichas sustancias químicas ([Muiño, 2007](#)).

Esta situación ha llevado a la búsqueda de nuevas alternativas para la protección de los cultivos contra la acción de microorganismos fitopatógenos, cuya actividad, selectividad y seguridad ambiental sea adecuada. En este sentido, se han propuesto diversas alternativas dentro de las cuales se destaca el uso de extractos vegetales (metabolitos secundarios) como bioplaguicidas ([Bernal, 2005](#)).

Los compuestos derivados de las plantas han resultado ser una fuente atractiva de productos potenciales para el control de fitopatógenos, no sólo por su diversidad en estructuras químicas, sino por su acción biológica específica, su bajo costo y su carácter inocuo sobre el ambiente y la salud humana. Se han reportado alrededor de 3000 compuestos de origen natural con propiedades fungicidas, insecticidas, bactericidas, nematocidas y repelentes, y se estima que

estas propiedades son atribuidas frecuentemente a algunos metabolitos secundarios (Celis, 2009).

En este contexto encontramos a las antocianinas, que son los pigmentos responsables de la gran gama de colores que abarcan desde el rojo hasta el azul en varias frutas, vegetales y cereales. Estos pigmentos, pertenecientes al grupo de los flavonoides, han sido de gran interés debido a sus propiedades químicas y bioactivas, tales como: antiinflamatorios, antihipertensivos, antitumorales, anticancerígenos y antimicrobianos (Astrid, 2008).

Ante esta panorámica, se propuso el uso de antocianinas de frutos de fresa (*Fragaria x ananassa*) como una posible alternativa ecológica para el control de hongos fitopatógenos de importancia en la región, que permita reducir el uso de fungicidas y su impacto negativo en el ambiente y la salud humana. Dicha investigación partió de un trabajo previo, realizado en el Centro de Investigaciones Interdisciplinario para el Desarrollo Integral Regional (CIIDIR) ubicado en el municipio de Jiquilpan, Michoacán, donde se encontró que las antocianinas totales extraídas de frutos de fresa presentaban actividad fungicida frente a algunas cepas de hongos fitopatógenos.

Esta investigación surgió con el objetivo de identificar cuáles son los compuestos que poseen esta actividad biocontroladora sobre hongos fitopatógenos, y determinar las concentraciones mínimas inhibitorias y las concentraciones mínimas letales, para hacer un uso más racional de dichos compuestos.

Es importante mencionar que en México la fresa se cultiva en 11 estados, entre los cuales Michoacán ocupa el primer lugar, destacando tres grandes zonas productoras: el Valle de Zamora, la región de Panindícuaro y el Valle de Maravatío, de las cuales la primera es considerada como la de mayor producción (Tlatelpa, 2011). Lo anterior muestra la alta disponibilidad de material vegetal en la región para la obtención de tales compuestos.

Otro punto muy importante a resaltar es que la fresa tiene una vida de anaquel muy corta, debido a su susceptibilidad, tanto al daño causado por microorganismos, como al daño físico en las etapas de cosecha, distribución y almacenamiento (Martínez, Mercado, López, y Prieto, 2014). Esto ocasiona que

en cada temporada de cosecha se desechen cantidades importantes de dicha frutilla, las cuales pudieran ser aprovechadas para este fin.

1.1 Hongos fitopatógenos

Los hongos fitopatógenos son microorganismos que provocan enfermedades en las plantas. Dichos patógenos producen en sus hospederos una amplia variedad de síntomas, tales como clorosis, necrosis, cribados, canchales, tizones, podredumbres húmedas o secas, agallas, costras, marchitamientos, pústulas, entre otros ([Urbina, 2011](#)).

Se considera que existen alrededor de 8000 especies de hongos que producen enfermedades en las plantas, es sabido que la mayoría de las plantas son susceptibles a ser atacadas por algún tipo de hongo, y también se sabe que un mismo hongo fitopatógeno puede infectar a una o más especies de plantas, aun siendo de diferente familia ([García, 2005](#)).

1.1.1 Importancia de los hongos fitopatógenos

En la agricultura mundial, los hongos fitopatógenos afectan a los diversos cultivos: hortalizas, cereales y frutales, tanto en etapas precosecha como en postcosecha. Generando importantes pérdidas económicas, ya que no sólo representan una limitante en la producción de los cultivos sino que se convierten en un verdadero reto en cuanto a su control o erradicación, puesto que independientemente del método de control utilizado, los costos de producción se ven aumentados considerablemente ([Juarez, Sosa y López, 2010](#)).

Algunos hongos fitopatógenos producen sustancias tóxicas, conocidas como micotoxinas, las cuales al ser ingeridas pueden provocar micotoxicosis. Aunque este nombre es muy general, los efectos provocados pueden ser muy diversos. Los alimentos contaminados con mayor frecuencia son aquellos que se almacenan por periodos prolongados y que dan oportunidad al desarrollo de los hongos, tal es el caso de los granos y/o cereales ([García, 2005](#)).

A nivel mundial, en la agricultura los hongos fitopatógenos representan el grupo de microorganismos más importantes desde el punto de vista económico, debido a su frecuencia de aparición y daño que pueden causar. Puesto que además de

ser muy diversos, tienen una gran capacidad de reproducción, lo cual dificulta su control. A continuación se detallan algunas características de los hongos fitopatógenos utilizados en esta investigación.

1.1.2 *Botrytis cinerea*

1.1.2.1 Descripción del género *Botrytis*

El género *Botrytis* constituye un grupo de hongos fitopatógenos ampliamente conocido, alberga 26 especies y tiene un gran número de hospederos específicos. En dicho género podemos encontrar hongos que parasitan a una sola especie vegetal, como *B. tulipae*, *B. squamosa* o *B. fabae*, patógenos de tulipán (*Tulipa* spp.), cebolla (*Allium cepa*) y haba (*Vicia faba*) respectivamente, y una especie denominada *B. cinerea* capaz de infectar al menos a 235 especies distintas de plantas, causando la enfermedad conocida como “Podredumbre Gris” o “Botrytis” (Carbú, 2006).

1.1.2.2 Importancia de *B. cinerea*

B. cinerea es un hongo necrotrófico señalado como el agente causal de la podredumbre gris. Es un fitopatógeno que puede afectar a más de 200 especies, tanto en campo como en jardines y almacenes. Este hongo puede infectar a las plantas en cualquier etapa de desarrollo, y ha sido encontrado en todas las partes de las plantas, incluyendo hojas, peciolo, raíces, frutos, flores y semillas (Valiuskaite, Surviliene y Baniulis, 2010).

Además, el ataque no sólo se produce sobre los cultivos en desarrollo, donde el hongo coloniza rápidamente los tejidos y destruye la planta, sino que también provoca enfermedades post-cosecha, comenzando con una infección latente en el cultivo y desarrollándose posteriormente durante la recolección, transporte y almacenamiento (Carbú, 2006).

Aunque su desarrollo óptimo se da bajo condiciones de elevada humedad relativa (alrededor del 95%) y temperaturas desde 0°C a 25°C (Álvarez, 2012), ha sido reportado como causante de cuantiosas pérdidas en la agricultura en regiones de

clima templado como es el caso de España, en áreas secas y desérticas de Israel, y en zonas frías como Alaska (Carbú, 2006).

El gran número de hospederos, su distribución y la importancia de los daños que ocasiona hacen que se tenga un enorme interés en diferentes aspectos como su fisiología, bioquímica, patogenicidad y alternativas de control.

1.1.2.3 Características morfológicas de *B. cinerea*

El micelio de *B. cinerea* (Figura 1) está conformado por un conjunto de filamentos (hifas) septados, cilíndricos, los cuales al inicio de su formación se ven hialinos (de aspecto transparente) y con el paso del tiempo se tornan pardas o negras. Dichas estructuras se multiplican mediante división citoplasmática, siendo común que se lleven a cabo divisiones nucleares sin que el citoplasma se haya dividido, lo cual da origen a hifas cenocíticas con un número variable de núcleos. La coloración y tamaño de las hifas dependen en gran parte de las condiciones de desarrollo del hongo. A partir de dicho micelio, se forman estructuras como los conidióforos y microconidióforos (estructuras especializadas en la producción de conidios y microconidios) y esclerocios, cuya función está relacionada con la propagación y supervivencia del hongo ante condiciones desfavorables (Carbú, 2006).

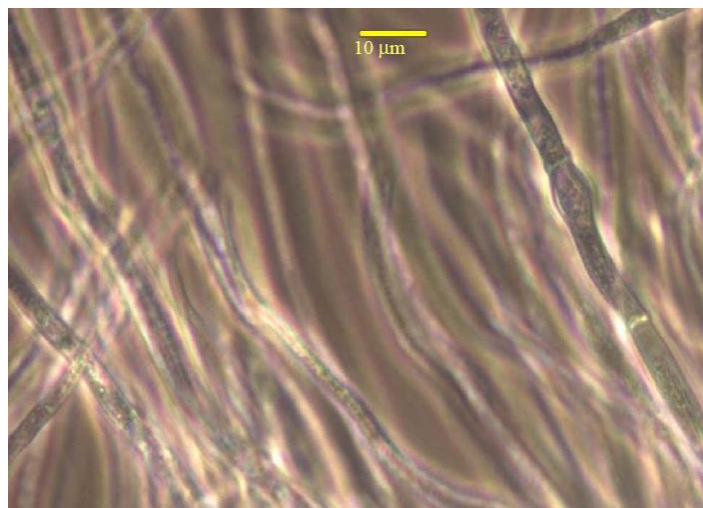


Figura 1. Micelio de *B. cinerea* (Tomada de Carbú, 2006).

Los macroconidióforos (Figura 2), que también pueden generarse a partir de esclerocios, constan de un filamento recto que se ramifica en la zona apical, y a

su vez estas divisiones presentan ramificaciones secundarias. Dichas estructuras presentan en su zona terminal una vesícula globosa sobre la cual se disponen los conidios, los cuales se forman a partir de la gemación de células especializadas (Carbú, 2006).

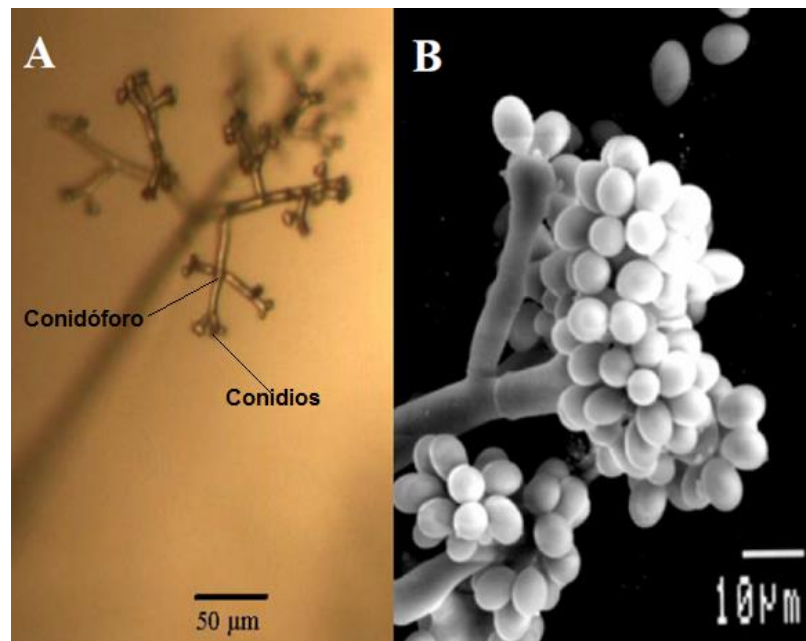


Figura 2. Conidióforos y conidios de *B. cinerea* (Tomada de Carbú, 2006).

Los conidios (Figura 3) son estructuras globosas o elípticas con dimensiones que oscilan entre 6-8.4 μm de sección transversal y 8-11 μm de longitudinal. Son la principal estructura de dispersión y unas de las estructuras de resistencia de *B. cinerea*, y aunque son capaces de mantener su viabilidad y capacidad infectiva durante toda la etapa de crecimiento del cultivo, su viabilidad depende de diferentes condiciones ambientales como la temperatura, humedad y luz solar, siendo el espectro de luz UV el principal factor en la mortalidad de éstos. De igual manera se forman microconidios, estructuras muy similares a los conidios pero de menor tamaño, cuya función fundamental es la de participar como gameto masculino dentro del ciclo sexual del hongo, aunque también se le atribuye una función de estructura alternativa de resistencia (Carbú, 2006).

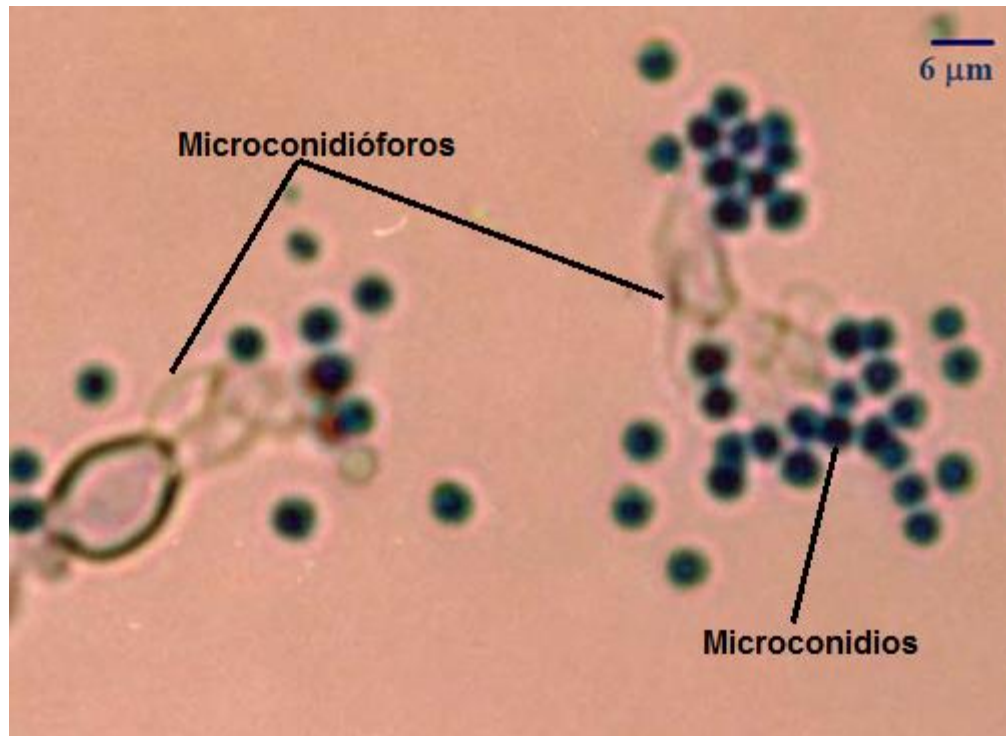


Figura 3. Microconidióforos y microconidios de *B. cinerea* (Tomada de [Carbú, 2006](#)).

Los esclerocios (Figura 4) son las principales estructuras de resistencia de *B. cinerea*. Son órganos pluricelulares de morfología plano-convexa, con dimensiones que oscilan entre 1-5 μm de sección transversal y 1-15 μm longitudinal. Son resultado de la fusión de múltiples hifas que se compactan y toman una coloración oscura debida a la acumulación de melanina. Su formación depende de factores como la temperatura, la luz, el pH y la composición del tejido sobre el cual se desarrollan. Aunque su principal función está relacionada con la supervivencia del hongo en condiciones adversas debido a su compacta morfología y a la alta acumulación de sustancias nutritivas, también juegan un papel importante en el ciclo sexual del hongo participando como gameto femenino; además, poseen una gran capacidad para producir conidióforos ([Carbú, 2006](#)).



Figura 4. Esclerocios de *B. cinerea* (Tomada de [Carbú, 2006](#)).

A nivel macroscópico, este hongo presenta colonias de crecimiento moderado de color blanco grisáceo, y aunque dichas colonias pueden ser de tipo micelial, conidial o esclerocial, según su tipo de crecimiento, la coloración gris pardo predomina a medida que las colonias envejecen. Las colonias de tipo micelial y conidial son de crecimiento rápido, abundante y algodonoso, mientras que las de tipo esclerocial son de crecimiento lento, de micelio escaso, con abundantes esclerocios de color negro distribuidos en el medio ([Poveda, 2006](#)).

1.1.2.4 Clasificación taxonómica de *B. cinerea*

B. cinerea es el hongo más importante del género Botrytis. Es el estado imperfecto de *Botryotinia fuckeliana* ([Poveda, 2006](#)). Aunque la mayoría de los taxónomos recomiendan que el nombre científico dado sea el del estado sexual, y por tanto sería *B. fuckeliana* el nombre específico que debería emplearse, es el binomio latino *B. cinerea* el utilizado, debido a que se encuentra ampliamente reconocido por micólogos y fitopatólogos, y a que es el estado más extendido en la naturaleza ([Carbú, 2006](#)).

En la tabla 1 se muestra su clasificación taxonómica.

Tabla 1. Clasificación taxonómica de *Botrytis cinerea* (Tomada de [Álvarez, 2012](#)).

Clasificación taxonómica	
Reino:	Fungi
División:	Amastigomycota
Subdivisión:	Deuteromycota
Clase:	Deuteromycetes
Subclase:	Hyphomycetidae
Familia:	Moniliales
Orden:	Moniliaceae
Género:	<i>Botrytis</i>
Especie:	<i>B. cinerea</i>

1.1.2.5 Ciclo biológico de *B. cinerea*

B. cinerea posee una fase sexual o perfecta y una fase asexual o imperfecta (Figura 5). La fase asexual se caracteriza por la proliferación de hifas hasta formar el micelio, de donde surgen los conidióforos, donde a su vez se forman los conidios, los cuales puestos en contacto con el sustrato y en condiciones adecuadas, germinan dando lugar a un nuevo micelio. Además, a partir del micelio se pueden originar los microconidióforos que forman los microconidios y los esclerocios ([Carbú, 2006](#)).

El ciclo sexual del hongo implica la fecundación del cuerpo ascógeno por parte de los microconidios de cepas que sean sexualmente compatibles entre sí. A partir del cual puede desarrollarse el apotecio, y en este a su vez se forman las ascosporas, las cuales al encontrarse en condiciones adecuadas con suficientes nutrientes pueden llegar a germinar y dar lugar a un nuevo micelio ([Carbú, 2006](#)).

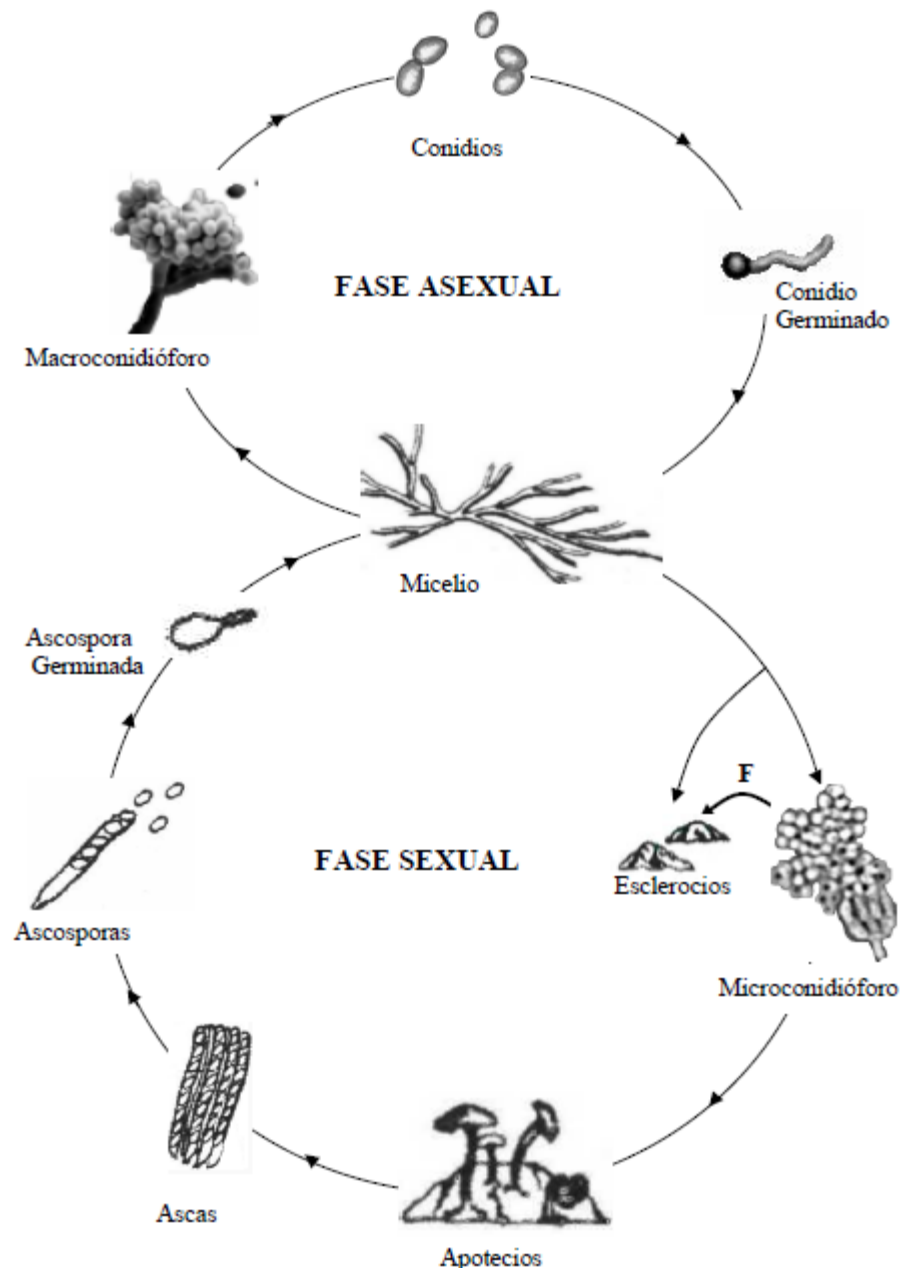


Figura 5. Ciclo biológico de *B. cinerea*, F: fecundación (Tomada de [Carbú, 2006](#)).

1.1.2.6 Ciclo de infección de *B. cinerea*

La infección se puede dar a través de heridas, tejido muerto o en decaimiento, y/o por penetración directa a través de aperturas naturales. Los eventos principales de la infección son la adhesión del conidio a la cutícula, la germinación y desarrollo del tubo germinal, el desarrollo y maduración del apresorio, y finalmente el crecimiento y esporulación del patógeno dentro del huésped ([Poveda, 2006](#)).

En la primera etapa de la infección ocurre una interacción entre los conidios y la superficie de la planta, para lo cual los conidios deben estar hidratados. Después de que el conidio ha sido incubado durante algunas horas bajo condiciones que permitan su germinación, los tubos germinados se unen fuertemente a su sustrato. Durante la etapa de introducción al huésped la hifa de penetración acumula componentes del citoesqueleto y secreta una variedad de enzimas degradadoras (exo y endo poligalacturonasas) para penetrar la pared celular de las células vegetales. Se ha reportado que *B. cinerea* produce una matriz extracelular implicada en la adhesión de los conidios germinados a la superficie de la planta, además de evitar la desecación de éstos y proporcionar resguardo a las enzimas y toxinas requeridas en el proceso de infección (Poveda, 2006).

Una vez que la hifa de penetración llega hasta el sitio apropiado, se forma el apresorio, el cual es una estructura que aumenta el área de contacto y la fijación entre el hongo y la superficie del hospedero, de tal forma que la hifa infectiva pueda penetrar hasta entrar en contacto con el protoplasma de la planta. Seguido de dicha penetración inicia la colonización y el crecimiento *in planta*, donde las células infectadas colapsan y se desintegran provocando el agrietamiento de la epidermis y permitiendo que el hongo fructifique abundantemente, a tal grado que los conidióforos emergen a la superficie e inician la esporulación (Poveda, 2006).

Los conidios producidos representan el mayor inóculo para otros brotes debido a que pueden ser distribuidos por corrientes de aire, agua o insectos. Aunque las temperaturas óptimas de infección se encuentran entre 10-20°C, ésta puede ocurrir por debajo de los 2°C y por encima de los 25°C (Poveda, 2006).

1.1.3 *Colletotrichum gloeosporioides*

1.1.3.1 Descripción del género *Colletotrichum*

Colletotrichum es un habitante muy común en los cultivos y con frecuencia no ocasiona síntomas de enfermedad en los órganos de la planta; en los frutos de algunas especies frutales solo se manifiesta cuando el pericarpio es debilitado, o cuando ocurren aumentos en los niveles de etileno como resultado de procesos de maduración de los frutos (Adaskaveg y Hartin, 1997).

Colletotrichum es un género importante de hongos que está conformado por 39 especies (Sutton, 1992) que causan antracnosis o tizones en una amplia gama de cultivos agrícolas y plantas ornamentales (Bailey y Jeger, 1992; Latunde-Dada, 2001).

La descripción está basada en las características culturales de la colonia en medio de cultivo, tamaño y forma de los conidios y apresorios, presencia o ausencia de setas y su telemorfo (Freeman et al., 1998). Sin embargo, la considerable variación patogénica y morfológica que presenta este hongo ha ocasionado dificultades para su clasificación al usar únicamente caracteres morfológicos (Johnston y Jones, 1997; Sutton, 1980).

1.1.3.2 Importancia de *C. gloeosporioides*

C. gloeosporioides Penz. Sacc. es el agente causal de la antracnosis. Es un hongo de distribución cosmopolita y con predominancia en los trópicos. Puede infectar en temperaturas entre 20°C y 28°C, pero su temperatura óptima es de 27°C, en ambientes con humedad relativa del 80% al 100%. El pH óptimo para su crecimiento se encuentra entre 5.5 y 7 (Rodríguez, 2009).

1.1.3.3 Características morfológicas de *C. gloeosporioides*

Este hongo posee hifas septadas y produce apresorios ovalados con una coloración café, cuyas dimensiones varían de 4 a 12 µm de longitud. Sus conidios son hialinos de forma cilíndrica y tamaños variables (Rodríguez, 2009).

1.1.3.4 Clasificación taxonómica de *C. gloeosporioides*

C. gloeosporioides es la fase asexual o imperfecta de *Glomerella cingulata*. Su clasificación taxonómica se muestra en la tabla 2.

Tabla 2. Clasificación taxonómica de *C. gloeosporioides* (Tomada de [Rodríguez, 2009](#)).

Clasificación taxonómica	
Reino:	Fungi
Phylum:	Ascomycota
Clase:	Sordariomycetes
Subclase:	Sordariomycetes incertae sedis
Orden:	Phyllachorales
Familia:	Phyllachoraceae
Género:	Colletotrichum
Especie:	Gloeosporioides

1.1.3.5 Ciclo biológico de *C. gloeosporioides*

El género *Colletotrichum* tiene una enorme variación ecológica, morfológica y patogénica, las diferentes formas en la naturaleza varían desde saprófito a cepas parasíticas ([Mena, 1999](#)). *C. gloeosporioides* es el agente causal de una diversidad de daños y síntomas en diferentes frutales tropicales y subtropicales en México y afecta diferentes órganos vegetales de la planta, así como en distintas etapas fenológicas del cultivo. Para 1992 se reconocieron 900 especies de *Colletotrichum* y cerca de 600 variantes de *C. gloeosporioides* ([Bailey y Jeger, 1992](#)). [Bonde et al. \(1991\)](#), distinguieron varias formas patogénicas basadas en los hospederos específicos y características culturales ([Gutiérrez et al., 2001](#)).

Las conidias son producidas en masas mucilaginosas típicamente hundidas, de color rosado y con un contorno irregular en las lesiones necróticas, este tipo de lesiones que con frecuencia se observa sobre las hojas, frutos y ramas es conocido como antracnosis; sin embargo en algunos frutos también es frecuente observar lesiones como chancros, cicatrices, verrugas o costras con relieve ([Mena, 1999](#)).

Una característica de las especies de *Colletotrichum*, es que pueden causar infecciones latentes o quiescentes sobre los frutos, que posteriormente se desarrollan durante la fase de maduración. Las diferentes especies sobreviven

por largos periodos sobre los desechos vegetales o en el suelo; el patógeno más común en los trópicos es *C. gloeosporioides* (Holliday, 1995).

Las infecciones quiescentes en el contexto de enfermedades en postcosecha involucran la inhibición del desarrollo del patógeno a través de condiciones fisiológicas impuestas por el hospedero hasta que se lleva a cabo el estado de maduración. Una vez que el hongo penetra la capa exterior del fruto, este permanece allí en estado de quiescencia o dormancia hasta que ocurren cambios en la superficie del fruto los cuales proporcionan las condiciones adecuadas para permitir una infección (Contreras, 2006).

1.1.3.6 Ciclo de infección de *C. gloeosporioides*

El inóculo del microorganismo que ha sobrevivido en hojas, frutos y ramas afectadas causa la infección de los frutos por la dispersión de las conidias transportadas en el agua (Adaskaveg y Hartin, 1997). Una vez dispersas, las conidias se adhieren a la superficie del hospedero y germinan en un periodo de 12 a 24 h y luego producen un tubo germinal que penetra la cutícula directamente. Las fuentes de inóculo son las conidias producidas en acérvulos o las ascosporas producidas y liberadas del peritecio. La hifa infectiva penetra directamente la cutícula colonizando la pared celular de las células del hospedero (Parra, 2008). Existen varias formas de penetración, una de ellas es a través de aberturas naturales como estomas, lenticelas y otras por penetración directa o a través de pequeñas heridas. La infección se puede desarrollar casi en cualquier tejido de la planta. Una vez que el microorganismo penetra la cutícula, se pueden presentar dos estrategias de infección: la primera es conocida como hemibiotrofia intracelular y la segunda como necrotrofia subcuticular e intramural (Agris, 2002).

Diversas especies de *Colletotrichum* presentan procesos infectivos en dos fases: la fase asintomática inicial, donde el patógeno se establece en los tejidos sin matar las células y son consideradas especies biotróficas (hemibiotrofia intracelular) y la fase destructiva visible (necrotrofia subcuticular), donde el patógeno crece bajo la cutícula y disuelve extensamente la matriz de péptidos de las células epidermales (Bailey y Jeger 1992). El desarrollo de la fase destructiva

se asocia a la hinchazón y disolución de las paredes celulares ([O'Connell et al., 2000](#)).

En condiciones favorables, el hongo puede crecer rápidamente en la planta y causar diversos síntomas muy rápidamente, pero en otras circunstancias el hongo puede permanecer quiescente dentro de los tejidos por un largo periodo, que en algunos casos solo se evidencia después de la cosecha. También bajo condiciones ambientales extremas puede permanecer en latencia por algún tiempo en el suelo o permanecer por largos periodos sobre tejido vegetal muerto ([Agrios, 2002](#)).

1.2. Métodos de control de hongos fitopatógenos

Con el fin de controlar las enfermedades causadas por distintos fitopatógenos, se pueden implementar diversos tipos de control, tales como: control cultural, químico, extractos vegetales, entre otros. A continuación se mencionan algunos aspectos generales sobre los tipos de control antes mencionados.

1.2.1 Control cultural

El control cultural está conformado por diversas prácticas cuyo fin es prevenir la infección de los cultivos, tratando de evitar las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, considerando que para que se presente una enfermedad son necesarias tres condiciones: la susceptibilidad del hospedero, la presencia del microorganismo patógeno y las condiciones favorables para el desarrollo del patógeno ([Álvarez, 2012](#)).

Dentro de las principales prácticas culturales empleadas para prevenir el desarrollo de estas enfermedades se encuentran las siguientes: evitar las siembras demasiado densas en condiciones de baja luminosidad, desinfección de semillas, controlar la aireación, calefacción y el riego en invernadero, hacer podas y deshojados a ras del tallo para no dejar sitios que sirvan para el desarrollo del patógeno, aplicación de una pasta fúngica en las heridas, retirar restos de cultivo y plantas afectadas por la enfermedad ([Infoagro, 2014](#)).

1.2.2 Control químico

El control químico se basa en el uso de compuestos químicos sintéticos a partir de sustancias tóxicas con acción biocida. Este tipo de control es el más utilizado debido a que se emplean tecnologías de fácil adopción y que ofrece resultados a corto plazo ([Álvarez, 2012](#)). En el caso de los hongos, las sustancias utilizadas para matarlos o inhibir su crecimiento son llamadas fungicidas. Existen diversos tipos de fungicidas, los cuales se pueden clasificar de acuerdo a su naturaleza química, momento de aplicación, sitio de aplicación, y mecanismo de acción ([Orozco, 2008](#)).

El control de *B. cinerea* se hace mediante aplicaciones (aspersiones y/o espolvoreaciones) de diferentes productos químicos que van en función del cultivo y el tejido afectado. De esta manera, en el caso de la pudrición de la lechuga (*Lactuca sativa*) se recomienda el uso de dicloran o zineb, en cultivos como el tomate (*Solanum lycopersicum*) o la cebolla (*Allium cepa*) es más adecuado utilizar fungicidas como difolatán, dyrene, maneb-zinc, maneb o clorotalonilo, y para pudriciones del fruto, como es el caso del moho gris de la fresa, se recomiendan aplicaciones de captán, thiram o benomyl ([Infoagro, 2014](#)).

Para el caso de *C. gloeosporioides* se han recomendado los fungicidas azoxystrobin, benomilo, captan, clorotalonil, imazalil, mancozeb, metil kresoxim, prochloraz y thiabendazol ([Santamaría et al., 2011](#)).

El uso de estos productos se ha justificado por el hecho de mantener los niveles de producción de alimentos en la agricultura ante una demanda cada vez mayor, dada por el constante aumento de la población ([Orozco, 2008](#)). Sin embargo su uso ha tenido algunos impactos negativos, los cuales se detallan en el siguiente apartado.

1.2.2.1 Consecuencias del uso de fungicidas químico sintéticos

El uso excesivo, y muchas veces erróneo, de los fungicidas químico sintéticos se ha visto reflejado de manera negativa en diferentes puntos, dentro de los cuales encontramos los siguientes: generación de especies resistentes, contaminación de diferentes cuerpos de agua, afección de la inocuidad de la fruta, daños a la

salud humana, eliminación de microorganismos benéficos y el incremento de los costos de producción (Cano, 2013).

En cuanto a la generación de especies resistentes, existen regiones donde se ha reportado la resistencia de *B. cinerea* a fungicidas químicos, tales como las dicarboximidias, anilino pirimidinas, carboxamidas y estrobirulinas, lo cual hace necesario aumentar las dosis de aplicación y la variedad de productos (Gepp et al., 2012). También hay reportes de la resistencia que *Colletotrichum gloeosporioides* ha desarrollado frente a estos productos. Gutiérrez et al., (2003), evaluaron la resistencia a benomil, thiabendazol y azoxystrobin en seis aislamientos de este fitopatógeno, obtenidos de frutos de guayaba con antracnosis colectados en Zitácuaro, Michoacán, México, y encontraron resistencia a dichos fungicidas en dos aislamientos.

En lo que se refiere a la contaminación del agua, esta se define como introducción de elementos bióticos o abióticos que causen efectos dañinos o tóxicos, perjudiquen los recursos vivos, constituyan un peligro para la salud humana, obstaculicen las actividades marítimas (incluida la pesca), disminuyan la calidad del agua o disminuyan los valores estéticos y de recreación. Los plaguicidas pueden llegar a estos ecosistemas por diferentes vías, vertimientos directos, escorrentías, lixiviación, volatilización, entre otras (Orta, 2002).

Una vez en el agua, la repercusión ecológica de estos productos puede ir desde pequeños trastornos hasta grandes disfunciones en los sistemas ecológicos. Aunque dichos efectos son muy variados y están con frecuencia interrelacionados, varían según el organismo y el tipo de plaguicida, por lo que es difícil formular afirmaciones de alcance general, lo importante es que muchos de estos efectos tienen consecuencias en toda la cadena trófica (Orta, 2002).

Esta problemática ha llevado a diversos investigadores a buscar nuevas alternativas para el control de tales patógenos, dentro de los cuales destaca el uso de extractos vegetales.

1.2.3 Extractos vegetales

Los extractos vegetales son mezclas complejas de metabolitos secundarios aislados de las plantas mediante diferentes métodos. Dichos metabolitos han

mostrado diversas propiedades biológicas como antiinflamatorios, antioxidantes, y anticancerígenos. Incluso, se han reportado con actividad biocida frente a una amplia gama de organismos como bacterias, hongos, protozoarios e insectos, siendo estas propiedades las que se pretenden aprovechar en la generación de alternativas para el control de fitopatógenos (García *et al.*, 2010).

El potencial de uso de extractos de plantas con propiedades antifúngicas ha sido demostrado a nivel de laboratorio y de campo. Alrededor del mundo hay más de 2000 especies de plantas que han sido reportadas con propiedades antimicrobianas, de las cuales más de 200 especies se encuentran en México (Castillo *et al.*, 2010).

Existen diversos trabajos en los cuales se han evaluado diferentes extractos vegetales para el control de hongos fitopatógenos. Zhang, Wu y Nan, (2014), realizaron un trabajo en el cual evaluaron dos diferentes extractos de *Achnatherum inebrians* (de plantas infectadas por *Neotyphodium gansuense* y de plantas libres de dicho hongo endófito) frente a una serie de hongos fitopatógenos. En dicho trabajo, los fitopatógenos evaluados mostraron dos tipos de respuesta a los extractos: en algunas especies se inhibió el crecimiento (*C. gloeosporioides*, *F. oxysporum*, *R. solani*, y otros) y en otras se promovió (*P. italicum*, *F. solani*, *T. viride*, entre otros). De la misma manera se pudo observar que mientras el extracto de plantas infectadas inhibió el crecimiento de *F. oxysporum*, el extracto de plantas no infectadas, promovió el crecimiento de dicho fitopatógeno. Siendo el extracto de plantas infectadas el que mostró inhibición del crecimiento de un mayor número de especies.

Bai *et al.* (2012), evaluaron un extracto de raíz de *Stellera chamaejasme* contra *Monilinia fructicola*. Obtuvieron porcentajes de inhibición de hasta un 88.71% a una concentración de 2000 µg/mL, una concentración mínima inhibitoria de 250 µg/mL, y una concentración mínima fungicida de 2000 µg/mL.

Pérez *et al.* (2011), evaluaron la actividad antifúngica de un extracto de hojas de *Melia azederach* sobre diferentes aislados de *Colletotrichum* sp. Utilizaron diferentes concentraciones: 1, 25, 50, 75 y 100 ppm, y obtuvieron porcentajes de inhibición de hasta el 100% a partir de una concentración de 50 ppm frente a algunas cepas, mientras que otras cepas presentaron resistencia.

Álvarez (2012), evaluó la actividad biocontroladora de un extracto de plantas de fresa sobre *B. cinerea*, tanto a nivel *in vitro* como *in vivo*. A nivel *in vitro*, un volumen de 125 µL redujo la producción de biomasa micelial en un 17.98%, mientras que volúmenes de 250 y 500 µL promovieron el incremento de biomasa. A nivel *in vivo* el extracto mostró inhibición de la enfermedad hasta en un 73.8%.

Por otra parte, Ávila *et al.* (2011) utilizaron un extracto de la parte aérea de *Piper septuplinervium* para el control *in vitro* de *Fusarium oxysporum* f. sp. Dianthi y *B. cinerea*, obteniendo un mayor efecto frente al primero de éstos. Los autores atribuyeron la actividad antifúngica de este extracto a la presencia de dos compuestos de tipo flavonoide: uvangoletina y chrysin.

1.2.3.1 Posibles mecanismos de acción usados para el bicontrol por extractos vegetales

Dentro de los posibles mecanismos que se han planteado sobre cómo los metabolitos secundarios presentes en los extractos vegetales inhiben el crecimiento de los microorganismos, la mayoría apunta a la membrana celular como el principal objetivo de dichos compuestos. Sin embargo, el mecanismo exacto sigue siendo poco caracterizado (Jing *et al.*, 2014).

Plodpai *et al.* (2013), indican que un extracto de *Desmos chinensis* provoca profundos cambios en la morfología celular de *Rhizoctonia solani*. Dichos cambios, como la apariencia rugosa de las células y la aparición de estructuras globulares en la superficie del micelio (Figura 6), se deben a alteraciones de la permeabilidad de la membrana celular, lo cual provoca que ésta se rompa y se desprenda de la pared celular en varios puntos (Figura 7). La consecuente desorganización de los organelos internos provoca una lisis celular total.

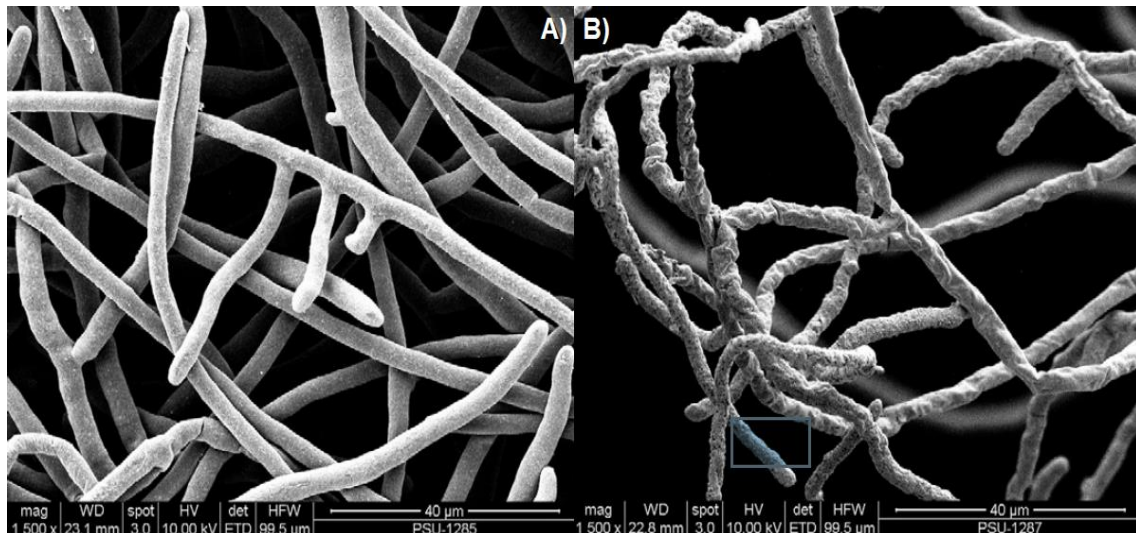


Figura 6. Hifas de *R. solani* afectadas por un extracto de *D. chinensis*: hifas saludables (A) e hifas afectadas (B) (Tomada de [Plodpai et al., 2013](#)).

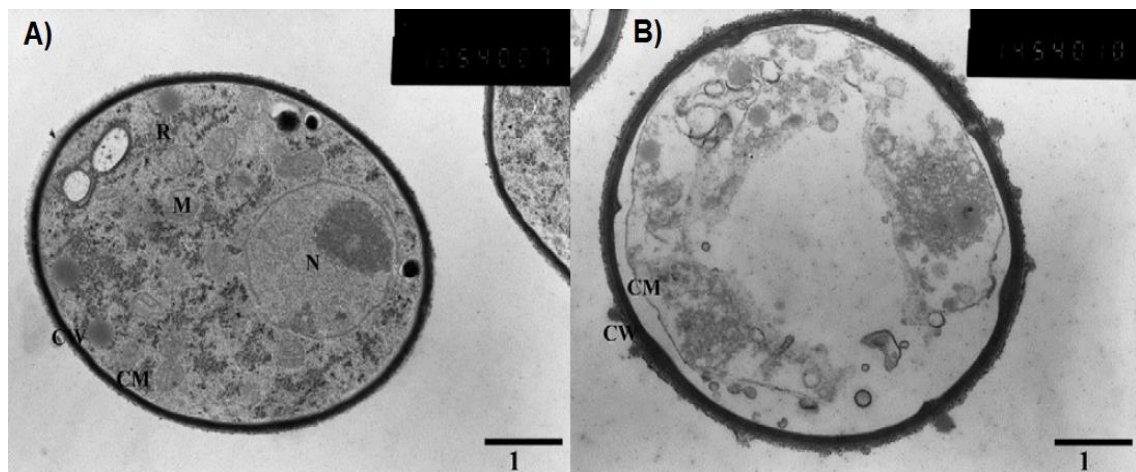


Figura 7. Células de *R. solani* afectadas por un extracto de *D. chinensis*: A) Célula de hifa saludable y B) Célula de hifa afectada. CM: membrana celular, y CW: pared celular (Tomada de [Plodpai et al., 2013](#)).

1.3 Metabolismo secundario de las plantas

A diferencia de otros organismos, las plantas presentan un gran número de rutas biosintéticas secundarias que conducen a la producción de compuestos conocidos como metabolitos secundarios. Refiriéndose a todos aquellos compuestos naturales que son sintetizados y utilizados por las células pero no son esenciales, sino que tienen un papel importante en la supervivencia de las plantas, actuando como señales moleculares dentro de la planta o entre la planta y microorganismos, en la defensa frente a herbívoros o en la atracción de insectos polinizadores y otros organismos que dispersen sus semillas. En la actualidad, se conocen alrededor de 20,000 estructuras de metabolitos secundarios, los cuales se clasifican en tres grupos de acuerdo a su composición química básica: compuestos fenólicos, terpenoides o isoprenoides y compuestos nitrogenados o alcaloides (Coromoto, 2014).

Los compuestos fenólicos se sintetizan a partir de los aminoácidos aromáticos formados en la ruta del ácido siquímico y a partir de la ruta del ácido malónico; los terpenoides se originan mediante la vía del ácido mevalónico y la ruta del metil-eritritol 4-fosfato; y la mayoría de los compuestos nitrogenados se sintetizan a partir de aminoácidos aromáticos sintetizados en la ruta del ácido siquímico, y de los aminoácidos alifáticos formados en el ciclo de Krebs (Figura 8) (Coromoto, 2014).

Las rutas biosintéticas son pocas frente a la gran variedad de metabolitos secundarios existentes, sin embargo, esto no las priva de una alta complejidad, ya que en sus etapas de biosíntesis suelen intervenir diferentes factores transcripcionales y enzimas reguladoras, siendo esencial la presencia y concentración de diversas moléculas, ya sea como precursores o como inhibidores. Además, la biosíntesis de una determinada clase de metabolitos secundarios depende de la constitución genética de la planta, es decir, está ligada a los diferentes estados de desarrollo del organismo, a células especializadas, o a periodos de estrés de distinta naturaleza (Coromoto, 2014).

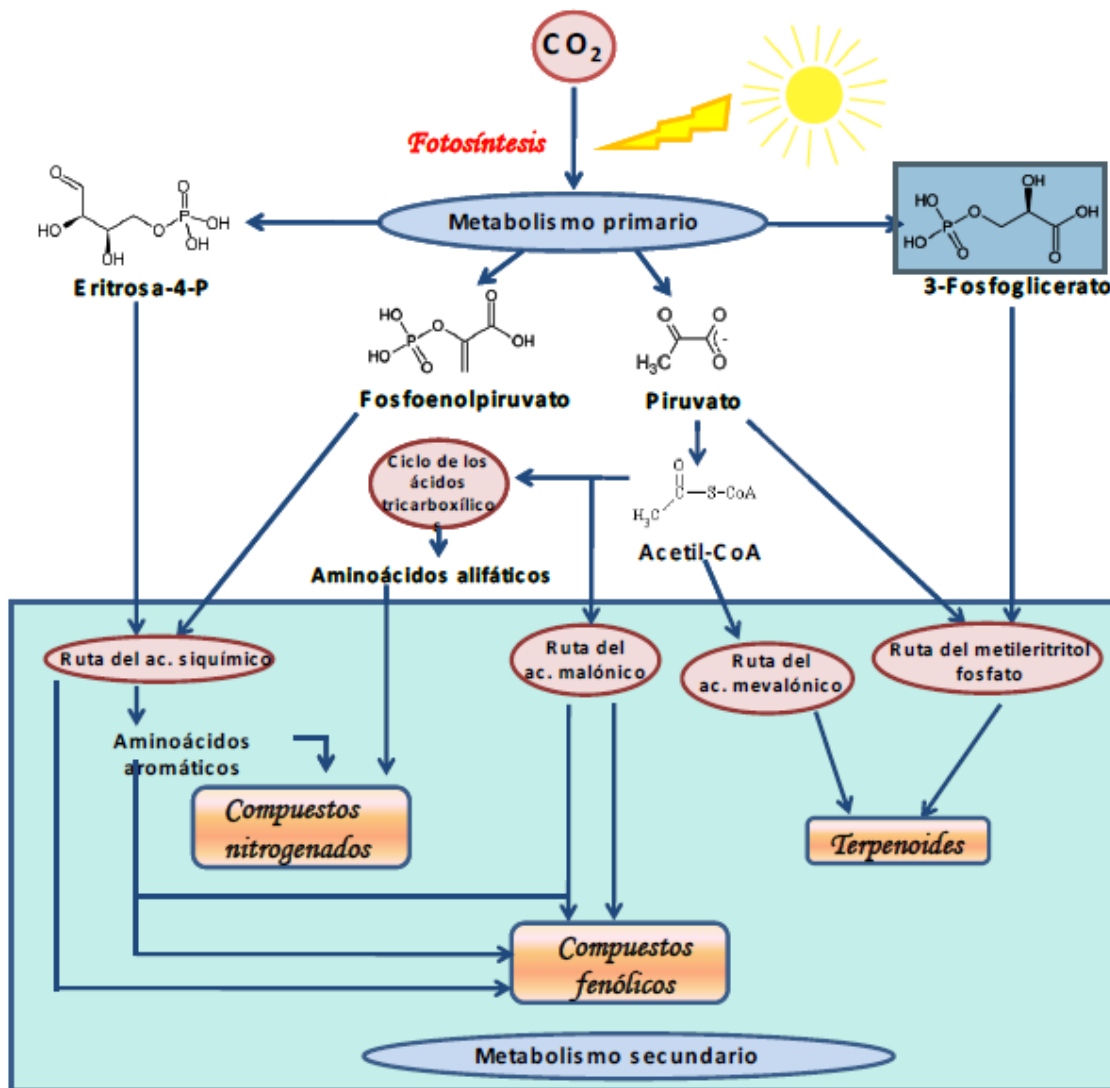


Figura 8. Principales rutas de biosíntesis (simplificadas) de los metabolitos secundarios en plantas (Tomada de Coromoto, 2014).

1.3.1 Compuestos fenólicos

Los compuestos fenólicos o polifenoles son uno de los principales grupos de metabolitos secundarios. Se dice que todos estos compuestos poseen al menos un anillo aromático sustituido con uno o varios grupos hidroxilo, sin embargo se excluyen aquellos compuestos cuya estructura principal derive de otras rutas biosintéticas. Con base en esto, para definir a los compuestos fenólicos es preferible enfocarse a su origen biosintético (Figura 9), definiendo a estas sustancias como aquellas derivadas de dos rutas principales: la del ácido siquímico y la del acetato-malonato. La combinación de estas dos rutas de biosíntesis da lugar a la formación de los flavonoides, el subgrupo de compuestos

fenólicos con mayor diversidad y distribución en el reino vegetal. Teniendo como precursores biosintéticos a un número limitado de moléculas: fosfoenolpiruvato, piruvato, acetato, acetyl-CoA y malonil-CoA (Coromoto, 2014).

La cantidad y complejidad de estos compuestos se ve aumentada debido a que pueden sufrir reacciones de condensación para dar lugar a oligómeros o polímeros y se complica aún más por el hecho de que la mayoría de estos compuestos se presentan en la naturaleza en forma conjugada, principalmente con una o varias moléculas de azúcar unidas a través de los grupos hidroxilo (Coromoto, 2014).

La síntesis y acumulación de los compuestos fenólicos están condicionadas por el estado de desarrollo general de la planta o de los órganos, tejidos o células considerados. La distribución de estos metabolitos está determinada por factores endógenos y exógenos como la luz, la temperatura o la interacción con agentes bióticos (Coromoto, 2014).

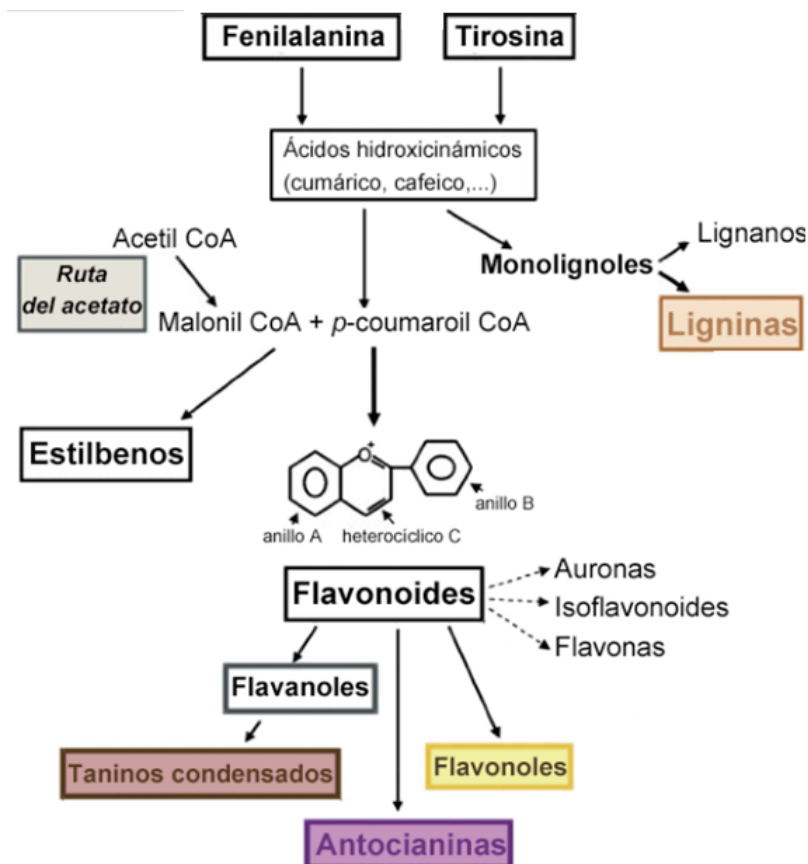


Figura 9. Ruta general biosintética de los compuestos fenólicos y sus principales subgrupos (Tomada de Coromoto, 2014).

1.3.1.1 Funciones de los compuestos fenólicos

Una de las funciones de los compuestos fenólicos en las células vegetales es el aumento de la rigidez de la pared celular a través de la formación de lignina o mediante la formación de puentes moleculares entre los diferentes componentes de la pared. También han sido implicados en la regulación de la división y expansión celular (Coromoto, 2014).

Su capacidad de regular (estimular o inhibir) la oxidación enzimática del ácido indol-3-acético (AIA) sugiere que los compuestos fenólicos participan en la modulación del crecimiento y desarrollo vegetal. De esta manera se ha establecido que los compuestos monofenólicos estimulan la oxidación del AIA mientras que los polifenoles inhiben a la enzima responsable de dicha degradación, mediante una interacción directa con tal enzima (Coromoto, 2014).

También se les atribuye un papel de agentes antioxidantes, mediante la desactivación de los radicales libres formados durante las reacciones enzimáticas. siendo esta propiedad la base de otra de sus funciones, ya que los flavonoides han sido involucrados en la protección de las células frente a la peroxidación de los lípidos, proceso que significa la rotura de las membranas celulares y la consecuente pérdida de la compartimentación y funcionalidad de la célula (Coromoto, 2014).

Finalmente, se encuentran las funciones ecológicas como la atracción de agentes polinizadores o dispersantes de semillas; el establecimiento de interacciones simbióticas; y la protección de la planta ante situaciones de estrés: protección frente al exceso de radiación UV, evitar la depredación aumentando la astringencia de los órganos donde se acumulan y la participación en la defensa de la planta frente a microorganismos patógenos, a través de diferentes mecanismos como el reforzamiento de las paredes celulares, efectos biocidas y otros (Coromoto, 2014).

1.3.2 Flavonoides

Dentro de los compuestos fenólicos se pueden establecer varios subgrupos con base en el número de átomos de carbono y a la estructura del esqueleto fenólico

básico. Así encontramos a los flavonoides, los cuales poseen una estructura química muy definida (Figura 10). De manera general son moléculas que poseen dos anillos bencénicos unidos a través de una cadena de tres átomos de carbono. Por esto comúnmente se les denomina simplemente como compuestos C6-C3-C6 (Martínez, 2005).

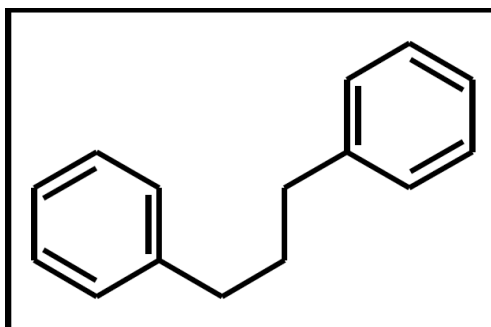


Figura 10. Estructura básica de los flavonoides (Tomada de Martínez, 2005).

Dependiendo del grado de insaturación y de oxidación de la cadena central de tres átomos de carbono se pueden distinguir diferentes tipos de flavonoides, y a su vez, dentro de éstos se puede hacer otra clasificación con base en el número y la naturaleza de los grupos sustituyentes unidos a los anillos (Coromoto, 2014). Con base en esto, los más de 4,000 flavonoides naturales se clasifican en varios grupos: antocianidinas, flavonoles, flavones, flavanoles, flavanonas, chalconas, dihidrochalconas y dihidroflavonoles (Martínez, 2005).

1.3.3 Antocianinas

Las antocianinas (del griego *anthos* que significa flor, y *kyanos* que significa azul) son el grupo más importante de pigmentos naturales visibles al ojo del ser humano, junto con la clorofila. Son los pigmentos responsables de la coloración rosa, naranja, roja, azul y violeta de las flores y frutos de algunas plantas (Castañeda *et al.*, 2009).

1.3.3.1 Química de las antocianinas

Son metabolitos secundarios que se clasifican dentro de los flavonoides, los cuales a su vez pertenecen al grupo de los compuestos fenólicos o fenilpropanoides (Gould, Davies y Winefiled, 2009).

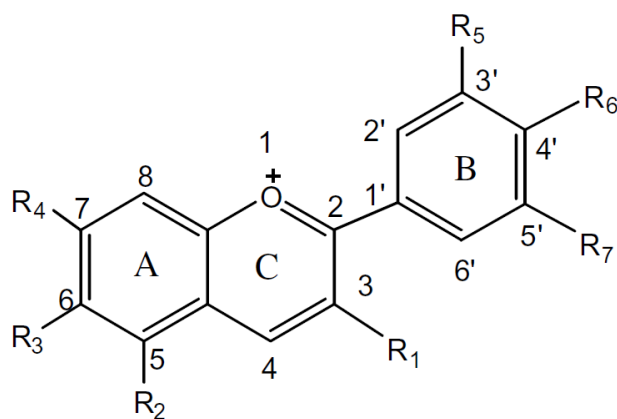


Figura 11. Estructura básica de las antocianinas (Tomada de [Castañeda et al., 2009](#)).

La estructura básica de las antocianinas (Figura 11) son las antocianidinas (o agliconas), las cuales constan de un anillo aromático (A) unido a un anillo heterocíclico que contiene oxígeno (C), el cual también está unido por un enlace carbono-carbono a un tercer anillo aromático (B). Cuando las antocianidinas se encuentran unidas a un azúcar son conocidas como antocianinas ([Castañeda et al., 2009](#)).

Se sabe que existen varios cientos de antocianinas, cuyas variaciones pueden ser en el esqueleto básico de la antocianidina, es decir, el número y la posición de los sustituyentes hidroxilo y metoxilo, donde hay seis variaciones comunes (Figura 12); la identidad, el número y la posición en el que los azúcares están unidos al esqueleto; y el grado de acilación del azúcar y la identidad del agente de acilación ([Clifford, 2000](#)).

De las 23 antocianidinas naturales que se conocen sólo seis son comunes en plantas vasculares: pelargonidina, peonidina, cianidina, malvidina, petunidina y delphinidina. Los glicósidos de las tres antocianidinas no metiladas (cianidina, delphinidina y pelargonidina) son los más extendidos en la naturaleza, puesto que están presentes en el 80% de las hojas pigmentadas, 69% de los frutos y 50% de las flores, siendo la cianidina y la pelargonidina las más abundantes ([Kong et al., 2003](#)).

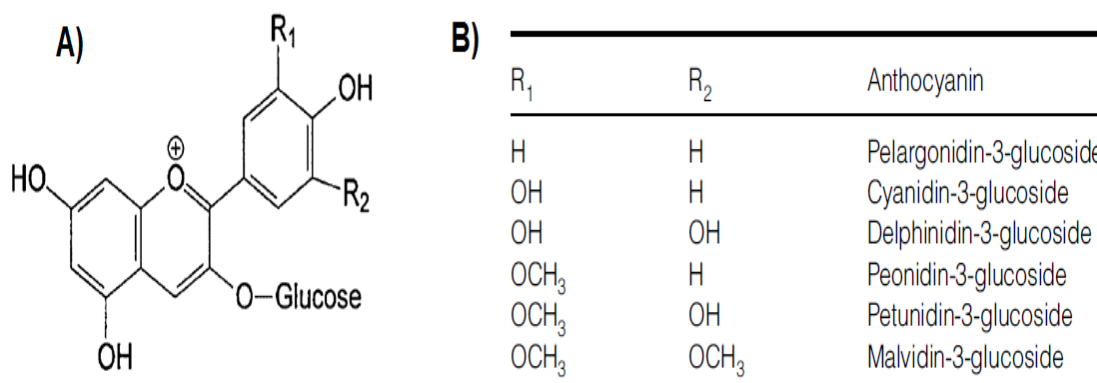


Figura 12. Esqueleto básico de una antocianina y posibles variaciones en cuanto a la posición de sustituyentes hidroxilo y/o metoxilo (Tomada de [Clifford, 2000](#)).

1.3.3.1 Funciones de las antocianinas

Aunque la principal función de las antocianinas es dar una coloración atractiva a las diferentes plantas que las contienen (para fines de dispersión) y proteger a las células vegetales de la radiación UV, se les atribuye actividad antimicrobiana y la participación dentro de la respuesta de las plantas frente a diversos tipos de estrés ([Gould, Davies y Winefield, 2009](#)). También pueden ser factores importantes en la resistencia de las plantas a los ataques de insectos o repelencia de herbívoros. En ese sentido se ha demostrado que la cianidina 3 -glucósido protege las hojas de algodón contra el gusano de las yemas del tabaco ([Kong et al., 2003](#)).

Por otro lado, las antocianinas poseen actividades farmacológicas y son usadas con fines terapéuticos. Han sido usadas para reducir la permeabilidad y fragilidad de los capilares sanguíneos, así como por su actividad antiinflamatoria. También han sido reportadas con la capacidad de inactivar especies reactivas de oxígeno, e inhibir la oxidación de lipoproteínas y la agregación de plaquetas. En algunos estudios han reportado la actividad antitumoral de las antocianinas presentes en el vino tinto ([Kong et al., 2003](#)).

1.4. La fresa (*Fragaria x ananassa*)

1.4.1 Historia de *F. x ananassa*

Los primeros registros que se tienen respecto al cultivo de frutillas data del año 1300, cuando en Francia se hicieron los primeros trasplantes de los bosques a los jardines. Se trataba de la frutilla silvestre denominada *F. vesca* (Figura 13). Esta planta era apreciada fundamentalmente como ornamental, debido a que poseía flores muy atractivas, más que por la utilización de su fruto con fines gastronómicos (Rosli, 2007). Hacia el año 1484 se publicó en Alemania la primera descripción botánica de esta planta, en el herbario Latino de Mainz (Bonet, 2010).

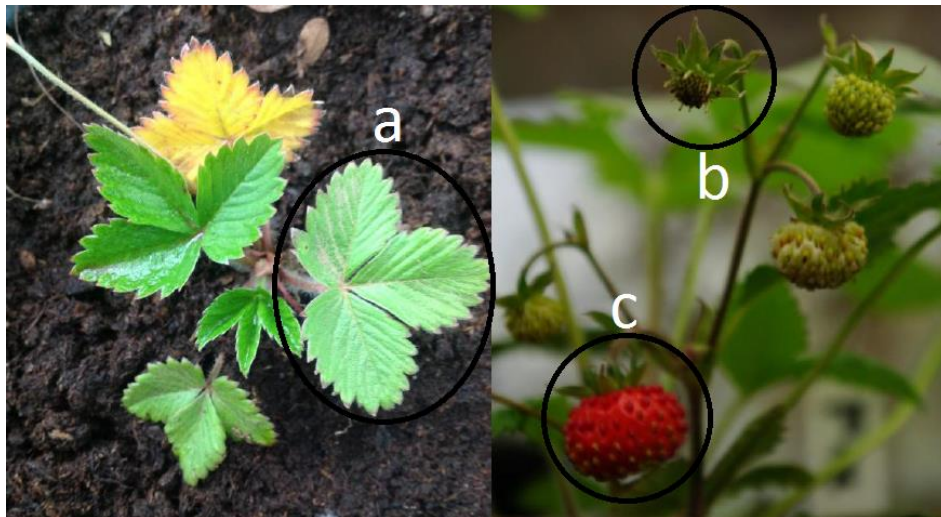


Figura 13. Descripción morfológica de *F. vesca*. Se muestra la hoja trifoliada (a), la inflorescencia (b) y el fruto (c) (Tomada de Smári, 2013).

Alrededor del año 1500, las referencias de este cultivo fueron más frecuentes y se le comenzaban a atribuir propiedades medicinales. En esos años también se describían otras especies agrupadas dentro de las frutillas silvestres como *F. moschata* y *F. viridis*. Una característica distintiva de las frutillas europeas de esa época era que poseían frutos de tamaño pequeño, de ahí su nombre. Posteriormente, alrededor del año 1600 se introdujo en Europa la especie *F. virginiana* proveniente del este de los Estados Unidos, la cual contaba con un mayor tamaño que las cultivadas hasta ese entonces. Sin embargo *F. vesca* continuó siendo la más cultivada durante muchos años (Rosli, 2007).

A principios de 1700, en una expedición del Rey Luis XIV de Francia, se transportaron especímenes de la frutilla cultivada por los indígenas de la zona centro y sur de Chile, y el este de la Argentina. Se trataba de *F. chiloensis* (Figura 14), una especie que poseía un fruto de mayor tamaño que el de la frutilla europea, hecho que despertó el interés de los botánicos de la época (Rosli, 2007). La fresa chilena se distribuyó a los jardines botánicos de Holanda, Inglaterra, Bélgica y Alemania, pero pronto se reportaron informes negativos, en los cuales se indicaban problemas importantes de esterilidad de dicha variedad (Bonet, 2010).



Figura 14. Morfología de *F. chiloensis*, cuya flor, a diferencia de *F. ananassa*, se conforma de seis pétalos (Tomada de Belov, 2006).

En 1766, el botánico Antoine Nicolas Duchesne realizó sucesivas cruces entre *F. virginiana* y *F. chiloensis* y generó el híbrido *F. x ananassa*, en el cual se veía superado el problema de esterilidad de *F. chiloensis* (Bonet, 2010). Por esta razón y por las sobresalientes características de los frutos, este híbrido no tardó en imponerse sobre las otras especies (Rosli, 2007).

1.4.2 Taxonomía *F. x ananassa*

F. x ananassa es una planta que pertenece a la familia de las Rosáceas y al género *Fragaria* (del latín *fragans*, que significa oloroso). Dentro de su género se

han descrito más de 150 especies, las cuales poseen frutos con diferente tamaño, color, aroma, forma y firmeza (Rosli, 2007). En cuanto a sus variedades, se tiene un registro de más de 1000 (Juárez, 2015). En la tabla 3 se describe más a fondo su clasificación taxonómica.

Tabla 3. Clasificación taxonómica de *F. x ananassa* (Tomado de Castillejo, 2011).

Superreino:	Eukaryota
Reino:	Plantae
Subreino:	Embryobionta
División:	Magnoliophyta
Clase:	Magnoliopsida
Subclase:	Rosidae
Orden:	Rosales
Familia:	Rosaceae
Subfamilia:	Rosoideae
Tribu:	Potentilleae
Subtribu:	Fragariinae
Género:	<i>Fragaria</i>
Especie:	<i>F. ananassa</i>

1.4.3 Descripción botánica de *F. x ananassa*

F. ananassa es una planta perenne de tamaño pequeño que se puede reproducir de manera sexual, a través de inflorescencias generalmente hermafroditas; y asexual, mediante el desarrollo de estolones, tallos rastreros que contienen una roseta de hojas en su extremo y que al entrar en contacto con el suelo emiten raíces adventicias (secundarias) y originan una nueva planta con características idénticas a las de la planta madre (Figura 15) (Bonet, 2010).

El tallo está comprimido en una estructura llamada corona, de la cual surgen las hojas, las inflorescencias y los estolones (Rosli, 2007). Los tallos florales no presentan hojas. Su sistema radicular es fasciculado y puede alcanzar una profundidad de 25 a 40 cm, dependiendo del tipo de suelo y de la incidencia de patógenos en el mismo (ICAMEX, 2005). Sus hojas son grandes, compuestas por

tres foliolos ovalados de bordes aserrados, tienen un color verde brillante por el haz y un color más pálido (cara inferior de la hoja), poseen una nervadura central muy prominente y vellosidad destacada, sus peciolo pueden alcanzar hasta los veinte centímetros de altura. Las flores o inflorescencias se componen de cinco pétalos, cinco sépalos y numerosos estambres, que se pueden desarrollar a partir de una yema terminal de la corona o de yemas axilares de las hojas. El fruto de la planta, que en realidad es un falso fruto o frutilla, es de forma ovoide, casi redonda, puede presentar desde un color rojo brillante a rosa o naranja y se caracteriza por su intenso aroma (Figura 15) (Castillejo, 2011).

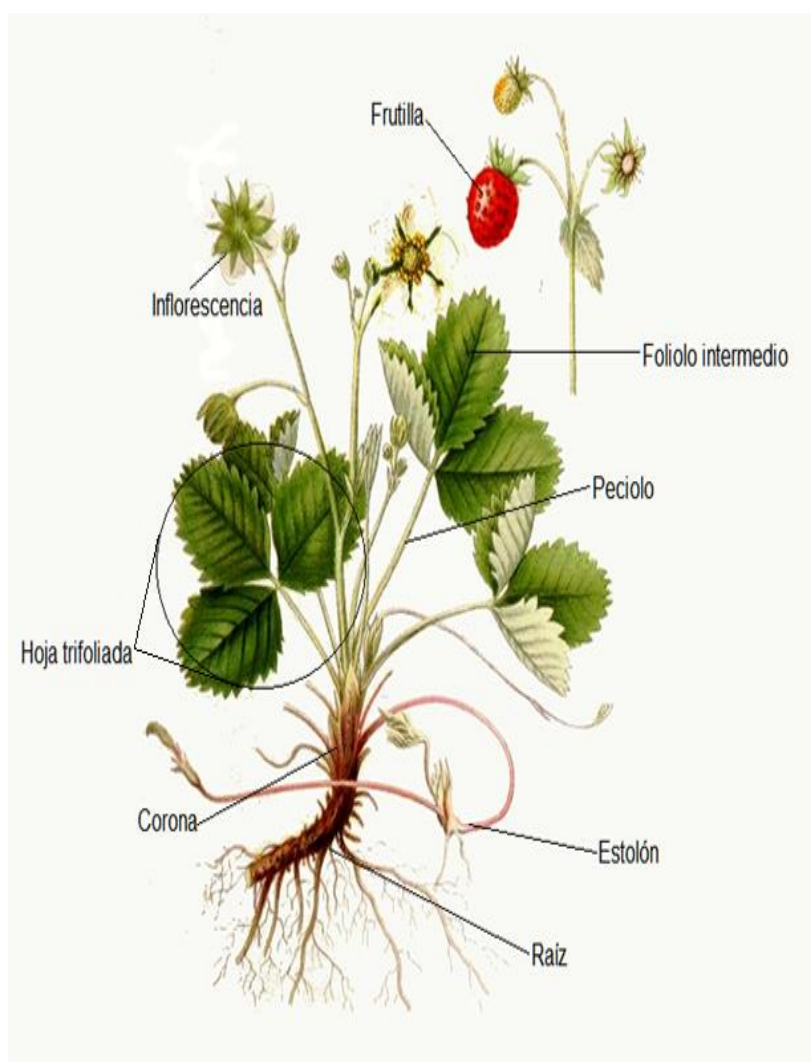


Figura 15. Morfología de *F. x ananassa* (Tomada de [Nuestro Huerto Mediterráneo, 2011](#)).

1.4.4 Importancia nutricional de *F. x ananassa*

La importancia de *F. ananassa* desde el punto de vista nutricional se debe a que es una excelente fuente de vitaminas A, B, C, E, potasio, fósforo y calcio (Tabla 4); y por tener un alto contenido de antioxidantes como los flavonoides y las antocianinas, lo que la convierte en un escudo contra diferentes enfermedades crónico-degenerativas como la artritis reumatoide, diabetes, cáncer, arterosclerosis, enfisema pulmonar e hipertensión arterial (Rivera, 2011).

Tabla 4. Contenido nutrimental de la fresa por cada 100 g de fruto fresco (Los alimentos, 2015).

Parámetro	Valor
Calorías (Kcal)	32.24
Carbohidratos (g)	5.51
Fibra (g)	1.68
Potasio (mg)	161
Fósforo (mg)	26
Magnesio (mg)	13.32
Calcio (mg)	21.47
Vitamina C (mg)	54.93
Vitamina E (mg)	0.23
Vitamina A (µg)	3

En la medicina natural es muy recomendada para limpiar el sistema digestivo. Además, se le atribuye una función importante en la síntesis de colágeno, proteína que da fuerza a los huesos y cartílagos del cuerpo (CONAFRE, 2007). También cabe mencionar que la gran cantidad de ácido ascórbico, lecitina y pectina contenida en esta frutilla la convierten en un alimento ideal para disminuir el nivel de colesterol en la sangre (Ávalos, 2009).

1.4.5 Importancia económica de *F. x ananassa*

La importancia económica de este cultivo se debe a que genera un gran número de empleos, desde la plantación, hasta la cosecha, así como en el proceso de empaque (Plan Rector Sistema Producto Fresa, 2004). Es un producto que puede

ser canalizado a diferentes industrias como la láctea, la panificadora, la de cereales y otras más (Paz, 2010).

Aunque en nuestro país sólo el 1% de la superficie dedicada a la agricultura es ocupado para el cultivo de fresa, su importancia se debe a que genera divisas (SAGARPA, 2005), dado que es un producto que tiene una fuerte orientación al mercado de exportación como producto para su consumo en fresco y congelado. En ambas presentaciones, las exportaciones de esta frutilla han sufrido variaciones en cuanto a volumen y valor de la exportación. A través de los años se ha tenido una notable tendencia al aumento en volumen de las exportaciones; ya que en el 2000 se exportaron 27,019.21 ton, en el 2005 fueron 35,102.70 ton, y en el 2010 se exportaron 155,948.65 toneladas (Tabla 5) (SAGARPA, 2012).

Tabla 5. Exportación de fresa mexicana (Tomada de SAGARPA, 2012).

AÑO	VOLUMEN EXPORTADO (Toneladas)	VALOR DE LAS EXPORTACIONES (Dólares)
1 1999	31,145.67	\$ 19'567,203
2 2000	27,019.21	\$ 15'323,593
3 2001	22,046.85	\$ 16'889,875
4 2002	31,938.37	\$ 17'220,399
5 2003	37,853.50	\$ 34'729,579
6 2004	37,025.24	\$ 49'060,638
7 2005	35,102.60	\$ 62'663,325
8 2006	94,114.75	\$ 77'526,315
9 2007	84,071.39	\$ 135'760,996
10 2008	115,163.15	\$ 134'677,901
11 2009	133,077.39	\$ 206'790,922
12 2010	155,948.65	\$ 255'779,383

En México, *F. ananassa* se cultiva en 11 estados, de los cuales Michoacán, Baja California y Guanajuato concentran la mayor superficie sembrada, generando el 91.55% del total de la producción nacional (Juárez, 2015). Dentro de estos tres estados Michoacán ocupa el primer lugar, ya que cuenta con tres grandes zonas productoras: el Valle de Zamora, la región de Panindícuaro y el Valle de Maravatío, dentro de las cuales la primera es considerada como la zona de mayor producción (Tlatelpa, 2011). Zamora es el productor número uno, con una superficie sembrada de 900 hectáreas. De los 19 municipios del estado que

siembran la fresa, le siguen Jacona con 600 ha, Tangancícuaro con 510 ha y Maravatío con 500 ha ([Perales, 2013](#)).

1.4.6 *F. x ananassa* como fuente de compuestos bioactivos

La fresa es una fuente rica de antioxidantes, nutrientes esenciales y fitoquímicos benéficos que pueden tener relevantes actividades biológicas. Dichos fitoquímicos son esencialmente flavonoides (principalmente antocianinas, y flavonoles en menor proporción), taninos hidrolizables (elagitaninos y galotaninos), ácidos fenólicos (ácido hidroxibenzoico y ácido hidroxicinámico), y taninos condensados (proantocianidinas) ([Fernandes et al., 2012](#)).

Las antocianinas son los compuestos fenólicos más conocidos, y cuantitativamente los más importantes, en fresas. Algunos estudios han reportado contenidos de antocianinas totales que van desde los 150 a 800 mg/kg de peso fresco. Y aunque se han reportado alrededor de 25 antocianinas diferentes en fresas de diferentes variedades, la Pelargonidina-3-glucósido es la mayoritaria, independientemente de factores genéticos y ambientales. La presencia de Cianidina-3-glucósido también parece ser una constante, aunque en menores proporciones. Además, aunque la glucosa parece ser el azúcar sustituyente más frecuente en antocianinas de fresa, en algunos cultivares se han encontrado rutinosa, arabinosa, ramnosa y conjugados ([Giampieri et al., 2012](#)).

Los elagitaninos son diferentes combinaciones de ácido gálico y ácido hexahidroxidifénico con glucosa. Poseen un amplio rango de estructuras: monómeros como glucósidos de ácido elálgico; oligómeros como sanguin H-6 (elagitanino más común en fresa), y polímeros complejos. Algunos estudios reportan contenidos que van de los 25-59 mg/100 g de fruto ([Giampieri et al., 2012](#)).

La fresa también contiene pequeñas cantidades de otros compuestos fenólicos, como derivados de quercitina y kaempferol. Flavonoles acilados tales como quercitina y kaempferol-3-malonilglucósido, y kaempferol-cumarilglucósido también han sido encontrados en algunos cultivares de fresa. También se pueden encontrar catequinas y procianidinas, las cuales son comunmente encontradas en la pulpa y los achenios, y que han sido reportadas con actividades antioxidantes,

antimicrobianas, antihipertensivas e inhibir la actividad de algunas enzimas y receptores (Giampieri *et al.*, 2012).

Algunos de estos compuestos presentes en la fresa han sido evaluados para el biocontrol de microorganismos: Puupponen *et al.* (2005), evaluaron los efectos de los extractos fenólicos de diferentes frutillas contra ocho patógenos de humanos (bacterias Gram + y Gram -), y encontraron que los elagitaninos inhibieron el crecimiento de *Staphylococcus aureus*. Hafidh *et al.* (2011), evaluaron un extracto metanólico de Col morada (*Brassica oleracea*) contra diferentes bacterias y hongos patógenos de humanos. La actividad antibacterial y antifúngica del extracto fue evidente frente a *S. aureus*, *Escherichia coli* O157:H7, *Pseudomonas aeruginosa*, *Klebsiella pneumoniae*, y *Salmonella typhimurium*; así como a *Trichophyton rubrum* y *Aspergillus terreus*, respectivamente. Los autores atribuyeron esta acción antimicrobiana a las antocianinas, las cuales fueron los compuestos fenólicos más abundantes en el extracto.

Es importante mencionar que aunque el genotipo es el factor más importante en la calidad nutricional de los frutos, las condiciones del cultivo (condiciones ambientales y técnicas de cultivo), así como la etapa de maduración y las condiciones postcosecha también afectan. Fernandes *et al.* (2012), evaluaron la influencia de las prácticas de Agricultura Orgánica (AO) y Manejo Integrado de Plagas (MIP) sobre el contenido de fenoles totales en 22 muestras de fresas a partir de cuatro variedades. Este estudio mostró que el contenido total de compuestos fenólicos fue más alto en los extractos de fresa bajo prácticas de AO, y que la principal diferencia en fitoquímicos bioactivos fueron los niveles de antocianinas.

Ante este panorama se propuso el uso de antocianinas de frutos de fresa (*F. x ananassa*) como una posible alternativa para el biocontrol de fitopatógenos como *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*. Sabiendo que la fresa es una excelente fuente de antocianinas y otros compuestos fenólicos con notables actividades biológicas. Cabe resaltar que la propuesta se enfoca a la posibilidad de usar fresa que ha sido desechada y que no puede ser usada para venta en fresco, congelada o en alimentos procesados, como una estrategia para darle valor agregado adicional a dichos frutos.

2.0 Hipótesis

Las antocianinas de frutos de fresa presentan actividad antifúngica *in vitro* ante *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*.

2.1 Objetivos

2.1.1 Objetivo general

- Evaluar el potencial biocontrolador *in vitro* de antocianinas de frutos de fresa contra *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*.

2.1.2 Objetivos específicos

- Determinar las dosis letales medias para control de los fitopatógenos *in vitro*.
- Fraccionar los extractos totales y realizar pruebas de confrontación con cada una de las fracciones obtenidas.
- Identificar los compuestos activos en las fracciones con mayor actividad biocontroladora.

3.0 Materiales y métodos

3.1 Material biológico

Para la obtención de extractos antociánicos totales iniciales se utilizaron frutos de dos variedades de fresa: Festival y Zamorana, proporcionadas por productores de Tangancicuaro, Michoacán. Dichos frutos se cosecharon en un estado de maduración 5 (Figura 16), punto en el que según la NMX-FF-062-SCFI-2002 debe recogerse el fruto para su procesamiento comercial.

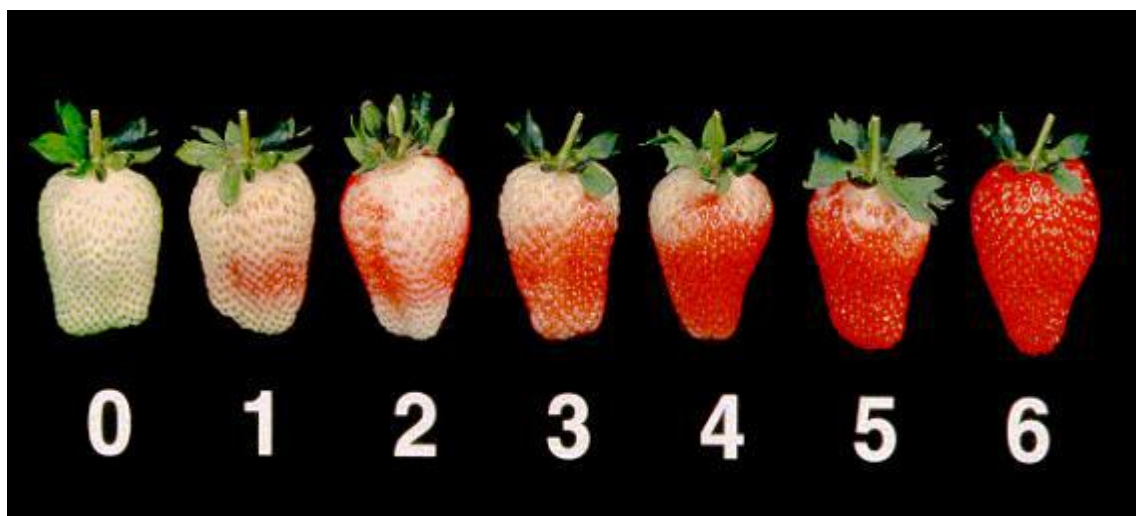


Figura 16. Estados de maduración de la fresa según su coloración (NMX-FF-062-SCFI-2002).

3.2 Obtención de hongos fitopatógenos

Los hongos utilizados fueron *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*, los cuales fueron proporcionados por el Dr. Pedro Damián Loeza Lara, de la Universidad de La Ciénega del Estado de Michoacán de Ocampo. El medio utilizado para el mantenimiento de los hongos y los ensayos de confrontación fue PDA (Agar Papa Dextrosa). Para la preparación de dicho medio se pesaron 20 g de dextrosa, 17 g de agar y la infusión de 250 g de papa, posteriormente se aforó a 1L con agua destilada. Enseguida se vertió el medio en botellas para esterilización tipo Duran Schott x 1000 ml y se esterilizó en una olla de presión a 121°C durante 15 min. Finalmente, se realizó el vaciado en placas Petri de plástico de 90 x 15 mm, dentro de una campana de flujo laminar, colocando aproximadamente 15 ml de medio por caja.

Las cepas fueron reactivadas por siembra de un cubo de 0.5 cm³ de agar con micelio, el cual fue colocado en el centro de placas Petri con PDA e incubados a 27 °C durante 5 d para obtener cultivos maduros. Posteriormente, se realizó corte de punta de hifa para purificar las cepas con ayuda de un microscopio estereoscópico para observar las características distintivas de cada hongo y una asa bacteriológica para hacer el corte. Las puntas de hifa fueron colocadas en placas Petri con PDA e incubadas a 27°C durante 5 d para obtener cultivos maduros.

3.3 Extracción y cuantificación de antocianinas

La extracción y cuantificación de antocianinas se realizó siguiendo la técnica descrita por [Abdel-Aal y Hucl \(1999\)](#). Para ello se tomó 1 g de muestra y 5 ml de etanol acidificado (Etanol y HCl 1N; 85:15 v/v), se hizo el macerado con un mortero y pistilo de porcelana, hasta no tener grumos gruesos, y se filtró la muestra con papel filtro Whatman® (Nº 40). Posteriormente se agitó vigorosamente la solución en vortex y se ajustó el pH a 1.

Enseguida se colocó la muestra en un agitador orbital a 250 rpm durante 16 h a temperatura ambiente. Transcurrido el tiempo necesario, se centrifugó la solución a 5,000 rpm por 15 min y se recuperó el sobrenadante. Finalmente, dicho sobrenadante se aforó a 25 ml con etanol acidificado. Parte de las muestras se almacenaron a -20°C hasta su utilización.

El cálculo de la concentración de antocianinas se realizó aplicando la siguiente ecuación:

$$C = (A/E) \times (\text{vol}/1,000) \times MW \times (1/\text{peso de la muestra}) \times 106,$$

Dónde:

C= concentración total de antocianinas (mg/kg);

A= absorbancia a 535 nm;

E= absorbancia molar del cianidina 3-glucósido = 25,965 cm⁻¹ M⁻¹;

Vol= volumen total del extracto de antocianinas y

MW= peso molecular del cianidina 3-glucósido = 449.

La concentración de antocianinas fue expresada en mg de cianidina-3-glucósido, equivalentes a 100 g de fruto fresco.

La determinación de la concentración de los extractos se realizó de la siguiente manera: se agitaron vigorosamente los extractos, se tomó 1ml de cada uno de ellos y se colocaron en viales de vidrio, previamente pesados. Dichos viales se colocaron en un Multivapor™ P-12 (Büchi) para llevar las muestras a sequedad. Una vez evaporado todo el solvente, se retiraron los viales y se pesaron nuevamente para obtener el contenido de extracto mediante la diferencia de pesos (mg). Este procedimiento se realizó por triplicado.

3.4 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos de antocianinas totales de fresa

3.4.1 Ensayos de inhibición *in vitro* de extractos de antocianinas totales de fresa vs hongo

Las pruebas de confrontación del extracto total contra los fitopatógenos manejados se hicieron mediante la técnica de dilución en agar, la cual consiste en diluir determinada concentración del extracto en el medio de cultivo y posteriormente inocular el microorganismo en estudio, para finalmente incubar y observar si hay crecimiento.

Se estableció un experimento constituido por tres tratamientos (Tabla 6), los cuales a su vez se hicieron por triplicado. Los tratamientos aplicados fueron los siguientes: T1, donde el patógeno se sembró en PDA libre del extracto evaluado (usado como testigo del crecimiento del patógeno); T2, donde se inoculó el patógeno en placas con PDA + extracto; y T3, donde se inoculó el patógeno en placas con PDA + Etanol acidificado (Etanol y HCl 1N; 85:15 v/v), para identificar el efecto del solvente sobre el crecimiento del patógeno. Se siguió el mismo procedimiento con ambos fitopatógenos: *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*.

Tabla 6. Tratamientos utilizados para evaluar la actividad antifúngica de los extractos totales.

Tratamiento	Descripción
T1	3ml de PDA
T2	3ml de PDA + 350 µl de extracto total
T3	3 ml de PDA + 350 µl de etanol acidificado

Dichas pruebas se realizaron de la siguiente manera: se tomaron 3 ml de PDA y se vertieron en placas de Petri de 48 mm, enseguida (antes de que solidificara el medio) se colocó el extracto, o en su caso el etanol acidificado, y se agitó levemente hasta obtener una distribución uniforme. Posteriormente, las placas se dejaron reposar (Aproximadamente 15 min.) para permitir la solidificación del medio y la evaporación del solvente de los extractos. Pasado el tiempo de reposo se aplicó el inóculo del patógeno en cuestión, éste se tomó de cultivos maduros con ayuda de un sacabocados metálico de 5mm de diámetro. Finalmente, se colocaron las placas en incubación a una temperatura de 27°C.

3.4.2 Porcentajes de inhibición

Para calcular el porcentaje de inhibición del extracto sobre el crecimiento micelial de los hongos se realizó una medición diaria del crecimiento radial de dichos fitopatógenos. Las pruebas se detuvieron cuando en los tratamientos testigos se observó un crecimiento máximo de los hongos, es decir, cuando las placas se cubrieron totalmente.

El porcentaje de inhibición se calculó mediante la fórmula descrita por [Singh \(2003\)](#), la cual establece lo siguiente:

$$\% \text{ de inhibición} = R1 - R2 / R1 * 100$$

Dónde:

R1= Crecimiento radial del patógeno en placa testigo

R2= Crecimiento radial del patógeno en placa con extracto o solvente.

3.5 Fraccionamiento e Identificación de compuestos bioactivos presentes en los extractos de antocianinas totales de fresa

3.5.1 Cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos de antocianinas totales de fresa

Con el objetivo de encontrar la mezcla de solventes que ofreciera una buena separación de los compuestos presentes en los extractos de frutos de fresa, se evaluaron tres sistemas de solventes reportados por [Wagner y Bladt \(1996\)](#), para la separación de flavonoides y antocianinas (Tabla 7). Para ello se corrieron algunas placas de TLC, en las cuales se aplicaron dos dosis diferentes de cada extracto: 5 y 10 µl, con el propósito de encontrar la dosis que permitiera la mejor separación.

Tabla 7. Sistemas de solventes evaluados para desarrollar las placas de Cromatografía en capa fina (TLC).

Sistema de solventes	Composición
I	Acetato de etilo-Ácido acético glacial-Ácido fórmico-Agua (100:11:11:12)
II	Acetato de etilo-Ácido acético glacial-Ácido fórmico-Agua (100:11:11:26)
III	n- butanol-Ácido acético glacial-Agua (40:10:20)

Una vez identificado el mejor sistema de solventes para la separación de los compuestos presentes en los extractos de frutos de fresa, se realizaron nuevas cromatografías en capa fina usando placas de gel de Sílice 60, F254 (Merck, Germany) de 10 x 10 cm. Aplicando 3µl de cada extracto: Var. Festival y Var. Zamorana, usando un Muestreador Automático TLC 4 (CAMAG®). Terminada la fase de aplicación de las muestras se pasó a la fase de desarrollo. Para ello se utilizó una Cámara de Desarrollo Automático ADC 2 (CAMAG®), usando el sistema de solventes II.

En la fase de revelado se usaron los reactivos de Productos Naturales (difenilboriloxetilamina) al 1% en metanol y polietilenglicol al 5% en etanol, para revelar flavonoides; y el reactivo DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidrazil) para revelar la capacidad antioxidante de los compuestos presentes, éste último con el objetivo de rastrear la separación de otros compuestos con esta propiedad, además de las antocianinas. Este paso se hizo con ayuda de un Dispositivo de Inmersión de Cromatogramas (CAMAG®). La fase de documentación se realizó con el sistema Visualizador TLC (CAMAG®).

Los dispositivos de aplicación (Muestreador Automático TLC), desarrollo (Cámara de Desarrollo Automático) y documentación (Visualizador TLC) (Figura 17) fueron controlados a través del Software winCATS 2.0 (CAMAG®).

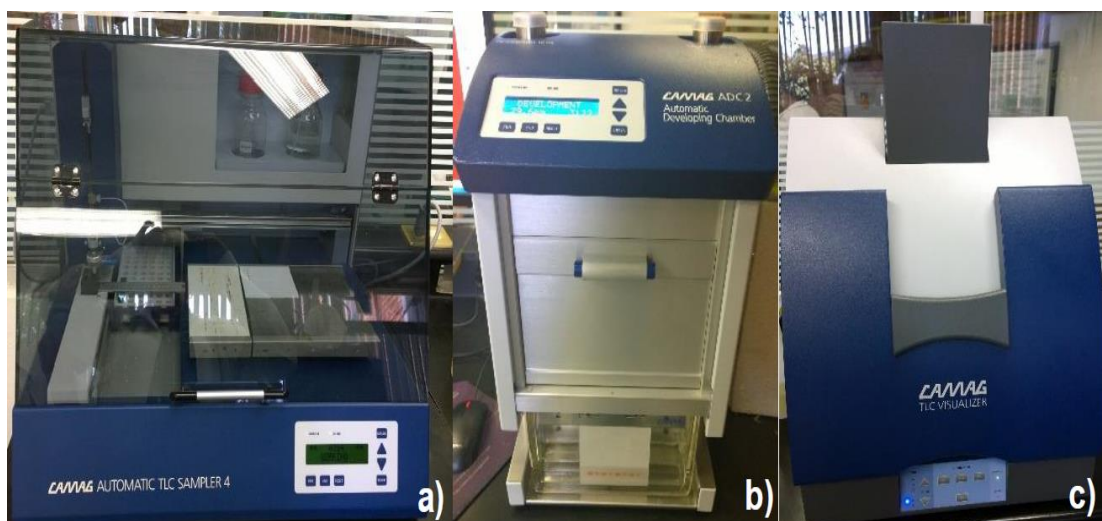


Figura 17. Equipo para cromatografía en capa fina (TLC) (CAMAG®): a) Muestreador Automático, b) Cámara de Desarrollo Automático y c) Visualizador.

Posteriormente, se corrieron algunas placas de TLC para observar las características de separación e identificar de manera general los compuestos presentes. En estas placas se aplicaron 1, 2, 3, 4 y 5 μl de cada extracto para distinguir con mayor definición la separación de los compuestos. Finalmente, se corrió una placa de TLC con las fracciones más coloridas obtenidas por cromatografía en columna (CC), con el fin de observar posibles diferencias en cuanto a los compuestos presentes.

3.5.2 Cromatografía en columna (CC) de los extractos de antocianinas totales de fresa

Una vez realizadas las cromatografías en capa fina de los extractos y habiendo conocido las condiciones de separación de dichas muestras, se procedió a realizar la cromatografía en columna (CC), la cual es una técnica que permite separar y purificar cantidades aceptables de compuestos presentes en una mezcla.

Para ello, se modificó el procedimiento descrito por [Lopes et al. \(2002\)](#). Se hidrató gel de sílice 60-200 (J.T. Baker®) con acetato de etilo y se dejó reposar por 10 min. Transcurrido este tiempo, se hizo el empaquetamiento de la columna de vidrio hasta una altura de 30 cm. Enseguida se depositó la muestra y se hizo entrar en la fase estacionaria (Gel de sílice).

La fase móvil, o eluyente, utilizada fue el sistema de solventes que ofreció la mejor separación de compuestos en las placas de TLC desarrolladas anteriormente: acetato de etilo, ácido acético glacial, ácido fórmico y agua (100:11:11:26). Se colectaron fracciones de 50 mL, las cuales fueron concentradas en rotavapor (Büchi 011) y recuperadas en 1 mL de etanol acidificado (EtOH:HCl 1N, 85:15 v/v).

Posteriormente, se realizó la cuantificación de los pigmentos obtenidos en cada una de las fracciones resultantes. Para ello se siguió el mismo procedimiento realizado para determinar el contenido de los extractos totales.

3.5.3 Ensayos de inhibición *in vitro* de las fracciones obtenidas por CC del extracto de antocianinas totales de fresa

Debido a que las concentraciones de los extractos necesarias para inhibir el crecimiento de los fitopatógenos evaluados son relativamente altas, y a que las concentraciones obtenidas en cada una de las fracciones resultaron muy bajas, se optó seleccionar la fracción más activa de cada extracto (var. Festival y var. Zamorana). Para dicha selección se realizaron pruebas de confrontación utilizando la técnica de difusión en disco, ya que ésta permite utilizar menores cantidades de extracto.

Para estas pruebas se redujo el porcentaje de agar del medio de cultivo (PDA) a un 0.7%, con el objetivo de facilitar la difusión de los compuestos presentes. Se colocaron 600 µl de cada fracción en discos estériles de papel filtro (Whatman No.1) y se dejaron reposar (15 min. aproximadamente) para permitir la evaporación de los solventes. Una vez que éstos se evaporaron los discos fueron colocados en PDA al 0.7%, también se colocó el inóculo de los fitopatógenos a una distancia aproximada de 2 cm. Posteriormente, las placas se incubaron por 72 h a 27°C. Pasado este tiempo, se seleccionaron de manera visual las fracciones que mostraron mayor inhibición del crecimiento de los fitopatógenos.

La evaluación de la actividad antifúngica de las fracciones más activas se hizo de la misma manera en que se evaluaron los extractos totales, utilizando las mismas dosis (Tabla 8).

Tabla 8. Tratamientos utilizados para evaluar la actividad antifúngica de las fracciones más activas obtenidas por CC.

Tratamiento	Descripción
T1	3ml de PDA
T2	3ml de PDA + 350 µl de la fracción más activa
T3	3 ml de PDA + 350 µl de etanol acidificado

3.5.4 TLC preparativa de las fracciones más activas

Una vez identificadas las fracciones con mayor actividad antifúngica, éstas se sometieron a TLC preparativa para hacer una separación más fina de los compuestos presentes en ellas.

Para ello, se utilizaron placas de gel de sílice G (20 x 20 cm) de 500 micrones. Se tomó cada fracción (1ml) y se distribuyó a lo ancho de la placa con una jeringa capilar (Gaslight ®) de 100 µl, a una distancia de 1.5 cm de la base, para evitar que la muestra entrara en contacto directo con los solventes al momento de desarrollar la placa. Enseguida, se colocó la placa dentro de la campana de extracción durante 30 min para evaporar completamente el solvente de la

muestra. Por otro lado, se vertió el sistema de solventes para antocianinas: acetato de etilo, ácido acético glacial, ácido fórmico y agua (100:11:11:26) en una cámara de cristal, la cual se cubrió inmediatamente para permitir la saturación de la misma.

Una vez evaporado el solvente de la muestra aplicada, la placa se introdujo en la cámara de cristal para su desarrollo (separación), el cual se llevó a cabo en un periodo aproximado de 1.5 h. Habiéndose desarrollado la placa, ésta se retiró de la cámara para evaporar los solventes utilizados. Enseguida, con ayuda de la luz blanca del Visualizador TLC (CAMAG®) y una aguja, se delimitaron las bandas observadas en la placa, y se recolectaron con una espátula. Dichas muestras fueron resuspendidas en etanol acidificado, y mediante centrifugación se retiró la sílice. Finalmente, cada banda recuperada fue llevada a un volumen final de 1ml, utilizando un rotavapor.

3.5.5 Ensayos de inhibición *in vitro* de las fracciones de extracto de antocianinas de fresa obtenidas por TLC preparativa

Las pruebas de confrontación, entre las fracciones obtenidas por TLC preparativa y los fitopatógenos evaluados, así como la identificación de las fracciones más activas se realizaron de la misma manera en que se evaluaron las fracciones obtenidas por CC.

3.5.6 Identificación de los compuestos responsables de la actividad antifúngica por espectrometría de masas MALDI-TOF

Para la identificación de los compuestos presentes en las fracciones obtenidas por TLC preparativa con mayor actividad antifúngica, éstas fueron analizadas mediante espectrometría de masas MALDI-TOF, en el laboratorio de Proteómica del CIVESTAV-Irapuato.

3.6 Análisis estadístico

Con los datos obtenidos de los experimentos se realizó un análisis de varianza (ANOVA) y una prueba de Tukey ($p \leq 0.05$), utilizando el programa SAS® versión 9.0. Los datos obtenidos de porcentajes se transformaron previo al análisis estadístico usando el arcoseno.

4. Resultados

4.1 Extracción y cuantificación de antocianinas totales de fresa

Mediante la metodología descrita anteriormente, a partir de 400g de fresa se obtuvieron 10 L de extracto de antocianinas de las variedades Festival y Zamorana. Este volumen fue llevado a 200 mL por evaporación. La concentración final de cada extracto se presenta en la tabla 9.

Tabla 9. Concentración final de los extractos totales de frutos de fresa en mg de extracto.

Variedad de fresa	Concentración (mg/mL)
Festival	82.34
Zamorana	81.55

Por otro lado, de acuerdo a la metodología descrita por [Abdeel-Aal y Hucl \(1999\)](#) para la cuantificación de antocianinas, la concentración en mg de Cianidina-3-glucósido por cada 100g de fruto fresco fue la siguiente: Festival 594.86 mg y Zamorana 637.71 mg. Dicho de otra manera, la concentración final de los extractos fue de 11.89 mg de Cianidina-3-glucósido por mL para la variedad Festival y 12.75 mg para la variedad Zamorana.

4.2 Ensayos de inhibición *in vitro* de antocianinas totales de frutos de fresa contra *B. cinerea*

En la tabla 10 se muestran los porcentajes de inhibición mostrados por los extractos de antocianinas totales de las dos variedades de fresa, así como el efecto del solvente utilizado en los extractos (EtOH:HCl 1N 85:15 v/v), frente a *B. cinerea* en un primer ensayo de actividad antifúngica.

En dicha tabla se puede observar que el extracto de fresa variedad festival es el que mostró los mayores porcentajes de inhibición, cercanos al 60%, con diferencia significativa con el extracto de fresa var. Zamorana, cuyos porcentajes fueron menores a 30. Sin embargo, el etanol acidificado mostró porcentajes de

inhibición muy altos, incluso superiores a los mostrados por el extracto var. Zamorana, y similares a los obtenidos con el extracto var. Festival.

Tabla 10. Porcentajes de inhibición de los extractos de antocianinas totales frente a *B. cinerea*.

Tratamiento	Dosis	% de inhibición
Extracto Var. Festival	350 μ l	58.33 \pm 9.28 a
	400 μ l	57.50 \pm 8.75 a
Extracto Var. Zamorana	350 μ l	24.79 \pm 10.10 b
	400 μ l	24.58 \pm 8.32 b
Etanol acidificado	350 μ l	38.33 \pm 10.80 ab
	400 μ l	41.46 \pm 6.56 ab

Medias con letra diferente indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Por lo anterior, se repitió la prueba con extracto de antocianinas totales con evaporación del solvente. Los resultados se presentan en la Tabla 11.

Tabla 11. Porcentajes de inhibición de los extractos de antocianinas totales frente a *B. cinerea* (segunda prueba).

Tratamiento	Dosis	% de inhibición
Extracto Var. Festival	350 μ l	31.52 \pm 0.81 a
Extracto Var. Zamorana	350 μ l	30.8 \pm .21 a
Etanol acidificado	350 μ l	0.0 \pm 0 b

Medias con letra diferente indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Como puede verse, el porcentaje de inhibición de los extractos totales de ambas variedades fue similar (30%), más bajo que en la prueba anterior, pero en este caso el solvente ya no presentó efecto inhibitorio.

4.3 Ensayos de inhibición *in vitro* de antocianinas totales de frutos de fresa contra *C. gloeosporioides*

Los porcentajes de inhibición mostrados por los extractos de antocianinas totales de las dos variedades de fresa, así como el efecto del solvente utilizado en los extractos (EtOH:HCl 1N 85:15 v/v), frente a *C. gloeosporioides* se muestran en la tabla 12.

Tabla 12. Porcentajes de inhibición de los extractos de antocianinas totales frente a *C. gloeosporioides*.

Tratamiento	Dosis	% de inhibición
Extracto Var. Festival	350 μ l	72.52 \pm 15.70ab
Extracto Var. Zamorana	400 μ l	77.72 \pm 16.10a
Etanol	350 μ l	41.33 \pm 11.80b
Etanol acidificado	400 μ l	45.54 \pm 9.80ab
		51.73 \pm 9.00ab
		61.38 \pm 4.13ab

Medias con letra diferente indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

En este caso se pueden observar resultados similares a los encontrados frente a *B. cinerea* en el primer ensayo, pero superiores a los del segundo, ya que el extracto de fresa var. Festival ofreció porcentajes superiores a 70, mostrando diferencia significativa frente al extracto var. Zamorana, el cual proporcionó porcentajes cercanos a 40. Nuevamente el etanol acidificado mostró porcentajes similares a éstos.

Por lo anterior, se realizó una segunda prueba en la que nuevamente se dejó evaporar el solvente. Los resultados se muestran en la tabla 13.

Tabla 13. Porcentajes de inhibición de los extractos de antocianinas totales frente a *C. gloeosporioides* (segunda prueba).

Tratamiento	Dosis	% de inhibición
Extracto Var. Festival	350 μ l	100 \pm 0.0 a
Extracto Var. Zamorana	350 μ l	100 \pm 0.0 a
Etanol acidificado	350 μ l	0.0 \pm 0.0 b

Medias con letra diferente indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

4.4 Cromatografía en capa fina (TLC) de los extractos de antocianinas totales

Aunque los solventes que conforman los sistemas I y II son los mismos, el aumento en la proporción de agua en el sistema II le confiere mayor polaridad, lo cual se ve reflejado en una mejor separación de los compuestos presentes, incluidas las antocianinas. En la figura 18a se pueden distinguir 2 bandas de antocianinas (coloración roja) con R_f similares, y en la figura 18b se puede ver que estos compuestos tienen actividad antioxidante (bandas blancas). Sin embargo, también es posible observar que la mayor cantidad de compuestos antioxidantes se encuentran muy cercanos al punto de aplicación de la muestra, lo cual indica que no hay una buena separación.

Por otro lado, aunque en la figura 19a también se distinguen dos bandas, éstas son más definidas. De la misma manera, en la figura 19b se observa un mayor número de bandas y una mayor definición de las mismas. Dichos resultados fueron obtenidos con el sistema de solventes II.

En el caso del sistema de solventes III, la figura 20a muestra la presencia de dos bandas de antocianinas con R_f muy superiores a los obtenidos anteriormente. Sin embargo, en la figura 20b se puede observar que aunque algunos compuestos (incluidas las antocianinas) son mayormente arrastrados, otros de ellos se quedan muy cercanos al punto de aplicación. De acuerdo a estos resultados se optó por usar el sistema de solventes II en los fraccionamientos siguientes.

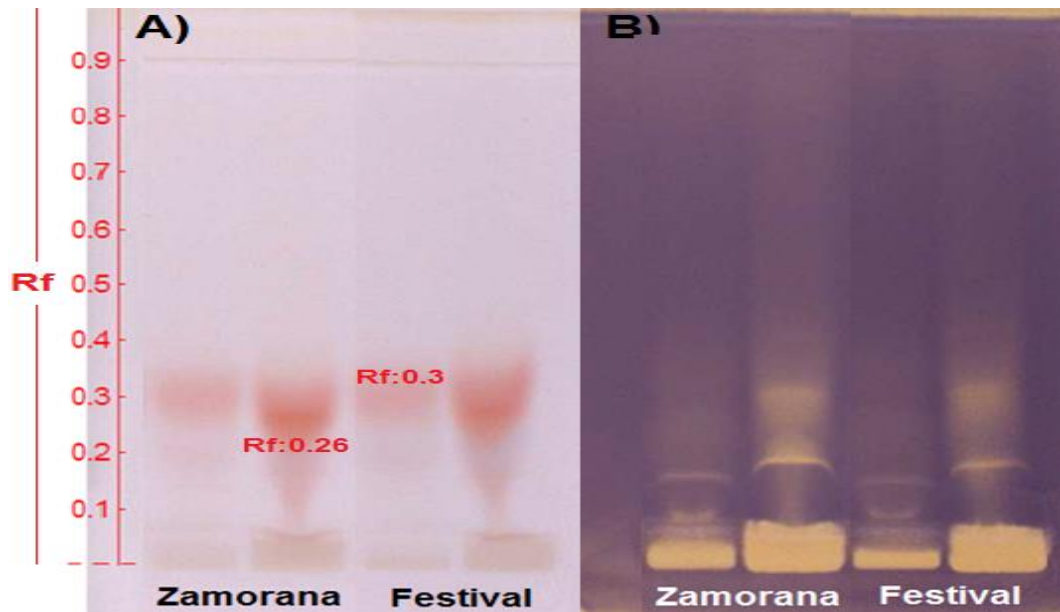


Figura 18. TLC de extractos totales de frutos de fresa. Placa desarrollada con el sistema de solventes I: Acetato de etilo, ácido acético glacial, ácido fórmico y agua (100:11:11:12). Revelada con PN-PG(A) y DPPH (B), vistas bajo luz blanca.

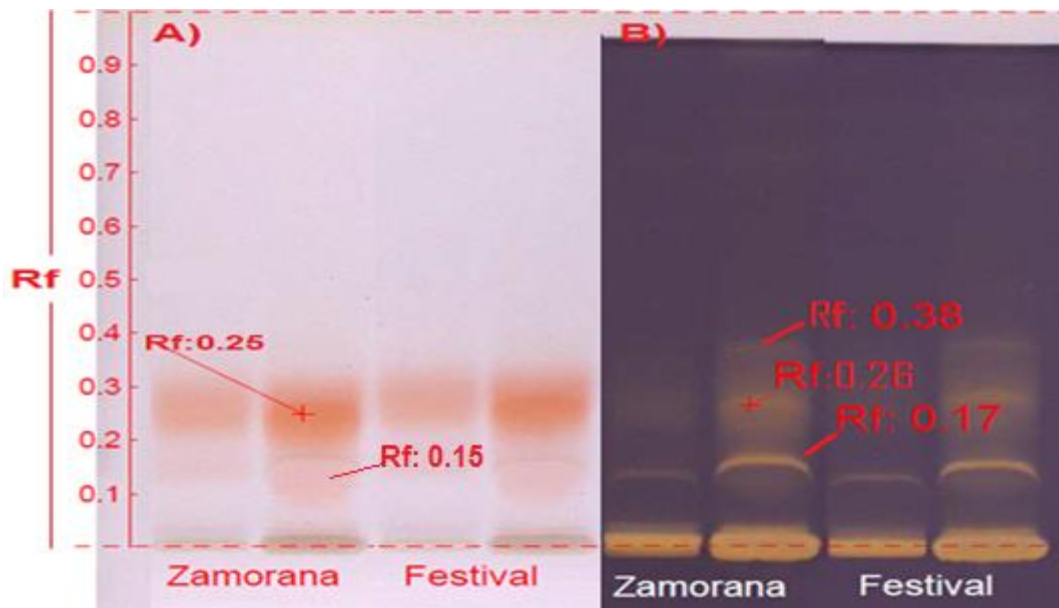


Figura 19. TLC de extractos totales de frutos de fresa. Placas desarrolladas con el sistema de solventes II: acetato de etilo, ácido acético glacial, ácido fórmico y agua (100:11:11:26). Reveladas con PN-PG (A) y DPPH (B), vistas bajo luz blanca.

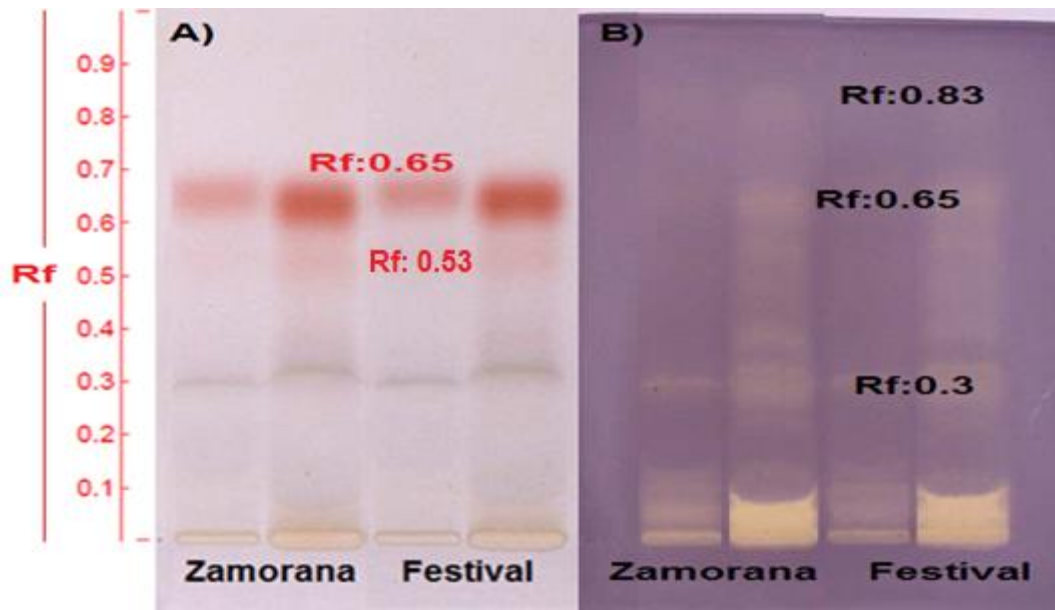


Figura 20. TLC de extractos totales de frutos de fresa. Placas desarrolladas con el sistema de solventes III: n-butanol, ácido acético glacial y agua (40:10:20). Reveladas con PN-PG (A) y DPPH (B), vistas bajo luz blanca.

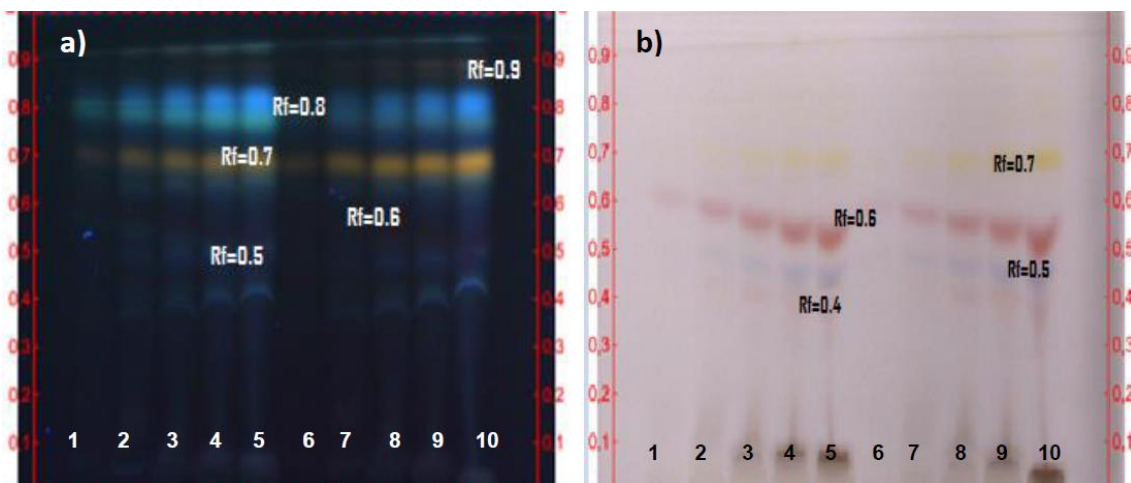


Figura 21. Placa de TLC de los extractos totales de antocianinas de fresa con aplicaciones de 1-5 μ l. Var. Festival (carriles 1-5) y Zamorana (carriles 6-10), revelada con PN-PG y vista a una longitud de onda de 366 nm (a) y bajo luz blanca (b).

En la figura 21 se muestra la placa de TLC donde se aplicaron 1, 2, 3, 4 y 5 μ l de cada extracto: var. Festival en los carriles 1-5 y var. Zamorana en los carriles 6-10. En la placa vista bajo luz blanca, se puede observar la presencia de

antocianinas, con Rf de 0.4, 0.5 y 0.6, además de la presencia de otros flavonoides (Rf 0.7). Por otro lado, en la imagen tomada bajo una longitud de onda de 366 nm se pueden apreciar compuestos no visibles bajo luz blanca, con Rf de 0.8 y 0.9.

Conocer estas características de separación de los compuestos presentes en los extractos de fresa, permitió tener una idea de la forma en que se separarían los compuestos en las siguientes técnicas de separación: cromatografía en columna y TLC preparativa, puesto que se trabajó con el mismo sistema de solventes.

4.5 Fraccionamiento por CC de los extractos de antocianinas totales de fresa

De acuerdo a la técnica descrita con anterioridad, se obtuvieron 8 y 7 fracciones de 50 ml cada una, del extracto var. Festival y var. Zamorana, respectivamente. Dichas fracciones se llevaron a sequedad por evaporación del solvente y se resuspendieron en 1 ml de EtOH acidificado (EtOH:HCl 1N 85:15 v/v). En la figura 22 se pueden observar las diferentes tonalidades de las fracciones obtenidas, lo cual permite pensar que difieren en su composición o en la concentración de los compuestos presentes.



Figura 22. Fracciones de los extractos obtenidas por Cromatografía en columna (CC).

Para cada fracción se determinó la concentración de extracto (mg) de la misma manera en que se determinó la concentración de los extractos de antocianinas totales.

4.6 Ensayos de inhibición *in vitro* de las fracciones obtenidas por CC contra *B. cinerea*

Los resultados de la actividad inhibitoria de la fracción más activa de los extractos se presentan en la tabla 14.

Tabla 14. Porcentajes de inhibición de las fracciones más activas de los extractos frente a *B. cinerea*.

Tratamiento	Dosis	% de inhibición
Extracto Var. Festival	350 μ l	100 \pm 0.0a
Extracto Var. Zamorana	350 μ l	100 \pm 0.0a
Etanol acidificado	350 μ l	0.0 \pm 0b

Medias con letra diferente indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

Como puede verse, la actividad biocontroladora de las fracciones obtenidas tanto de la variedad Festival como de la Zamorana sobre *B. cinerea* fueron similares, lográndose un 100% de inhibición del crecimiento del patógeno.

4.7 Ensayos de inhibición *in vitro* de las fracciones obtenidas por CC contra *C. gloeosporioides*

Los resultados de la actividad inhibitoria de la fracción más activa de los extractos se presentan en la tabla 15. Como puede verse, la actividad biocontroladora de las fracciones obtenidas tanto de la variedad Festival como de la Zamorana sobre *C. gloeosporioides* fueron similares, lográndose un 100% de inhibición del crecimiento del patógeno. Estos resultados son similares a los obtenidos para *B. cinerea*.

Tabla 15. Porcentajes de inhibición de las fracciones más activas de los extractos frente a *C. gloeosporioides*.

Tratamiento	Dosis	% de inhibición
Extracto Var. Festival	350 µl	100 ± 0.0a
Extracto Var. Zamorana	350 µl	100 ± 0.0a
Etanol acidificado	350 µl	0.0 ± 0.0b

Medias con letra diferente indican diferencia significativa ($p \leq 0.05$).

4.8 TLC preparativa de las fracciones con mayor actividad antifúngica

De acuerdo a la metodología expuesta, se realizaron TLC preparativas con las fracciones más activas de cada una de las variedades analizadas. De esta manera, la TLC preparativa de la fracción 5 del extracto var. Festival (Figura 23a), dio como resultado 4 bandas con diferentes Rf (factor de retención): 0.18, 0.39, 0.53 y 0.68. Siendo la banda 3 (Rf: 0.53), la más colorida de éstas.

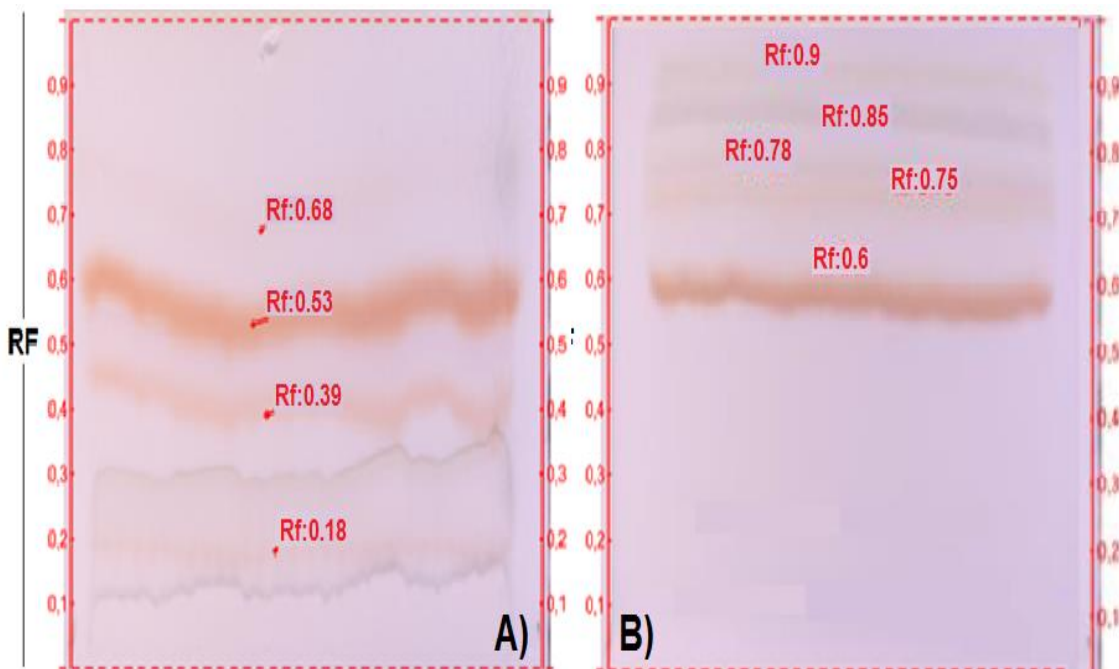


Figura 23. TLC preparativa de fracciones con mayor actividad antifúngica de ambos extractos: A) Fracción 5 var. Festival y B) Fracción 4 var. Zamorana.

Por otro lado, en la placa de TLC preparativa de la fracción 4 del extracto var. Zamorana, se pudieron distinguir 5 bandas (Figura 23b) con los siguientes Rf: 0.6, 0.75, 0.78, 0.85 y 0.9. En este caso la banda más colorida fue la banda 1, cuyo Rf (0.6) es muy parecido a lo obtenido en la banda de mayor coloración del extracto var. Festival, lo cual permite pensar que se trata de antocianinas similares. Las bandas obtenidas en ambas placas fueron recuperadas y probadas frente a los fitopatógenos evaluados.

4.9 Ensayos de inhibición *in vitro* de las bandas obtenidas por TLC preparativa más activas contra *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*

A las 72 horas de establecidas las pruebas de confrontación entre las bandas obtenidas por TLC preparativa de las fracciones más activas de los extractos de las dos variedades de fresa y los hongos evaluados, visualmente se seleccionaron las mayor efecto. De esta manera, la banda 3 de la fracción 5 del extracto de fresa var. Festival y la banda 1 de la fracción 4 del extracto de fresa var. Zamorana fueron las más sobresalientes. Es importante mencionar que dichas bandas fueron las más coloridas de las encontradas, lo cual se debe a una mayor concentración de pigmentos antocianínicos.

4.10 Identificación de los compuestos responsables de la actividad antifúngica por espectrometría de masas MALDI-TOF

La fracción 5 del extracto var. Festival y la banda 3 de dicha fracción (fracciones con mayor actividad antifúngica), fueron sometidas a espectrometría de masas (MALDI-TOF) para identificar los compuestos presentes y posibles responsables de la actividad antifúngica.

En las figuras 24 y 25 se muestran los cromatogramas obtenidos de la fracción 5 y la banda 3 del extracto de fresa variedad Festival, respectivamente. En el primer cromatograma, correspondiente a la fracción 5, sobresalen 12 picos con pesos moleculares (PM) que van de 213 a 1035. En el cromatograma correspondiente a la banda 3 se pueden observar 13 picos sobresalientes con PM entre 130-449.

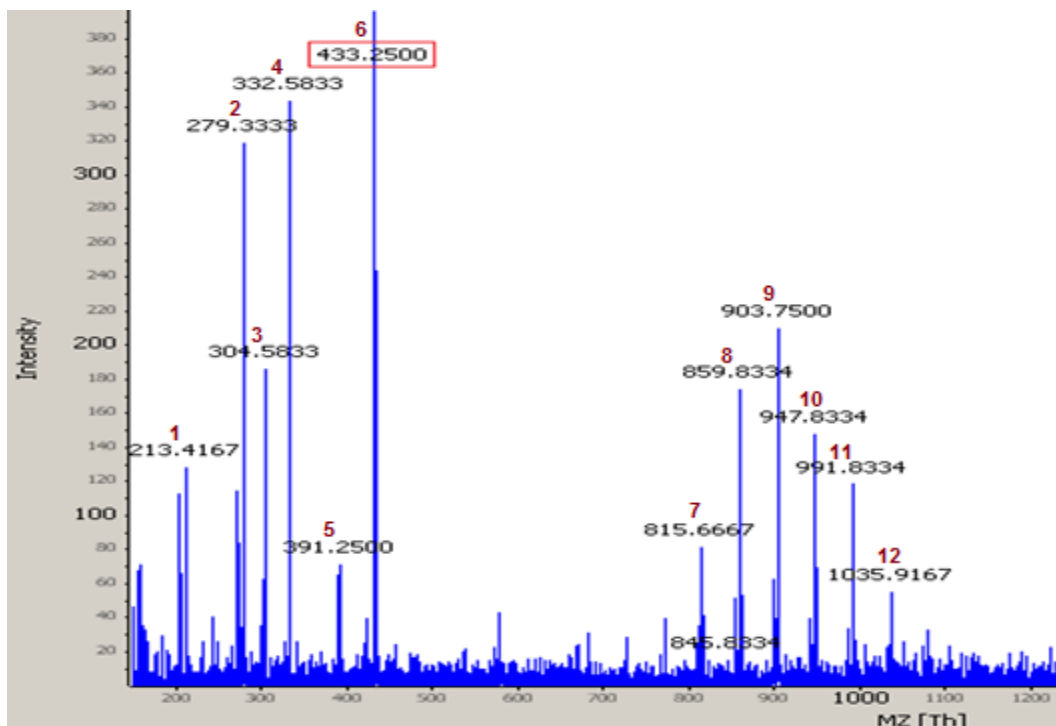


Figura 24. Perfil de compuestos presentes en la fracción 5 del extracto de fresa variedad Festival.

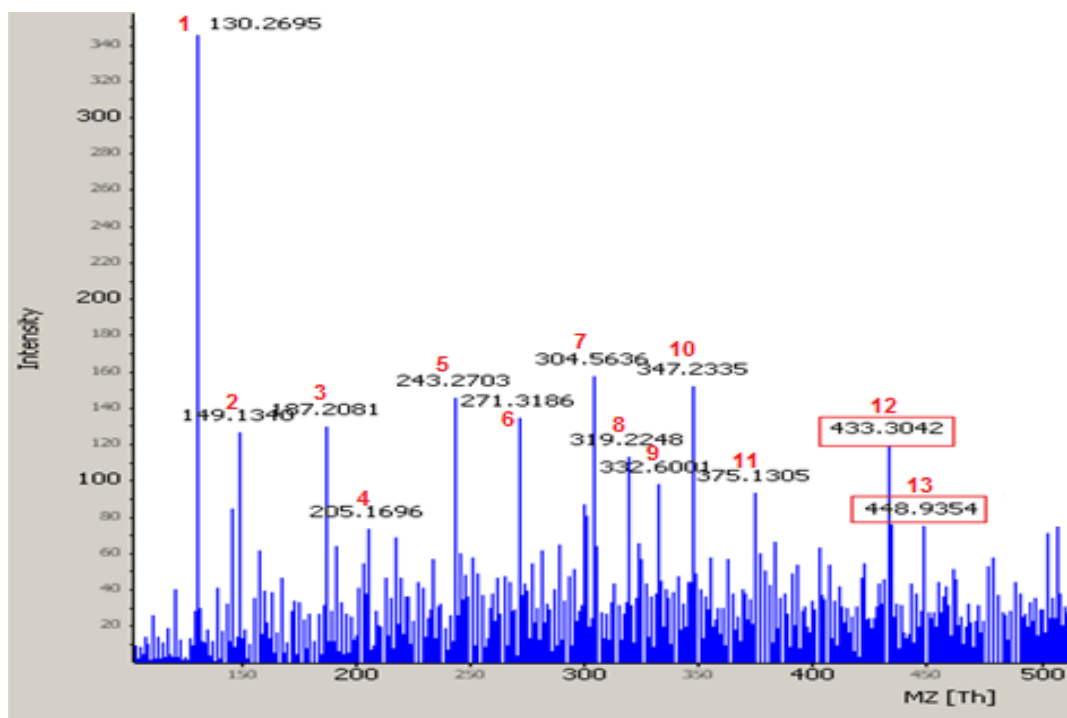


Figura 25. Perfil de compuestos presentes en la banda 3, obtenida por TLC preparativa de la fracción 5 del extracto de fresa variedad Festival.

De acuerdo a los resultados obtenidos en este análisis y a lo reportado por [Aaby et al. \(2007\)](#), en un trabajo de caracterización de compuestos fenólicos presentes en frutos de fresa, se puede destacar la presencia de los siguientes compuestos: en la fracción 5, el pico de mayor intensidad y PM de 433.25, corresponde a la Pelargonidina-3-glucósido, la antocianina con mayor presencia en fresa. En la banda 3, sin ser los compuestos mayoritarios, se destaca la presencia de las antocianinas Pelargonidina-3-glucósido y Cianidina-3-glucósido, con PM de 433 y 449, respectivamente.

5.0 DISCUSIÓN

Los resultados obtenidos en cuanto a la concentración de antocianinas resultaron muy superiores a los reportados por otros autores, tales como [Chávez \(2011\)](#), quien encontró una concentración de 33.80 mg de Cianidina-3 glucósido/100 g de fruto fresco para la var. Zamorana, y 19.70 mg en la var. Festival. [Lopes et al. \(2002\)](#), reportaron concentraciones de 25 mg de cianidina-3-glucósido por kg de fruto para la variedad Camarosa, 10 mg para la variedad Carisma, 27 mg en la Eris, 24 mg en Oso grande y 24 mg en la Tudnew. Incluso la antocianina de mayor presencia en fresa (Pelargonidina-3-glucósido) es reportada por estos autores en menor concentración, con valores de 261mg, 242mg, 185mg, 289mg y 468mg (expresados como mg de Pg-3-gluc.Kg⁻¹) en las variedades Camarosa, Carisma, Eris, Oso grande y Tudnew, respectivamente.

Aunque se ha mencionado que los niveles de antocianinas se ven afectados por diversos factores, tales como: las condiciones del cultivo (factores ambientales y técnicas de cultivo), grado de maduración, condiciones poscosecha, e incluso la variedad del cultivo, las diferencias encontradas en este trabajo respecto a los mencionados anteriormente, son considerables. Dichas diferencias se pueden atribuir, más que a los factores mencionados, a las técnicas utilizadas para la cuantificación de estos compuestos.

Respecto a los porcentajes de inhibición encontrados con los extractos de frutos de fresa ante *B. cinerea*, éstos resultaron superiores a los encontrados por [Álvarez \(2012\)](#), quien evaluó la actividad biocontroladora de un extracto de plantas de fresa sobre *B. cinerea*, y reportó que una dosis de 125 µL redujo la producción de biomasa micelial en un 17.98%, mientras que las dosis de 250 y 500 µL promovieron el incremento de biomasa. Sin embargo, son inferiores a los resultados reportados por [Ávila et al. \(2011\)](#), quien realizó un estudio en el que evaluaron la actividad antifúngica de un extracto etanólico de *Piper septuplinervium* frente a *Fusarium oxysporum* y *B. cinerea*, y encontraron una dosis mínima inhibitoria de 100 µg.

Por otro lado, los porcentajes de inhibición encontrados en este trabajo frente a *C. gloeosporioides*, fueron superiores a los encontrados por [Chávez et al. \(2011\)](#) en un trabajo en el que evaluaron la actividad antifúngica de extractos etanólicos de

hojas y semillas de Papaya (*Carica papaya* L.) var. Maradol, frente a *Rhizopus stolonifer*, *Fusarium* spp. y *C. gloeosporioides*. En dicho trabajo, encontraron porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* cercanos al 20%, utilizando una concentración de 20 mg. ml⁻¹ del extracto de hojas. [Bautista et al. \(2003\)](#) evaluaron la actividad antifúngica de extractos acuosos de hojas y semillas de papaya frente a *C. gloeosporioides* y encontraron que ninguno de los extractos mostró algún efecto antifúngico. En el [2011](#), [Pérez et al.](#) evaluaron la actividad antifúngica de un extracto etanólico de hojas de *M. azederach* sobre diferentes aislados de *Colletotrichum* spp. y encontraron porcentajes de inhibición del 100% en dos de los aislados, a una concentración de 50 ppm, resultados similares a los encontrados en el control positivo con nistatina.

Finalmente, en cuanto a los compuestos presentes en los extractos y posibles responsables de la actividad antifúngica mostrada por éstos, es muy probable que sean las antocianinas encontradas (pelargonidina y cianidina-3-glucósido) las que confieren dicha propiedad a los extractos evaluados. Debido a sus niveles de presencia y a sus múltiples funciones biológicas, incluida la actividad antimicrobiana. [Hafidh et al. \(2011\)](#), evaluaron un extracto metanólico de Col morada (*B. oleracea*) contra diferentes bacterias y hongos patógenos de humanos. La actividad antibacteriana y antifúngica del extracto fue evidente frente a *S. aureus*, *E. coli* O157:H7, *P. aeruginosa*, *K. pneumoniae* y *Salmonella typhimurium*; *Trichophyton rubrum* y *Aspergillus terreus*, respectivamente. Los autores atribuyeron esta acción antimicrobiana a las antocianinas, las cuales fueron los compuestos fenólicos más abundantes en el extracto.

Sin embargo, esta actividad antifúngica también podría estar dada por cualquier otro compuesto no identificado presente en los extractos, especialmente por algún compuesto fenólico perteneciente al grupo de los flavonoides, los cuales han sido constantemente reportados por poseer actividades antimicrobianas. [Vargas y Sibaja \(2013\)](#), señalan a las proantocianidinas (taninos condensados) presentes en el arándano (*Vaccinium macrocarpon*) como las responsables de la actividad antimicrobiana frente a las bacterias causantes de infecciones urinarias en humanos. [Puupponen et al. \(2005\)](#), evaluaron la actividad antimicrobiana de extractos etanólicos de diferentes frutillas (incluida la fresa) frente a bacterias patógenas de humanos y encontraron que los extractos de fresa fueron fuertes

inhibidores de *Salmonella* sp. De manera específica, encontraron que los elagitaninos presentes en los extractos fueron los compuestos que mayor inhibición mostraron frente a la bacteria *Staphylococcus* sp. De la misma manera, [Ávila et al. \(2011\)](#) señalan a la uvangoletina (chalcona) y a la chrysin (flavona) como los compuestos responsables de la actividad antifúngica que mostraron los extractos de *Piper septuplinervium* frente a *Fusarium oxysporum* y *B. cinerea* en su trabajo realizado en el año 2011.

6.0 CONCLUSIONES

Los extractos etanólicos de frutos de fresa tienen potencial para ser utilizados como alternativa de control de los hongos fitopatógenos *C. gloeosporioides* y *B. cinerea*. El extracto de fresa variedad Festival mostró mayor efecto inhibitorio ante las dos cepas de hongos evaluadas, especialmente contra *Colletotrichum gloeosporioides*, en comparación al extracto de fresa variedad Zamorana.

El efecto antimicrobiano pudiera deberse al alto contenido de antocianinas como la Pelargonidina-3-glucósido y la Cianidina-3-glucósido, antocianinas de mayor presencia en fresa, las cuales fueron encontradas en las fracciones de los extractos con mayor actividad antifúngica ante dichos fitopatógenos. Sin embargo, aún falta realizar más estudios que permitan identificar de manera más específica los compuestos responsables de dicha actividad.

7.0 REFERENCIAS

- Abdel-Aal, M., & Hucl, P. (1999). A rapid method for quantifying total anthocyanins in blue aleurone and purple pericarp wheats. *Cereal chemistry*, 350-354.
- Adaskaveg, J.E., Hartin, R.J. (1997) Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing Anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology*, 87:979-987.
- Agrios, G.N. (2002) Fitopatología Editorial Limusa S.A de C.V. México D.F., México. 838 p.
- Álvarez, T. B. (2012). Biocontrol de *Botrytis cinerea* a partir de extractos fenólicos de fresa. Tesis de maestría, CIIDIR-IPN Unidad Michoacán, México. Disponible en <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/16418/ALVAREZ%20G%C3%93MEZ%20TANIA%20BELEN%20-%20B101510.pdf?sequence=1>
- Astrid, G. (2008). Las antocianinas como colorantes naturales y compuestos bioactivos: revisión. *Acta biológica de Colombia*, 27-36.
- Ávalos, C. (2009). La fresa: propiedades y beneficios. *Generación*, 22-24.
- Ávila, M. (2011). Flavonoides con actividad antifúngica aislados de *Piper septuplinervium* (Miq.) C. DC. (Piperaceae). *Revista Colombiana de Química*.
- Bai, X., Cheng, J., Liang, W., Ma, L., Liu, Y., Guang, S., y otros. (2012). Antifungal activity of extracts by supercritical carbon dioxide extraction from roots of *Stellera chamaejasme* L. and analysis of their constituents using GC-MS. *Tech. and Agricultural Eng.*, 653-662.
- Bailey, J.A. y Jeger, J.M. (1992) *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. British Society for Plant Pathology. C.A.B. International. 388 p.
- Bautista, S., Hernández, M., Bosquez, M., & Wilson, C. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop protection*, 1087-1092.
- Belov, M. (2006). *Fragaria chiloensis*. Recuperado el 17 de Agosto de 2014, de Chileflora: <http://www.chileflora.com/Florachilena/FloraSpanish/HighResPages/SH0027.htm>
- Bernal, A. (2005). Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Lupinus* spp. sobre Hongos Fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 140-141.

- Bonet, J. (2010). *Desarrollo y caracterización de herramientas genómicas en Fragaria diploide para la mejora del cultivo de fresa*. Recuperado el 1 de Diciembre de 2012, de Desarrollo y caracterización de herramientas genómicas en *Fragaria diploide para la mejora del cultivo de fresa*.
- Bonde, M.R., Peterson, G.L. y Maas, J.L. (1991). Isozyme comparisons for identification of *Colletotrichum* species pathogenic to strawberry. *Phytopathology*, 81:1523-1528.
- Cano, M. (2013). Estrategias biológicas para el manejo de enfermedades en el cultivo de fresa (*Fragaria* spp.). *Revista colombiana de ciencias hortícolas*, 263-276.
- Carbú, M. (2006). Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*. Tesis Doctoral, Universidad de Cádiz. Disponible en: <http://minerva.uca.es/publicaciones/asp/docs/tesis/MCarbuEspinosa.pdf>
- Castañeda, A., Pacheco, M., Páez, M., Rodríguez, J., & Galán, A. (2009). Chemical studies of anthocyanins: a review. *Food chemistry*, 859-871.
- Castillejo, Á. L. (2011). *Aplicación de Azospirillum y su efecto en la calidad y rendimiento de fresa (Fragaria ananassa) Var. Albion cultivada en invernadero*. Recuperado el 5 de Septiembre de 2013, de Aplicación de Azospirillum y su efecto en la calidad y rendimiento de fresa (*Fragaria ananassa*) Var. Albion cultivada en invernadero: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/8081>
- Castillo, F., Hernández, D., Gallegos, G., Mendez, M., Rodríguez, R., Reyes, A., y otros. (2010). In vitro antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kuhn. *Industrial crops and products*, 324-328.
- Celis, Á. (2009). Revisión: uso de extractos vegetales en el manejo integrado de plagas enfermedades y arvenses. *Temas agrarios*.
- Chávez, M., (2011). Evaluación de la actividad antihipertensiva de nutraceuticos de fresa silvestre y comercial. Tesis de Maestría, CIIDIR-IPN Unidad Michoacán, México. Disponible en: <http://tesis.ipn.mx/bitstream/handle/123456789/12234/CH%C3%81VEZ%20RAMOS%20MA.%20GUADALUPE%20-20B081030.pdf?sequence=1>
- Chávez, P., González, T., Rodríguez, I., & Gallegos, S. (2011). Antifungal activity in ethanolic extracts of *Carica papaya* L.cv. Maradol leaves and seeds. *Indian J. Microbiology*, 54-60.

- Clifford, M. (2000). Anthocyanins: nature, occurrence and dietary burden. *Science of Food and Agriculture*, 1063-1072.
- CONAFRE. (2007). *Sistema producto fresa*. Recuperado el 6 de Noviembre de 2012, de Sistema producto fresa.
- Contreras, C. (2006) Caracterización y pruebas de patogenicidad cruzada entre aislamientos de *Colletotrichum* spp. obtenidos de frutos de lulo (*Solanum quitoense* Lam), tomate de árbol (*Solanum betacea* Sendt), granadilla (*Passiflora ligularis* Juss), mango (*Magnifera indica* L) y tallos de mora (*rubís glaucus* Benth) con síntomas de antracnosis. Trabajo de grado presentado como requisito para la carrera de Microbiología Agrícola y Veterinaria. Pontificia Universidad Javeriana.
- Coromoto, Z., (2014). Aproximación proteómica y metabolómica de la producción de metabolitos secundarios en líneas celulares elicidadas de *Solanum lycopersicum*. Tesis de Licenciatura, Universidad de Murcia, España. Disponible en: <https://digitum.um.es/xmlui/handle/10201/39266>
- Fernandes, V., Domingues, V., De Freitas, V., Delerue, C., & Nuno, M. (2012). Strawberries from integrated pest management and organic farming: phenolic composition and antioxidant properties. *Food Chemistry*, 1926-1931.
- Freeman, S., Katan, T. y Shabi, E. (1998) Characterization of *Colletotrichum* species responsible for Anthracnose diseases of various fruits. *Plant Disease*, 82:596-604.
- García, C., Martínez, A., Ortega, J., & Castro, F. (2010). Componentes químicos y su relación con las actividades biológicas de algunos extractos vegetales. *Química viva*, 86-96.
- Garcia, V. (2005). *Introducción a la microbiología*. Costa Rica: EUNED.
- Gepp, V., Silvana, V., Cassanello, M., Romero, G., Silvera, E., González, J., y otros. (2012). Resistencia a fungicidas en *Botrytis cinerea* en el Uruguay. *Agrociencia Uruguay*, 97-107.
- Giampieri, F., Tulipani, S., Alvarez, J., Quiles, J., Mezzetti, B., & Battino, M. (2012). The strawberry: composition, nutritional quality, and impact on human health. *Nutrition*, 9-19.
- Gould, K., Davies, K., & Winefield, C. (2009). *Anthocyanins: biosynthesis, functions and applications*. Nueva Zelanda: Springer.
- Gutiérrez, J., Gutiérrez, O., Nieto, D., Téliz, D., Zavaleta, E., Delgadillo, F., y otros. (2003). Resistencia a Benomil y Tiabendazol en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz. y Sacc) obtenidos de mango

- (*Mangifera indica* L.) en cinco regiones de México. *Revista Mexicana de fitopatología*, 260-266.
- Gutiérrez, J.G.A., Nieto, D.A., Téliz, D.O., Zavaleta, E.M., Vaquera, H.H., Martínez, T.D. y Delgadill, F.S. (2001) Características de Crecimiento, Germinación, Esporulación y Patogenicidad de Aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz. obtenidos de Frutos de Mango (*Mangifera indica* L.). *Revista Mexicana de Fitopatología*, 19:90-93.
- Hafidh, R., Abdulmir, A., Vern, L., Abu-Bakar, F., Abas, F., Jahanshiri, F., y Sekawi, Z. (2011). Inhibition of growth of highly resistant bacterial and fungal pathogens by a natural product. *The Open Microbiology Journal*, 5, 96-106.
- Holliday, P.(1995). *Fungus diseases of tropical fruits*. Dovel Publication, Inc. New York. 624 p.
- ICAMEX. (2005). *Guía técnica para el cultivo de fresa*. Recuperado el 6 de Noviembre de 2012, de Guía técnica para el cultivo de fresa.
- Infoagro. (2014). *Technologies for the control of Botrytis*. Recuperado el 6 de Diciembre de 2014, de Technologies for the control of Botrytis: <http://www.infoagro.com/abonos/botrytis2.htm>
- Jing, L., Lei, Z., Li, L., Xie, R., Wanpeng, X., Guan, Y., y otros. (2014). Antifungal activity of citrus essential oils. *Agricultural and food chemistry*, 3011-3082.
- Johnston, P.R. y Jones, D. (1997) Relationships among *Colletotrichum* isolates from fruits rots assessed using rDNA sequences. *Mycologia*, 89:420-430.
- Juarez, G. P., Sosa, M. E., & López, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*, 14-23.
- Juárez, J. A. (2015). *Paquete tecnológico para la producción de fresa*. Recuperado el 6 de Noviembre de 2015, de Paquete tecnológico para la producción de fresa.
- Kong, J., Chia, L., Goh, N., Chia, T., & Brouillard, R. (2003). Analysis and biological activities of anthocyanins. *Phytochemistry*, 923-933.
- Latunde-Dada, A.O. (2001) *Colletotrichum*: tales of forcible entry, stealth, transient confinement and breakout. *Molecular Plant Pathology*, 2:187-198.
- Lopes, F., De Pascual, T., Rivas, G., & Santos, C. (2002). Identification of anthocyanin pigments in strawberry (cv. Camarosa) by LC using DAD and ESI-MS detection. *European Food Research and Technology*, 248-253.

- Los alimentos. (2015). *Los alimentos*. Recuperado el 13 de Septiembre de 2015, de Los alimentos: <http://alimentos.org.es/fresa>
- Martínez, A. (Septiembre de 2005). Flavonoides. Antioquia, Medellín, Colombia.
- Martínez, G., Mercado, J., López, M., & Prieto, B. (08 de Septiembre de 2014). Propiedades Fisicoquímicas de Seis Variedades de Fresa (*Fragaria ananassa*) que se cultivan en Guanajuato. Recuperado el 08 de Septiembre de 2014, de Propiedades Fisicoquímicas de Seis Variedades de Fresa (*Fragaria ananassa*) que se cultivan en Guanajuato: www.respyn.uanl.mx/especiales/2008/ee-08-2008/.../A071.pdf
- Mena, G. (1999) Epidemiología y control de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz) en mango. México.
- Muiño, B. (2007). El monitoreo y manejo de la resistencia a los fungicidas en Cuba. *Fitosanidad*, 91-100.
- Nuestro Huerto Mediterráneo. (2011). *Nuestro huerto mediterráneo*. Recuperado el 6 de Septiembre de 2013, de Nuestro huerto mediterráneo: <http://nuestrohuertomediterraneo.wordpress.com/2011/03/30/las-vida-sexual-de-las-fresas/>
- O'connell, S., Perfect, S., Hughes, B., Carzaniga, R., Bailey, J. y Green, J. (2000) Dissecting the Cell Biology of *Colletotrichum* Infecting Processes. In: *Colletotrichum: Host Specificity, Pathology, and Host-Pathogen Interaction*. D. Prusky. S. Freeman and M.B. Dickman, eds. APS Press. St. Paul, Minnesota. pp 57-77.
- Orozco, M. (2008). *Nuevos mecanismos de acción de fungicidas en la agricultura*. Recuperado el 5 de Diciembre de 2014, de Reunión de agricultura protegida: [http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/files/extranet/\\$file/MODOS%20DE%20ACCION%20DE%20FUNGICIDAS.pdf](http://www.bayercropscience.com.mx/bayer/cropscience/bcsmexico.nsf/files/extranet/$file/MODOS%20DE%20ACCION%20DE%20FUNGICIDAS.pdf)
- Orta, L. (2002). Contaminación de las aguas por plaguicidas químicos. *Fitosanidad*, 55-62.
- Paz, P. M. (2010). *Michoacán el principal estado productor de fresa: SAGARPA*. Recuperado el 6 de Noviembre de 2012, de Michoacán el principal estado productor de fresa: SAGARPA.
- Parra, L. (2008) Relación entre infecciones quiescentes de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz) y los diferentes estados fenológicos del fruto de mango (*Mangifera indica* L) variedad hilacha. Memoria de Microbiólogo Agrícola y veterinario. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad De Ciencias Básicas Carrera De Microbiología Agrícola y Veterinaria. Bogotá. 21 p.

- Perales, J. (2013). Michoacán ocupa el primer lugar en producción de fresa. *Cambio de Michoacán*.completar cita
- Pérez, C., Rojas, J., Chamorro, L., & Pérez, K. (2011). Evaluación de la actividad antifúngica de *Melia azederach* sobre aislados de *Colletotrichum* spp. *Revista Colombiana de ciencias*, 309-320.
- Plan Rector Sistema Producto Fresa. (2004). Recuperado el 6 de noviembre de 2014, de Plan Rector Sistema Producto Fresa: <http://www.amsda.com.mx/PRNacionales/Nacionales/PRNfresa22.pdf>.
- Plodpai, P., Chuenchitt, S., Petcharat, V., Chakthong, S., & Piyawan, S. (2013). Anti-*Rhizoctonia solani* activity by *Desmos chinensis* extracts and its mechanism of action. *Cop protection*, 66-71.
- Poveda, C. (2006). Selección de extractos fúngicos extracelulares (EFE) con potencial para el control de *Botrytis cinerea* en tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill.). Tesis de licenciatura, Pontificia Universidad Javeriana, Bogotá, Colombia. Disponible en <http://www.javeriana.edu.co/biblos/tesis/ciencias/tesis270.pdf>
- Puupponen, R., Nohynek, L., Hartmann, S., Kahkonen, M., Heinonen, M., Maatta, K., y otros. (2005). Berry phenolics selectively inhibit the growth of intestinal pathogens. *Applied Microbiology*, 991-1000.
- Rivera, C. F. (2011). *Repositorio digital institucional*. Recuperado el 10 de Septiembre de 2013, de Repositorio digital institucional: <http://www.repositoriodigital.ipn.mx/handle/123456789/8012>
- Rodríguez, S. (2009). La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz, y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. *Revista mexicana de fitopatología*, 53-63.
- Rosli, G. (2007). *Degradación de pared celular en frutillas*. Recuperado el 1 de Diciembre de 2012, de Degradación de pared celular en frutillas.completar cita
- SAGARPA, (2005). *Plan rector sistema nacional fresa*. Recuperado el 13 de Abril de 2013, de Plan rector sistema nacional fresa.
- SAGARPA, (2012). *Generación y validación de variedades Mexicanas de fresa*. Recuperado el 20 de Abril de 2015, de Generación y validación de variedades Mexicanas de fresa.
- Santamaría, F., Díaz, R., Gutierrez, M., Santamaría, J., & Larqué, A. (2011). Control de dos especies de *Colletotrichum* causantes de antracnosis en frutos de papaya maradol. *Revista mexicana de ciencias agrícolas*, 631-643.

- Singh, G. (2003). Studies on essential oils, chemical and biocidal investigations on *Tagetes erecta* leaf volatile oil. *Flavour Frag.*, 62-65.
- Smári, H. (2013). Genetic and morphological diversity in the Icelandic woodland strawberry (*Fragaria vesca* L.). *Agricultural University of Iceland*, 1-47.
- Sutton, B.C. (1980) The *Coelomycetes* fungi imperfecti with pyrenidia, acervula and stromata. Commonwealth Mycological Institute, Kew, UK. 696 p.
- Sutton, B.C. (1992) The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control*. Bailey JA, Jeger MJ (eds). CAB Internacional. Wallingford, UK. pp. 1-26.
- Tlatempa, M. A. (2011). Demanda nutricional de cuatro variedades de fresa (*Fragaria annanasa*), cultivadas en la región de Zamora Michoacán. Texcoco, México.completa referencia
- Urbina, C. M. (2011). *Enfermedades causadas por hongos*. Recuperado el 4 de Diciembre de 2014, de Enfermedades causadas por hongos: <http://martinurbina.files.wordpress.com/2011/08/unidad-iv-enfermedades-causadas-por-hongos.pdf>
- Valiuskaite, A., Surviliene, E., & Baniulis, D. (2010). Genetic diversity and pathogenicity traits of *Botrytis* spp. isolated from horticultural hosts. *Agriculture*, 85-90.
- Vargas, N., & Sibaja, L. (2013). Actividad antimicrobiana del arándano (*Vaccinium macrocarpon*). *Revista médica de Costa Rica y Centroamérica LXX*, 9-12.
- Wagner, H., & Bladt, S. (1996). *Plant drug analysis: a Thin Layer Chromatography Atlas*. Munich: Springer.
- Zhang, X., Wu, Y., & Nan, Z. (2014). Antifungal activity of petroleum ether extracts from *Achnatherum inebrians* infected with *Neotyphodium gansuense*. *Life Science China*, 1-2.