



INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

---

CENTRO INTERDISCIPLINARIO DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL UNIDAD OAXACA

**MAESTRÍA EN CIENCIAS EN CONSERVACIÓN Y  
APROVECHAMIENTO DE RECURSOS NATURALES  
(PROTECCIÓN Y PRODUCCIÓN VEGETAL)**

**“Etiología e histopatología de la necrosis del fruto de *Vaccinium  
corymbosum* L. y sensibilidad *in vitro* del patógeno a aceites  
esenciales en Oaxaca, México”**

**TESIS QUE PRESENTA**

**AIDA RUBÍ CRUZ LUNA**

**Como requisito parcial para obtener el grado de**

**MAESTRO EN CIENCIAS**

**SANTA CRUZ XOXOCOTLÁN, OAXACA**

**AGOSTO 2018**



# INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

## ACTA DE REVISIÓN DE TESIS

En la Ciudad de Oaxaca siendo las 13:00 horas del día 12 del mes de junio del 2018 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 OAXACA

para examinar la tesis titulada:

Etiología e histopatología de la necrosis del fruto de *Vaccinium corymbosum* L. y sensibilidad in vitro del patógeno a aceites esenciales en Oaxaca, México

Presentada por el alumno:

Cruz  
Apellido paterno  
Nombre(s) Aída Rubí

Luna  
Apellido materno

Con registro: 

B	1	6	0	2	2	4
---	---	---	---	---	---	---

Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales

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

Director(a) de tesis

Dr. Alfonso Vásquez López

Dra. Lucila Lagunez Rivera

Dr. Rafael Pérez Pacheco

Dr. Marko Aurelio Gómez Hernández

Dr. Gerardo Rodríguez Ortiz

PRESIDENTE DEL COLEGIO DE  
PROFESORES

Dr. Salvador Isidro Belmonte  
Jiménez



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
CIIDIR  
UNIDAD OAXACA  
IPN



**INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL**  
**SECRETARÍA DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO**

**CARTA CESION DE DERECHOS**

En la Ciudad de Oaxaca el día 21 del mes de agosto el año 2018, el (la) que suscribe Aida Rubí Cruz Luna alumno(a) del Programa de Maestría en Ciencias en Conservación y Aprovechamiento de Recursos Naturales con número de registro B160224, adscrito a Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca, manifiesta que es autor (a) intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección del Dr. Alfonso Vásquez López y cede los derechos del trabajo intitulado **Etiología e histopatología de la necrosis del fruto *Vaccinium corymbosum* L. y sensibilidad *in vitro* del patógeno a aceites esenciales en Oaxaca, México.** al Instituto Politécnico Nacional para su difusión, con fines académicos y de investigación.

Los usuarios de la información no deben reproducir el contenido textual, gráficas o datos del trabajo sin el permiso expreso del autor y/o director del trabajo. Este puede ser obtenido escribiendo a la siguiente dirección [luna\\_060877@hotmail.com](mailto:luna_060877@hotmail.com). Si el permiso se otorga, el usuario deberá dar el agradecimiento correspondiente y citar la fuente del mismo.

Aida Rubí Cruz Luna

Nombre y firma



CENTRO INTERDISCIPLINARIO  
DE INVESTIGACIÓN PARA EL  
DESARROLLO INTEGRAL REGIONAL  
C.I.I.D.I.R.  
UNIDAD OAXACA  
IPN.



## **AGRADECIMIENTOS**

Al Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional Unidad Oaxaca (CIIDIR- OAXACA) por haberme recibido y cobijado en sus Instalaciones

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT), por Brindarme el apoyo económico y la oportunidad de realizar y concluir mis estudios de Maestría.

A mi Director de Tesis, Dr. Alfonso Vásquez por su entrega, apoyo y dedicación para fungir como mi guía principal en todo lo que fue proceso de mi Formación Académica

A mi comité Tutorial de Tesis por apoyarme en el seguimiento del Trabajo de Tesis

Al Dr. Gerardo Rodríguez por ayudarme y apoyarme con sus conocimientos

Al joven Marcelino y familia por darme la oportunidad de realizar mis prácticas en su cultivo de arándano.

## DEDICATORIA

A mí amado esposo Ariel por la paciencia, comprensión, y amor con que me motivo, me alentó y apoyo incondicionalmente durante la travesía de este proyecto.

A mí adorado hijo Cruz, por ser mi motor y mi mayor motivación en mis deseos de superación profesional

A mis padres, Maurilia y Emilio por inspirarme, motivarme y alentarme a no desfallecer en los momentos difíciles y seguir en este arduo camino.

A mis hermanos Diana y Miguel por estar conmigo y apoyarme siempre.

A mi amiga Mary Carmen por apoyarme en todas las locuras que pasamos juntas.

Al Dr. Alfonso por todo el apoyo, paciencia, y esmero que puso para transmírtame y compartir sus conocimientos

A todos ellos con amor y cariño

## RUBI

## CONTENIDO

	Página
<b>INTRODUCCIÓN GENERAL</b>	1
Objetivos	4
Hipótesis	4
Bibliografía	5
<b>CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA</b>	8
Origen del arándano y generalidades de la planta	8
Clasificación taxonómica	8
Especies comerciales de arándano	9
Situación mundial del arándano	9
Situación nacional del arándano	11
Enfermedades del arándano	13
Antecedentes de estudios de Etiología	15
Antecedentes de estudios de Histopatología	17
Antecedentes de aceites esenciales	18
Bibliografía	24
<b>CAPÍTULO II. ETIOLOGÍA E HISTOPATOLOGÍA DE LA NECROSIS DEL FRUTO DE ARÁNDANO (<i>Vaccinium corymbosum</i> L.), EN SAN PEDRO NEXICHO OAXACA</b>	31
Resumen	31
Abstract	32
Introducción	33
Materiales y métodos	34
Resultados y discusión	39
Conclusiones	45
Bibliografía	46

<b>CAPÍTULO III. EFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE ACEITES ESENCIALES EN EL CRECIMIENTO <i>IN VITRO</i> DE <i>Botrytis cinerea</i>, PATÓGENO DE FRUTOS DE ARÁNDANO EN OAXACA</b>	49
Resumen	49
Abstract	50
Introducción	51
Materiales y métodos	52
Resultados y discusión	54
Conclusiones	60
Bibliografía	61
Anexos	65

## ÍNDICE DE FIGURAS

### CAPÍTULO I

Página

- Figura 1.** Producción de arándano en México 11
- Figura 2.** Producción (ton) de arándano en México 2007-2016 12

### CAPÍTULO II

- Figura 1.** Frutos de arándano necrosados. A) fruto de arándano maduro, con 20 mm de diámetro, necrosado en la parte basal. B) corte transversal del fruto, donde el epicarpo (ep) está deshidratado y necrosado al igual que el mesocarpo (me), mientras el endocarpo (ed) se aprecian los lóculos (L) necrosados con un estado de pudrición avanzada 39
- Figura 2.** Caracteres de un aislado de *B. cinerea* obtenido a partir de frutos de arándano con síntomas de pudrición y necrosis. A) Colonia de 10 días de edad cultivada en medio de cultivo PDA; B) conidióforo largo y septado; C) Ápice ramificado de un conidióforo con racimos de conidios; D) Conidios hialinos. 41
- Figura 3.** Frutos de arándano var. Biloxi inoculados con *Botrytis cinerea*. A) Frutos cubiertos de micelio (mc) a las 192 h después de la inoculación. B) Corte transversal de un fruto de arándano con invasión micelial de *B. cinerea* (Bc) interior y exterior. 42
- Figura 4.** Cortes histológicos de frutos de arándano inoculados con *Botrytis cinerea*. A) Corte histológico longitudinal de un fruto de arándano a las cero horas después de la inoculación mostrando evidencias de una capa cerosa (cr) y células epidermales (ce) conteniendo polifenoles (pf); así como células de hipodermis (ch) y del 44

parénquima (cp). Las células conservaron su organización y su forma. B) Corte de un fruto a las 96 h después de la inoculación; existe desorganización de las células en todos los estratos y se nota presencia e introducción de hifas al interior de las células (mc). C y D) Corte de un fruto a las 96 h después de la inoculación; se observó desorganización y lisis de las células en todos los estratos; además hubo presencia de células esclereidas (escl).

### CAPÍTULO III

- Figura 1.** Porcentaje de inhibición (INH) de aceites esenciales (A) y dosis (B). Medias con la misma letra no tienen diferencia estadística significativa (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). Las líneas verticales sobre las barras indican la desviación estándar. Ajo (A10), clavo (A1), tomillo (A7); poleo (A9); té limón (A6), orégano (A5), aguacatillo (A8), pirul (A3), eucalipto (A2), romero (A4). 54
- Figura 2.** Efectividad biológica de seis dosis (0, 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ) de los aceites esenciales de 10 especies vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinérea*, agrupados de acuerdo a la “escala de porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio de *B. cinerea*”. A) nivel 1 = 100-80 %; B) nivel 2 = 79.9-60 %; C) nivel 3 = 59.9-40; D) nivel 4 = 39.9-20 %; E) nivel 5 = 19.9-10 %; F) nivel 6 = 9.9-0%. 57
- Figura 3.** *Botrytis cinerea* / aceite esencial de A) Testigo; B) orégano; C) romero; D) pirul; E) aguacatillo; F) eucalipto; G) tomillo; H) poleo; I) te limón; J) clavo; K) bejuco de ajo. Dosis de 500  $\mu\text{L.L}^{-1}$  Dds: 10 días 57
- Figura 4.** Figura 3. *Botrytis cinerea* / aceite esencial de bejuco de ajo (*Pseudocalymma alliaceum*). Dosis ( $\mu\text{L. L}^{-1}$ ): A) 100, B) 200, C) 300, D) 400, E) 500, F) testigo. Dds. 10 días 57
- Figura 5.** *Botrytis cinerea* / aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*). Dosis ( $\mu\text{L. L}^{-1}$ ): A) 100, B) 200, C) 300, D) 400, E) 500, F) testigo. Dds. 10 días. 58

- Figura 6.** *Botrytis cinerea* / aceite esencial de te limón (*Cymbopogon citratus*). Dosis ( $\mu\text{L. L}^{-1}$ ): A) 100, B) 200, C) 300, D) 400, E) 500, F) testigo. Dds. 10 días 58
- Figura 7.** *Botrytis cinerea* / aceite esencial de poleo (*Clinopodium macrostemum*). Dosis ( $\mu\text{L. L}^{-1}$ ): A) 100, B) 200, C) 300, D) 400, E) 500, F) testigo. Dds. 10 días 58
- Figura 8.** *Botrytis cinerea* / aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*). Dosis ( $\mu\text{L. L}^{-1}$ ): A) 100, B) 200, C) 300, D) 400, E) 500, F) testigo. Dds. 10 días 58

## ÍNDICE DE CUADROS

CAPÍTULO I	Página
<b>Cuadro 1.</b> Países con mayor producción de arándano (t)	10
<b>Cuadro 2.</b> Países exportadores de arándano (2008-2011).	10
<b>Cuadro 3.</b> Principales enfermedades fúngicas en <i>V. corymbosum</i>	13
<b>Cuadro 4.</b> MS identificados a partir de plantas superiores	20
<b>Cuadro 5.</b> Aceites esenciales y componentes	21
CAPÍTULO III	
<b>Cuadro 1.</b> Desviación estándar (DE) de la inhibición del crecimiento radial del micelio de <i>Botrytis cinerea</i>	55

## I. INTRODUCCIÓN

La producción de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) en México ha tomado relevancia en los últimos 10 años. A partir del 2010, México empezó a reportar 1,059 t; en el año 2012 produjo 7,191 t de arándano en una superficie de 1,153 ha (SIAP, 2016); mientras en el 2014 la producción alcanzada fue de 18,031 t, lo que representa un incremento del 23.43% (FAOSTAT, 2014). A nivel internacional México tuvo una participación de 3.5% en la producción mundial que lo posicionó en el 3° lugar en el 2014. Actualmente en 2016 registra una producción de 29, 067 t, ocupando el segundo lugar en exportación seguido de Polonia y EUA (FAOSTAT, 2016, SIAP, 2016).

A nivel nacional en México, el 75% del cultivo del arándano se concentra en los estados de Jalisco, Colima y Michoacán (SIAP, 2016). En el estado de Oaxaca, a finales del año 2015, se establecieron tres parcelas demostrativas con arándano *var. biloxi* en El Carmen Santa Inés del Monte Zaachila (96°46'00" O, 16°56'00" N, a 2,400 msnm), Asunción Nochixtlán (17°27'00"N 97°13'00"O, a 2081 msnm) y San Pedro Nexicho (17°05'08"N, 96°31'36" O, a 2106 msnm); como resultado de un proyecto multidisciplinario desarrollado en el CIIDIR unidad Oaxaca y financiado por el IPN (Instituto Politécnico Nacional).

El arándano es una especie vigorosa, de rápido crecimiento y altos rendimientos, pero susceptible a varias enfermedades principalmente fúngicas que pueden alterar su desarrollo, acortar su vida productiva, afectar la calidad y cantidad del fruto (Díaz-Montenegro, 2002). El cultivo está expuesto a una serie de patógenos que causan daños importantes en la producción; por ejemplo, *Botrytis cinerea* es un hongo que causa serios problemas en flores y frutos de arándano (Miles y Schilder, 2008; Sisterna *et al.*, 2009; Kong *et al.*, 2010; Rivera *et al.*, 2013). Así mismo; los frutos en poscosecha pueden ser atacados por *Cladosporium herbarum*, *Botrytis cinerea*, *Penicillium spp.*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* y *Pestalotia guepini*; *Microsphaera vaccinii* y *Colletotrichum acutatum* (Figueroa *et al.*, 2010; Cline y Schilder, 2006; Wharton y Schilder, 2008). En necrosis en tallos y muerte regresiva se ha identificado a *Pestalotiopsis sp.* de manera asociada a *Neofusicoccum spp* (Espinoza *et al.*, 2009).

En México, se destacan los estudios realizados por Mondragón *et al.* (2012), quienes identificaron a 12 hongos asociados a pudrición del fruto (*Alternaria*, *Colletotrichum*), manchas foliares (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Neofusicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Stemphyllium*), roya (*Pucciniastrum*), atizonamiento y cáncer del tallo (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Neofusicoccum*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*) y tizón de yemas (*Chaetomium*, *Phoma*), siendo hasta ahorita los únicos identificados en Los Reyes, Michoacán, México.

En cuanto a estudios histopatológicos de arándano- *B. cinerea*, no se encontraron estudios específicos, sin embargo existen estudios donde mencionan alteraciones en diferentes órganos vegetales del género *Vaccinium*, en los que sobresalen trabajos como Milholland (1970) donde se observaron cambios histológicos en los tallos; Szyndel and Wisniewska (1982) descubrieron cambios histológicos en tallos de arándano infectados por *Godronia cassandrae* y *Botrytis cinerea*. Los cambios histológicos también pueden ser cambios naturales del mismo órgano de la planta como es el caso de Konarska (2015), el cual menciona cambios histológicos durante la ontogenia que tiene el fruto de arándano 'Bluecrop'. La rosa *et al.* (2017) estudiaron la morfología interna e histología de las semillas, hojas, tallos y raíces del arándano en Lima, Perú. La mayoría de casos son internacionales a nivel nacional no se han hecho investigaciones histopatológicas del fruto de arándano.

El control de las enfermedades de diversos cultivos generalmente se realiza a base de fungicidas sintéticos de amplio espectro, los cuales son tóxicos para la salud humana, generan resistencia en los patógenos, causan contaminación al medio ambiente y desequilibrio ecológico (Benito *et al.*, 2000). Sin embargo, diversos estudios han sugerido que el manejo de los patógenos se puede realizar bajo un enfoque sustentable ecológico utilizando aceites esenciales, feromonas, hongos entomopatógenos, depredadores y parasitoides (Espinoza *et al.*, 2009). Se sabe que los aceites esenciales son una opción viable para el control y la prevención de organismos patógenos, ya que son fuente abundante de compuestos bioquímicos que tienen actividad contra hongos, insectos y bacterias (Ramírez *et al.*, 2009).

En el sector agrícola, los aceites esenciales han demostrado eficacia, resaltando propiedades nematocidas, insecticidas y fungicidas (Macedo *et al.*, 2010; Granados-Echegoyen *et al.*, 2014; Aguilar-González *et al.*, 2015). Al respecto, el aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*) ha mostrado capacidad para inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* en fresa (Aguilar-González *et al.*, 2015); mientras que el aceite de poleo (*Clinopodium macrostemon*) ha mostrado efectividad para inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* en el cultivo de jitomate (Villa-Ruano *et al.*, 2015). La actividad antifúngica del AE de tomillo (*Thymus vulgaris*) se atribuye a compuestos específicos como el timol, p-cimeno, carvacrol y  $\gamma$ -terpibeno; los cuales inhiben el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Mandal y DebMandal, 2016).

El estado de Oaxaca posee regiones con climas específicos que son ideales para el cultivo de arándano. En la región de la Sierra Norte, específicamente en la localidad de San Pedro Nexicho se ha establecido una parcela demostrativa que ha demostrado la adaptabilidad del arándano var. Biloxi con alto potencial comercial; no obstante, la producción se ve limitada por factores fitosanitarios. La principal enfermedad que se presenta en el cultivo es la necrosis de los frutos; por esta razón, el presente estudio propone estudiar la etiología, histopatología y algunas alternativas de control para la citada enfermedad; en este contexto se han planteado los siguientes objetivos:

## **OBJETIVO GENERAL**

Determinar la etiología e histopatología de la necrosis del fruto de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) y la supresión biológica del patógeno mediante la aplicación de aceites esenciales vegetales en condiciones *in vitro*.

## **OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Identificar el agente causal primario que induce la necrosis del fruto de arándano.
2. Documentar los cambios histológicos que se manifiestan en el tejido de los frutos enfermos.
3. Determinar la efectividad biológica de los aceites esenciales de 10 especies vegetales para inhibir el crecimiento micelial *in vitro* del patógeno.

## **HIPÓTESIS**

- La necrosis del fruto de arándano es una enfermedad inducida por uno o varios microorganismos fungosos en fase anamórfica.
- La sintomatología de la necrosis del fruto es el resultado de la invasión intracelular del micelio del patógeno únicamente en las células cuticulares y epidermales.
- Al menos uno de los aceites esenciales tendrá un efecto fungistático/fungicida, *in vitro*, sobre el agente causal de la necrosis del fruto.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-González, A. E., Palou, E., and López-Malo, A. (2015). Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against grey mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32,181-185. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.09.003>
- Benito, E. P., Arranz, M., y Eslava, A. P. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S43-S46. Recuperado en <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S43S46.pdf>
- Cline, W.O., y Schilder, A. (2006). Identification and control of blueberry diseases. Pp.115-138. *In*: N.F. Childers y P.M. Lyrene, (eds.). *Blueberries for growers, gardeners, and promoters*. Dr. Norman F. Childers Publications, Melrose, Florida, USA. 266p
- Díaz-Montenegro, D.H. (2002). *Fisiología de árboles frutales*. AGT Editor. México, D. F. 390 p.
- Espinoza, J.G., Briseño, E. X., Chávez, E. R., Urbez-Torres, J. R., y Latorre, B.A. (2009). *Neofusicoccum spp.* Associated whit stem canker and dieback of blueberry in Chile. *Plant Disease*, 93 (11), 187-1194. <https://doi.org/10.1094/PDIS-93-11-1187>
- FAOSTAT. (2016). La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura <http://www.fao.org/faostat/es/#data>
- Figueroa, S.D., Guerrero, C.J., and Bensch, T.E. (2010). Efecto de momento de cosecha y permanencia en huerto sobre la incidencia de hongos de poscosecha en arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.), cvs. berkeley, brigitta y elliott durante la temporada 2005-2006. *IDESIA (Chile)*, 28 (2), 9-19. Recuperado en <https://scielo.conicyt.cl/pdf/idesia/v28n2/art02.pdf>
- Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Soto-Hernández, M., RuizVega, J., Lagunez-Rivera, L., Alonso-Hernández, N., and Gato-Armas, R. (2014). *Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of Pseudocalymma alliaceum*

- (*Bignonaceae*). *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(8), 594-601.  
[https://doi: 10.1016/S1995-7645\(14\)60101-2](https://doi.org/10.1016/S1995-7645(14)60101-2)
- Konarska, A. (2015). Morphological, anatomical, and ultrastructural changes in *Vaccinium corymbosum* fruits during ontogeny. *Botany*, 93, 589–602. [dx.doi.org/10.1139/cjb-2015-0050](https://doi.org/10.1139/cjb-2015-0050)
- Kong, C.S., Qiu, X.L., Yi, K.S., y Yu, X.F. (2010). First Report of *Neofusicoccum vitifusiforme* causing Blueberry Blight of blueberry in China. *The American Phytopathological Society*, 94(11), 1373. DOI: 10.1094/PDIS-05-10-0393
- La Rosa, R., Sánchez, M., and Pérez, E. (2017). Internal morphology and histology of blueberry *Vaccinium corymbosum* L. (*Ericaceae*) in Lima, Perú. *Agronomía Colombiana*, 35(2) 176-181. Doi: 10.15446/agron.colomb.v35n2.63146
- Macedo, I.T.F., Bevilaqua, C.M.L., De Oliveira, L.M.B., Camurca-Vasconcelos, A.L.F., Vieira, L.D., Oliveira, F.R., Queiroz, E.M., Tome, A.D., and Nascimento, N.R.F. (2010). Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 173, 93-98. DOI.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.004
- Mandal, S., and DebMandal, M. (2016). Chapter 94: Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* 825-834. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00094-8>
- Miles, T., y Schilder, A. (2008). Anthracnose Fruit Rot (*Ripe Rot*). Extension Bulletin E 3039. [https://archive.lib.msu.edu/DMC/extension\\_publications/e3039/E3039.pdf](https://archive.lib.msu.edu/DMC/extension_publications/e3039/E3039.pdf)
- Milholland, R. D. (1970). Histology of *Botryosphaeria* canker of susceptible and resistant highbush blueberries. *Phytopathology*, 60, 70-74. DOI:10.1094/Phyto-60-70
- Mondragón Flores, A., López Medina, J., Ochoa Ascencio, S., y Gutiérrez Contreras, M. (2012). Hongos Asociados a la Parte Aérea del Arándano en Los Reyes, Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30,141-144. Recuperado en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018533092012000200004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092012000200004&lng=es&nrm=iso)>

- Ramírez, K., Ortega, R., y Domínguez, V.G. (2009). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos vegetales inhibidores de *fusarium oxysporum f. sp. Gladioli* y *Curvularia f.sp. Gladioli*. Tesis de la Universidad Veracruzana, Facultad de Ciencias Químicas. Recuperado en <https://es.scribd.com/document/256477138/Actividad-Antifungica-in-Vitro-de-Extractos>
- Rivera, S.A., Zoffoli, J.P., and Latorre, B.A. (2013). Infection risk and critical period for the postharvest control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on blueberry in Chile. *Plant Disease*, 97:1069-1074. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-12-12-1112-RE>
- Servicio de información y Estadística Agroalimentaria y Pesca. (2016). SIAP. México.
- Sisterna, M.N., Pérez, B.A., Divo de Cesa, M., y Wright, E.R. (2009). Blueberry blight caused by *Bipolaris cynodontis* in Argentina. *Plant Pathology*, 58,399. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01967.x>
- Szyndel, M., and Wisniewska, J. (1982). Anatomical changes in the stems of highbush blueberry (*Vaccinium australe* Small), caused by the fungus *Godronia cassandrae f. vaccinii* (Peck) Groves. *Acta agrobotanica* 35,(1), 101-106. DOI: 10.5586/aa.1982.010
- Villa-Ruano N, Pacheco-Hernández Y, Cruz-Durán R Y Lozoya-Gloria E. (2015). Volatiles and seasonal variation of the essential oil composition from the leaves of *Clinopodium macrostemon* var. *laevigatum* and its biological activities. *Industrial Crops and Products*, 77,741-747. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.050>
- Wharton, P.S., y Schilder, A.C. (2008). Novel infection strategies of *Colletotrichum acutatum* on ripe blueberry fruit. *Plant Pathology*, 57,122-134. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01698.x>

## **CAPÍTULO I. REVISIÓN DE LITERATURA**

### **1. Origen del arándano y generalidades de la planta**

El género *Vaccinium* es originario del Hemisferio Norte, concretamente de Norteamérica (EE.UU. y Canadá). En 1911, Frederick Coville del Departamento de Agricultura de EE.UU. realizó los primeros intentos de domesticación de plantas silvestres o nativas de arándano encontradas en EE.UU.; posteriormente, y hasta la fecha, se realizan diversos proyectos que tienen como fin el mejoramiento genético del cultivo con fines comerciales (San Martín, 2013).

El género comprende un aproximado de 450 especies, pero sólo tres se cultivan en mayor cantidad, las cuales son: *Vaccinium angustifolium* Ait. (arándano bajo); *V. ashei* Reade (arándano ojo de conejo) y *V. corymbosum* L. (arándano alto) (Barbat, 2005).

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es una planta arbustiva caducifolia, de 2.5 a 3 m de altura; con hojas elípticas, pecioladas con disposición alternada simple (Fava, 2012). Sus flores son de color blanco o blanco-rosado y en racimos. Sus frutos son bayas, redondeados de color negro-azulado, de diámetro tamaño variable de 8 a 21 mm según la variedad, el fruto está cubierto por una capa de cera (Gayol, 2012). El periodo de desarrollo del fruto, entre la floración y la maduración, es de 90 a 120 días (OEIDRUS, 2011).

### **2. Clasificación taxonómica del arándano**

Reino: Plantae

Orden: Ericales

Familia: Ericaceae

Subfamilia *Vacciniaceae*

Género: *Vaccinium*

Especie: *V. corymbosum* L.

### **3. Especies comerciales de arándano**

La especie *V. corymbosum* L., se cultiva en 75% de la superficie mundial, las variedades comerciales son Bluecrop, Brigita, Elliott, Bluejay, Earliblue o llamados también arándanos altos del norte; mientras 'O'Neal', Misty, Star, Emerald, Sharpblue son arándanos altos del sur (Barbat, 2005). De estas últimas se han hecho mejoras y se han creado nuevas variedades como Biloxi, para adaptarlas a las diferentes condiciones de suelo, al mismo tiempo mejora la calidad del fruto dándole firmeza, mayor calibre, mayor vida de anaquel y almacenaje (San Martín, 2013).

La variedad Biloxi, liberada en 1998, requiere 400 h frío, su crecimiento es vigoroso de estructura arbustivo con una altura promedio de 2 m (Retamales y Hancock, 2011). Ésta variedad crece en suelos con pH entre 4.4 y 5.5, aunque en Chile crecen con pH de 5.8 a 6.0 (Rebolledo, 2013); el periodo de desarrollo del fruto, entre la floración y la maduración, es de 90 días; el fruto es mediano de 11 mm de diámetro, color azul claro con firmeza y buen sabor (San Martín, 2013).

### **4. Situación mundial del arándano**

De acuerdo con la FAOSTAT, en el año 2014 los principales productores de arándano fueron Estados Unidos y Canadá, que participaron con el 51.1 y 35.4% de la producción anual. Mientras que los países de la Unión Europea; entre ellos Polonia, Alemania, Francia, Países Bajos y España, aportaron el 8.78% de la producción. La producción en México creció de manera significativa en los últimos años; en 2010 se reportó una producción de 1, 059 ton; mientras que en 2014 la producción alcanzada fue de 18,031 ton lo que representa un incremento del 23.43% (FAOSTAT, 2014). En 2014; México tuvo una participación de 3.5% en la producción mundial que lo posicionó en el 3° lugar (Cuadro 1).

Cuadro 1. Países con mayor producción de arándano (t).

País/año	2010	2011	2012	2013	2014	Suma
EUA	188,926	196,905	227,900	246,573	262,539	1,122,843
Canadá	83,500	105,140	134,240	120,160	182,275	625,365
Polonia	9,125	8,595	11,251	12,731	12,469	54,241
Francia	11,001	9,379	8,161	9,011	9,200	46,752
Alemania	8,305	6,608	8,843	10,277	12,077	46,110
México	1,059	6,704	7,191	10,160	18,031	43,145
Países bajos	4,555	5,277	6,000	5,678	6,400	27,910
España	1,700	5,000	5,500	5,500	5,000	22,700
Nueva Zelandia	2,630	2,638	2,600	2,794	3,000	13,662
Suecia	2,500	2,600	3,000	2,733	2,675	13,558

Fuente: FAOSTAT, 2014.

El arándano se consume mayormente fresco; en algunos países se consume congelado; a continuación, se presentan los principales países exportadores y la manera en que se exporta el arándano (Cuadro 2) (SIAP, 2014).

Cuadro 2. Países exportadores de arándano (2008-2011).

Países/Consumo (t)	Año			
	2008	2009	2010	2011
<b>Fresco total</b>	<b>28,884</b>	<b>28,928</b>	<b>31,606</b>	<b>35,521</b>
Canadá	26,948	26,506	28,641	31,487
Japón	926	1,466	1,671	2,582
Otros	202	359	646	548
Hong Kong	128	180	318	352
Corea del Sur	150	131	238	188
Inglaterra	529	285	92	164

<b>Congelado total</b>	<b>13,384</b>	<b>9,014</b>	<b>14,826</b>	<b>16,279</b>
Canadá	4,260	2,706	7,227	9,164
Japón	6,768	2,838	2,719	3,069
Corea del Sur	256	234	938	2,070
México	770	909	910	540
Otros	494	980	1,345	478
Hong Kong	0	8	171	309
Australia	183	443	259	302
Inglaterra	140	206	157	203
China	515	691	1,101	144

Fuente: USDA

## 5. Situación nacional del arándano

De acuerdo al SIAP (2015), en México los principales estados productores de arándano fueron Jalisco (7,989 t); Colima (2,188 t); Baja California (1,875 t); Michoacán (1,548 t); Sinaloa (1,164 t); Puebla (672 t) y Sonora (15 t) (Figura. 1); siendo la variedad Biloxi la que se cultivó en mayor cantidad debido a su adaptación en México, aunque también se cultivó Sharpe Blue y Milenium con menor relevancia. Bascopé (2010) mencionó que prácticamente el 100% de la producción se destina al mercado de exportación. En promedio, el 70% se destina a EE.UU., el 30% restante se destina a Europa e incipientemente a Japón.

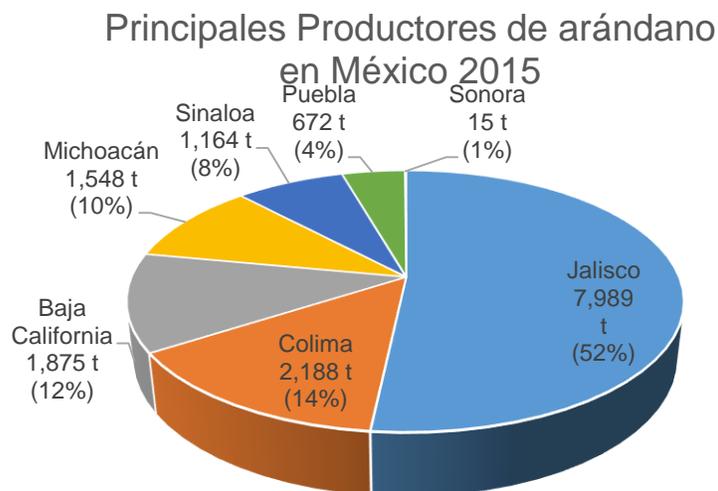


Figura. 1. Producción de arándano en México. Fuente: SIAP (2015), Anuario estadístico de la producción agrícola.

En la última década, la producción de arándanos en México se incrementó de manera importante; en 2007 se reportó que solamente se produjeron 124 t de frutos; mientras que en el año 2016 la producción fue de 29, 067 t; esto representó un aumento del 53% (Fig. 2) (SIAP, 2016).

Según Bascopé (2010), la industria mexicana del arándano es nueva y se está convirtiendo en un país importante de la producción mundial. El cultivo tiene ventajas comparativas y competitivas, entre ellas:

- Costo de mano de obra relativamente bajo.
- Cercanía con los mercados de exportación, principalmente EE.UU.
- Condiciones de suelo y clima óptimas para cultivo.
- Época de producción en los meses de altos precios (noviembre-marzo).

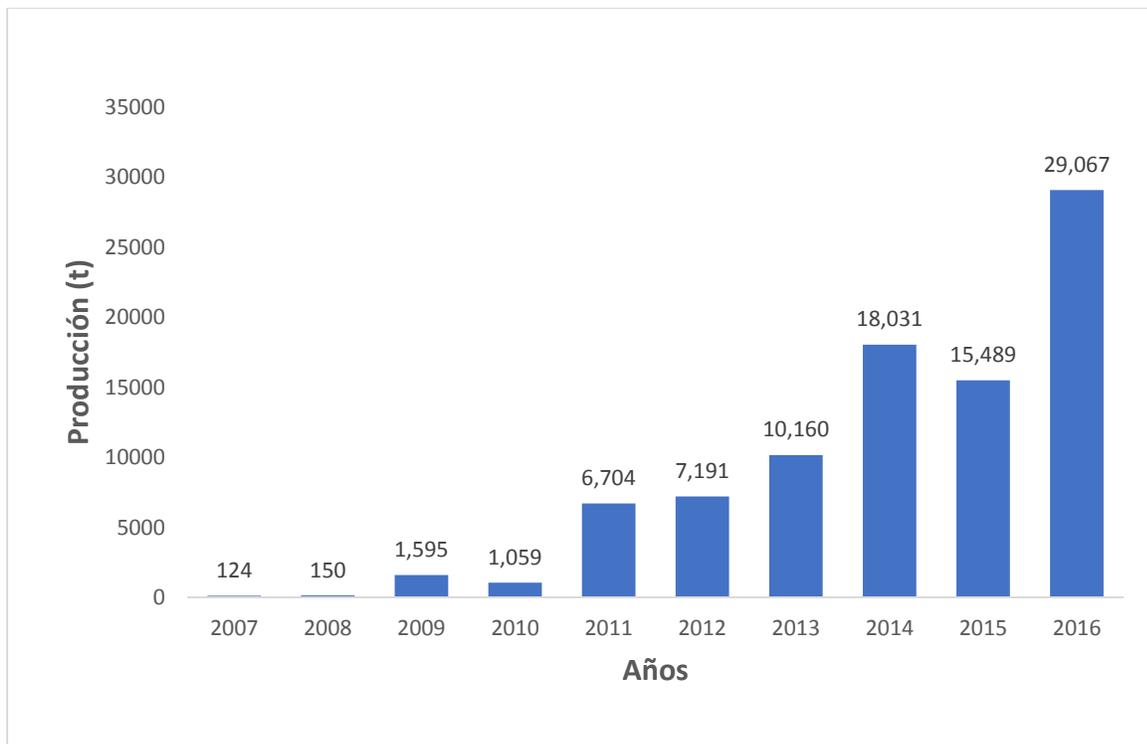


Figura. 2. Producción de arándano en México 2007- 2016. Fuente: SIAP, 2016.

## 6. Enfermedades del arándano

Las enfermedades del arándano son una importante limitante para la producción; éstas alteran el desarrollo, vida productiva, calidad y cantidad de frutos del cultivo (Díaz-Montenegro, 2002). La American Phytopathological Society (APS) reporta que en las plantas del género *Vaccinium*, incluyendo a *V. corymbosum*; *V. ashei*; *V. angustifolium* y *V. myrtilloides*, se presentan 32 enfermedades inducidas por organismos fúngicos; 14 por nematodos; 15 por virus; 5 por bacterias y 3 desórdenes fisiológicos. A continuación, se presentan las principales enfermedades fúngicas en el género *V. corymbosum* (Cuadro 3).

Cuadro 3. Principales enfermedades fúngicas en *V. corymbosum*

Enfermedades de frutos	Agente causal	Enfermedades de tallo	Agente causal
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pudrición y tizón</li> </ul>	<i>Botrytis cinerea</i> Pers. <i>Pestalotia</i> spp. <i>Pestalotia vaccinii</i> <i>Alternaria</i> spp. <i>Alternaria tenuissima</i> <i>Trichoderma</i> spp.	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tizón de tallo</li> </ul>	<i>Botryosphaeria dothidea</i> <i>Lasiodiplodia theobromae</i> <i>Neofusicoccum ribis</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Antracnosis</li> </ul>	<i>Colletotrichum acutatum</i> <i>Colletotrichum fioriniae</i> <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cancro en tallo</li> </ul>	<i>Botryosphaeria corticis</i>
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Momificación de frutos</li> </ul>	<i>Monilinia vaccinii corymbosi</i>		
Enfermedades de raíz	Agente causal	Enfermedades de flor	Agente causal
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pudrición de raíz</li> </ul>	<i>Armillaria gallica</i> <i>Armillaria mellea</i> <i>Armillaria solidipes</i>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tizón en flor</li> </ul>	<i>Botrytis cinerea</i> Pers
Enfermedades de hojas	Agente causal		
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Pudrición de hoja</li> <li>• marrón</li> <li>• Hoja roja</li> </ul>	<i>Septoria</i> sp.  <i>Exobasidium</i> sp. <i>Exobasidium vaccinii</i>		

Fuente: American Phytopathological Society; 2018

([www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Blueberry.aspx](http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Blueberry.aspx)).

Particularmente en México, se han reportado las siguientes enfermedades para el cultivo de arándano: pudrición de fruto (*Alternaria*, *Colletotrichum*,); manchas foliares en hojas (*Alternaria*, *Colletotrichum*, *Neofusicoccum*, *Pestalotiopsis*, *Phyllosticta*, *Stemphyllium*), roya (*Pucciniastrum*), atizonamiento.; cáncer del tallo (*Alternaria*, *Bipolaris*, *Colletotrichum*, *Curvularia*, *Neofusicoccum*, *Phomopsis*, *Pestalotiopsis*, *Phoma*) y tizón de yemas (*Chaetomium*, *Phoma*) (Mondragón *et al.*, 2012).

Por ser de interés en este estudio; se abundará sobre el patosistema arándano - *B. cinerea*. Este es un hongo polífago con un amplio rango de hospedantes siendo el agente causal de la podredumbre gris en diversos cultivos de importancia económica, tales como el arándano, la vid, las frutillas, el tomate, ornamentales etc. Se han reportado más de 170 plantas de diferentes familias atacadas por *B.cinerea* y se ha caracterizado aproximadamente 30 especies de este patógeno (Elad *et al.*, 2016).

### **Ciclo de infección**

De acuerdo a Jarvis (1977), es importante conocer el ciclo de infección de los patógenos para diversos fines, entre ellos para establecer estrategias de control; así pues, el ciclo de infección inicia cuando la espora del patógeno alcanza la superficie de la planta (huésped), el cual es transportado de diferentes maneras. El ciclo se compone de las siguientes fases:

- a) Adhesión. Las esporas se adhieren y germinan en la superficie de la planta huésped
- b) Penetración en el tejido de la planta, ya sea por medio de heridas o aberturas naturales.
- c) Formación de la lesión primaria, como consecuencia de defensa de la planta, al mismo tiempo el patógeno se establece por completo.
- d) Fase de latencia en donde los mecanismos de la planta controlan de manera temporal al patógeno, deteniéndolo en la lesión primaria
- e) Disgregación del tejido vegetal. El patógeno vence las defensas de las lesiones primarias de la planta, en un tiempo breve comenzara la colonización y maceración

del tejido infectado produciéndose una nueva generación de esporas y nuevo ciclo de infección.

De acuerdo a los estudios mencionados se puede apreciar la versatilidad del patógeno pues invade en cualquier estado de desarrollo de la planta. Cada fase del proceso de infección requiere diferentes estadios de desarrollo de la planta e implica la participación de diferentes factores de patogenicidad. Su identificación puede abordarse desde distintos puntos de vista y aplicando diversas estrategias diferentes, es por eso que se debe conocer tanto el cultivo como el patógeno (Benito *et al.*, 2000).

## **7. Antecedentes de estudios de etiología**

Los estudios etiológicos realizados en el patosistema arándano - *B. cinerea* se puede hacer referencia a Smith (1998) quien realizo primeros estudios donde evaluó arbustos de arándano rabbiteye (ojo de conejo) en maceta de cultivares como Climax, Premier y Tifblue y de la parte sur a Gulfcoast y Cooper; e inoculo a partir de una solución conidial de  $2.5 \times 10^5$  conidios  $m^{-1}$  de *Botrytis cinerea*, en la etapa de floración y para controlar el tizón de la flor al mismo tiempo evaluó 5 fungicidas. Los síntomas se presentaron a la semana 2 y 4, siendo *botrytis cinerea* patógeno de las flores y principalmente en el cultivar Tifblue siendo el más susceptible al tizón en la flor.

En Sudamérica, Argentina donde fue identificado a *botrytis cinerea* por Vasquez *et al.* (2007), en varias partes de la planta de arándano de la variedad O'Neal como: en flores, hojas, ramas tiernas, ramas y tallos viejos. Todos las partes presentaron la sintomatología de *botrytis cinerea*, como el color marrón, necrosis, marchitamiento, hasta llegar al colapso total. Todas las partes invadidas generaron micelio y esporas, posteriormente se aplicaron los postulados de Koch en plantas de 12 meses de edad de la misma variedad, utilizando una suspensión conidial de  $1 \times 10^6$  conidios  $mL^{-1}$  de agua destilada estéril; las lesiones observadas en campo se percibieron a los 4 días después de la inoculación en las plantas utilizadas.

Sin embargo el estudio hecho por Kwon *et al.* (2011) en Corea, es más completo, además de reportar por primer vez a *Botrytis cinerea* como patógeno en la poscosecha de arándano, proporcionan una descripción detallada del hongo, basada en características morfológicas y datos moleculares como su secuencia transcrita interna de rADN; así mismo la forma en el hongo invadía a flores y frutos antes de ser cortados. Así mismo lo que pasaba durante almacenamiento ya que dicho patógeno le favorece las condiciones frías y húmedas.

Otros estudios fueron dados a conocer por Rivera *et al.* (2013), donde mencionan a *Botrytis cinerea* como una enfermedad importante de los arándanos (*Vaccinium spp.*), en varias etapas como son la floración, frutificación y poscosecha. Para conocer el comportamiento del hongo se inoculó en flores y frutos de las variedades 'Brigitta' y 'Duke'; así mismo se aplicaron fungicidas en dichas etapas críticas del hongo para conocer su comportamiento del patógeno en las etapas principales del arándano.

Recientemente en estudios más avanzados se ha demostrado que *Botrytis cinerea* es una enfermedad poscosecha importante de los arándanos en el Valle Central de California, pero que a su vez consta de dos especies hermanas, denominadas Grupo I y Grupo II, según estudios hechos por Saito *et al.* (2014) en donde describen al Grupo I como una nueva especie, *B. pseudocinerea*. En esta investigación se aplicó las pruebas de patogenicidad en frutas de arándano, inoculando una suspensión conidial ( $1.0 \times 10^5$  esporas mL<sup>-1</sup>) cada fruto se le hizo una herida con una pipeta. Toda la fruta inoculada desarrollo pudrición, demostrando así que dicho hongo es patógeno; sin embargo en los caracteres morfológicos no se diferenciaron entre *B. cinerea* y *B. pseudocinerea*. A nivel Nacional destaca el trabajo de Mondragón Flores, *et al.* (2012) el cual realizó estudios de hongos asociados a sintomatologías en hojas, tallos y frutos del arándano para determinar su incidencia estacional, en los cuales no se aplicaron las pruebas de patogenicidad, pero no hubo ninguna asociación de *Botrytis cinerea* de las diferentes partes de la planta de arándano de dicha estudio.

## 8. Antecedentes de estudios de histopatología

No se encontraron estudios histológicos específicos que documenten sobre los cambios celulares que sufren los frutos maduros de *V. corymbosum* var. Biloxi infectados por *B. cinerea*. Existen estudios que registran las alteraciones histológicas que experimentan diferentes órganos vegetales del género *Vaccinium*; entre estos se puede citar a Milholland (1970) quien observó cambios histológicos en los tallos susceptibles donde hubo penetración por estomas de *Botryosphaeria corticis*, más no se encontró evidencia de penetración directa; los cambios se presentaron en el floema y corteza desorganizado, las hifas fueron intra e intercelulares, con un rango de 2 a 12  $\mu$ , de diámetro, al igual que los peritecios maduros se observaron 1 año después de la infección. En los tallos resistentes no hubo ninguna desorganización, ni estructuras de fructificación a los 18 meses después de la inoculación. Sin embargo Szyndel and Wisniewska (1982) si observaron cambios histológicos en tallos de arándano infectados por *Godronia cassandrae* al igual con *Botrytis cinerea* donde hubo células muertas del colénquima y parénquima cortical; también se encontraron picnidios en el colénquima característicos de la etapa conidial del hongo *G. cassandrae* (*Topospora myrtilli*), todos los tejidos enfermos se encontraron separados de los sanos por un capa de células, la cual inicio debajo de la epidermis.

Los cambios histológicos también pueden ser cambios naturales del mismo órgano de la planta como es el caso de Konarska (2015), el cual menciona cambios histológicos durante la ontogenia que tiene el fruto de arándano 'Bluecrop' en la estructura de la fruta y en el contenido de compuestos fenólicos, mismo que son relacionados con la firmeza y la vida útil de la fruta, ya que son importantes en la etapa de cuajado hasta la madurez de la cosecha. Estos resultados ayudan para la detección de manifestaciones tempranas del desarrollo de la fruta para la firmeza y calidad.

Un estudio similar presentó de La rosa *et al.* (2017) estudio la morfología interna e histología de las semillas, hojas, tallos y raíces del arándano en Lima, Perú. Donde se hicieron cortes transversales, superficiales y longitudinales de cada órgano. Se observaron diferencias en la morfología de las semillas y así entender la viabilidad de las semillas oleaginosas y la germinación. En tallos y raíces se observaron también la

morfología, como los vasos xilemáticos. También se observó que el sistema radical está muy ramificado debido a simbiosis con micorrizas. La mayoría de casos son internacionales a nivel nacional no se han hecho investigaciones histopatológicas del fruto de arándano.

El fruto de arándano es una baya que anatómicamente se compone de la epidermis externa, compuesta por una cutícula de 5  $\mu\text{m}$  de espesor, la cual se vuelve cerosa en la madurez (Gough, 1983). Posteriormente siguen tres estratos que son:

Epicarpo: consta de células epidérmicas y de tres a cuatro estratos de células subepidérmicas. Los pigmentos antociánicos están en ambas capas ubicados en depósitos, sin espacios intercelulares. Ambas capas están delineadas por un anillo de haces vasculares. Las células piedra se producen con mayor frecuencia en las células epidérmicas.

Mesocarpo: está compuesto por células parenquimáticas son grandes, redondeadas bien organizadas. El parénquima contiene a veces grupos de esclereidas dispersos. Además está rodeado por dos o más anillos vasculares; aquí las células de piedra se distribuyen de manera desigual a lo largo de todo el estrato; todos los grupos de células funcionan como mecanismo de soporte para el fruto. Dentro del mesocarpo también se encuentran carpelos los cuales contienen cinco placentas, se unen hasta 65 semillas.

Endocarpo: es la parte interna del fruto; este estrato pedregoso rodea a los lóculos y se extiende hacia el mesocarpo (Gough, 1983; Sajur *et al.*, 2007; Fava, 2012).

## **9. Antecedentes de estudios de aceites esenciales vs *B. cinerea***

La mayoría de los métodos y estrategias empleadas para el control de fitopatógenos se basan en el empleo de agentes químicos. Sin embargo, la utilización de fungicidas es cada vez menos recomendable y más restringida debido a los problemas de contaminación ambiental que de su aplicación se derivan y por la frecuente aparición de cepas de los patógenos resistentes a los fungicidas utilizados (Benito *et al.*, 2000). En

este contexto, se buscan alternativas sustentables para el control de patógenos; una de ellas es el uso de aceites esenciales derivados de diversas especies vegetales.

Los aceites esenciales (AE) son fracciones líquidas volátiles, generalmente destilables por arrastre con vapor de agua, que contienen las sustancias responsables del aroma de las plantas. De acuerdo a Martínez (2003), los aceites esenciales generalmente son mezclas complejas de hasta más de 100 componentes los cuales en su mayoría son metabolitos secundarios (MS) y se pueden clasificar en:

- Compuestos alifáticos de bajo peso molecular (alcanos, alcoholes, aldehídos, cetonas, ésteres y ácidos),
- Monoterpenos: se denominan aceites esenciales monoterpenoides (p.ej. hierbabuena, albahaca, salvia, etc.).
- Sesquiterpenos: los aceites esenciales sesquiterpenoides (p.ej. copaiba, pino, junípero, etc.)
- Fenilpropanos: los aceites esenciales fenilpropanoides (p.ej. clavo, canela, anís, etc.)

Todos estos componentes actúan como biocontroladores. Los metabolitos secundarios poseen bajo peso molecular y no son esenciales para el proceso metabólico básico de la planta (Ducrot, 2005). Los estudios se han intensificado en los metabolitos secundarios, los cuales están implicados en el control biológico contra patógenos o plagas y en ciertos casos activando procesos de defensa en la planta y brindando una protección preventiva (Kagale *et al.*, 2004). En el caso de microorganismos fitopatógenos, existe información de aproximadamente de 400 especies de plantas con propiedad fungicida (Bernal-Alcocer *et al.*, 2005).

A la fecha se ha investigado varios miles de metabolitos secundarios los cuales se han aislado y se han determinado su estructura por espectrometría de masas, resonancia magnética nuclear o difracción de rayos X (Cuadro 4) (Wink, 2010).

Cuadro 4. Metabolitos secundarios (MS) identificados a partir de plantas superiores (Wink, 2010)

<b>Tipo de MS</b>	<b>Número<sup>a</sup></b>
<b>Que contienen nitrógeno</b>	
Alcaloides	21 000
Aminoácidos-no proteicos (NPAAs)	700
Aminas	100
Glucosidos cianogénicos	60
Glicosinolatos	100
Alcámidas	150
Lectinas, Péptidos, Polipéptidos	2000
<b>Sin nitrógeno</b>	
Monoterpenos (C10) <sup>b</sup>	2500
Sesquiterpenos (C15) <sup>b</sup>	5000
Diterpenos (C20) <sup>b</sup>	2500
Triterpenos, Esteroides, Saponinas (C30, C27) <sup>b</sup>	5000
Tetraterpenos (C40) <sup>b</sup>	500
Flavonoides, Taninos	5000
Fenilpropanoides, Ligninas, Cumarinas, Lignanós	2000
Poliacetilénos, Ácidos grasos, Ceras	1500
Policétidos	750
Carbohidratos, Ácidos orgánicos	200

<sup>a</sup>Número aproximado de estructuras conocidas

<sup>b</sup>Número total de terpenoides supera los 22000 en la actualidad

Diversos estudios mencionan la alta actividad que poseen los aceites esenciales para combatir agentes patógenos, ya sean de naturaleza microbiana o fúngica; en el Cuadro 5 se detallan algunos aceites con sus principales componentes (Noriega-Rivera, 2009).

Cuadro 5. Aceites esenciales y componentes (Noriega-Rivera, 2009).

<b>Aceite esencial</b>	<b>Componentes</b>
Ajenjo ( <i>Artemisa absintium</i> )	Tuyona, tuyol.
Anís verde ( <i>Pinpinella anisum</i> )	Acetol
Canela ( <i>Cinnamomun zeylanicum</i> )	Aldehído cinámico, eugenol
Clavo ( <i>Syzygium aromaticum</i> )	Eugenol
Eucalipto ( <i>Eucalyptus globulus</i> )	Eucaliptol
Hinojo ( <i>Foeniculum vulgare</i> )	Acetol
Lavanda	Linalol, acetato de linalillo
Menta ( <i>Menta piperita</i> )	Mentol
Melisa ( <i>Melissa officinalis</i> )	Citral, citronelal
Orégano ( <i>Origanum vulgare</i> )	Timol, carvacrol
Pino ( <i>Pinus sylvestris</i> )	Pineos, limonemos
Romero ( <i>Rosmarinus offincinalis</i> )	Alcanfor, ciñelo
Ruda ( <i>Ruta graveolens</i> )	Metilnonil acetona
Tomillo ( <i>Timus vulgaris</i> )	Timol, carvacrol

Los AE tienen uso potencial en la industria cosmética (perfumes y aromatizantes), farmacéutica (saborizantes), alimenticia (condimentos y saborizantes) (Bakkali *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010) y agrícola; en esta última, los AE han demostrado propiedad nematocida, insecticida y fungicida (Macedo *et al.*, 2010; Granados-Echegoyen *et al.*, 2015; Aguilar-González *et al.*, 2015).

Estudios previos han documentado de manera precisa que los AE tienen un efecto antifúngico sobre el crecimiento y desarrollo de hongos fitopatógenos. Al respecto, Aguilar-González *et al.* (2015), demostraron que el aceite esencial de *Syzygium aromaticum* tuvo capacidad para inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* inoculado en fresa; la concentración inhibidora mínima (CMI) *in vitro* e *in vivo* para el aceite esencial de clavo fue de 92.56  $\mu\text{L L}^{-1}$  y la actividad fúngica se atribuyó al eugenol, componente principal del AE. También se ha demostrado el efecto antimicrobiano del aceite de poleo (*Clinopodium macrostemum*) sobre cepas de *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas*

*syringae* y *Fusarium oxysporum* (Villa-Ruano *et al.*, 2015) atribuido a compuestos de monoterpenos oxigenados de tipo metano como la mentonona y el óxido de piperitona. En el caso del AE de bejuco de ajo (*Pseudocalymma alliaceum*), Granados-Echegoyen *et al.* (2015) demostraron que posee un alto potencial larvicida en poblaciones del mosquito *Culex quinquefasciatus*; y atribuyeron esta actividad a compuestos de Disulfuro de dialilo, sulfito de dialilo y trisulfuro, di-2-propenilo. Sin embargo Aswini *et al.* (2009) menciona que el bejuco de ajo en extracto con agua y solventes (cloroformo, éter y petróleo) tiene excelente actividad antifúngica contras a *Colletotricum gloeosporioides* Penz. y *Botryodiplodia theobromae* Pat. agentes causales de las enfermedades de poscosecha del mango, la antracnosis y la pudrición del tallo

La actividad antifúngica del AE de *Thymus vulgaris* se atribuye a compuestos específicos como el timol, p-cimeno, carvacrol y  $\gamma$ -terpibeno; los cuales inhiben el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Mandal y DebMandal 2016) y de *B. cinerea* en lesiones de hojas necróticas de uvas inducidas artificialmente (Walter *et al.*, 2001).

Los AE también poseen actividad parasitaria, Pereira *et al.* (2017) demostraron que el aceite de romero (*Rosmarinus officinalis* L.) tuvo efecto biocida contra *T. cruzi* Chagas y *L. brasiliensis* Vianna *in vitro*, en dosis de 125  $\mu\text{g L}^{-1}$  y 62.5  $\mu\text{g L}^{-1}$ .; atribuido a los compuestos  $\alpha$ -pynene, alcanfor, 1, 8 cienole y  $\beta$ -cariofileno. En otro estudio realizado por Granados-Echegoyen *et al.* (2015) se encontró que el aceite de aguacatillo (*Persea americana*) es un excelente larvicida contra larvas de *Culex quinquefasciatus* debido a la acción de moléculas como estragol, sabineno y 1R- $\alpha$ -pineno (14.25%). El aceite de eucalipto (*Eucalyptus*) se considera como un fungitóxico para *Botrytis cinerea* debido a la acción de los compuestos 1,8 cineol,  $\beta$ -pineno, y  $\alpha$ -pineno (Thiago *et al.*, 2018; Tripathi *et al.*, 2008).

En el aceite de pirul (*Schinus molle*) Martins *et al.* (2014) hizo la caracterización química de varias partes de la planta como las hojas y frutas de *Schinus molle*, donde encontraron en su mayoría compuestos hidrocarburos monoterpenos, como  $\alpha$ -felandreno,  $\beta$ -felandreno,  $\beta$ -mirceno, limoneno y  $\alpha$ -pineno; mientras tanto López *et al.* (2014) lo

menciona como excelente insecticida en contra de la mosca *Haematobia irritans* L. donde la efectividad fue del 96-100% de mortandad en las moscas. Y recientemente López-Menenses *et al.* (2018) cargaron de nanoparticulas al aceite esencial de pirul para evitar su degradación y mejorar la acción antifúngica en contra de *Aspergillus parasiticus* inhibiendolo en 80% la producción de la germinación de esporas

Existen muchos antecedentes de aceites esenciales donde se puede ver el potencial que tienen sobre la variedad de patógenos que hay en los diversos cultivos, pero falta mucho por seguir investigando.

## BIBLIOGRAFÍA

- Aguilar-González, A. E., Palou, E., and López-Malo, A. (2015). Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against grey mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 181-185. doi: 10.1016/j.ifset.2015.09.003
- American Phytopathological Society (APS). (2018). Recuperado en <http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Blueberry.aspx>
- Aswini, D., Prabakar, K., Rajendran, L., Karthikeyan, G., Raguchander, T. (2009) Efficacy of new EC formulation derived from garlic creeper (*Adenocalymma alliaceum* Miers.) against anthracnose and stem end rot diseases of mango. *World J Microbiol Biotechnol.* 26, 1107–1116. DOI 10.1007/s11274-009-0277-y
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2), 446–475. Doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106
- Barbat, T. (2005). El arándano, ¿Un cultivo con futuro? *Revista Horticultura*, 187, 30-36. Recuperado en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=1223999>
- Bascope, J. A. (2010). Realidad productiva del arándano en EE.UU. y México. ODEPA, Santiago de Chile Pg. 24. Recuperado en <http://www.agrimundo.cl/wp-content/uploads/Informe-ArándanoVF21012013.pdf>
- Benito, E. P; Arranz, M y Eslava, A. P. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S43-S46. Recuperado en <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S43S46.pdf>
- Bernal-Alcocer, A., Zamora-Natera, J.F., Virgen-Calleros, G., y Nuño-Romero, R. (2005). Actividad biológica in vitro de extractos de *Lupinus spp.* Sobre hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23,140-146. Recuperado en <http://www.redalyc.org/articulo.oa?id=61223205>

- Carrieri, R., Carotenuto, G y Lahoz, E. (2013). Characterization and pathogenicity of *Pestalotiopsis uvicola* causing black leaf spot on carob (*Ceratonia Siliqua* L.) in Italy. *European Journal of Plant Pathology*, 137 (4), 655-661. DOI.org/10.1007/s10658-013-0287-3
- Cline, W.O. y Schilder, A. (2006). Identification and control of blueberry diseases. Pp.115-138. In: N.F. Childers y P.M. Lyrene, (eds.). Blueberries for growers, gardeners, and promoters. Dr. Norman F. Childers Publications, Melrose, Florida, USA. 266p. DOI.org/10.1007/978-3-319-23371-0\_1
- Díaz- Montenegro, D.H. (2002). Fisiología de árboles frutales. AGT Editor. México, D. F. 390 p.
- Ducrot, P.H. (2005). Organic chemistry's contribution to the understanding of biopesticida activity of natural products from higher plants. pp. 47-58. In: Regnault, R.C., B.J.J. Philogene y C. Vincent (eds.). Biopesticides of plant origin. Lavoiser and Intercept, Ltd., Paris and Andover. 313 p.
- Elad Y., Vivier M., Fillinger S. (2016) *Botrytis*, the Good, the Bad and the Ugly. In: Fillinger S., Elad Y. (eds) *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer, Cham. DOI.org/10.1007/978-3-319-23371-0\_1
- Espinoza, J. G., Briseño, E.X., Chávez, E.R., Urbez- Torres, J.R., y Latorre, B.A (2009). *Neofusicoccum spp.* Associated whit stem canker and dieback of blueberry in Chile. *Plant Disease*, 93, 1187-1194. DOI: 10.1094/PDIS-93-11-1187
- Espinoza, J. G., Briseño, E.X., Keith, L.M y Latorre, B. A. (2008). Canker and twig dieback of blueberry caused by *Pestalotiopsis spp.* And a *Truncatella sp.* In Chile. *Plant Disease*, 92, 1407- 1414. DOI: 10.1094/PDIS-92-10-1407
- FAOSTAT (2014). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura <http://www.fao.org/faostat/es/#data>
- Fava, J. (2012). Anatomía aplicada al diseño de tecnologías de procesamiento mínimo en frutos (bayas) de *Vaccinium corymbosum* L. (*Ericaceae*), *Solanum lycopersicum* L. var. *cerasiforme* (*Solanaceae*) y *Vitis labrusca* L. (*Vitaceae*).

- Gayol, C. J. (2012). Manual práctico para la creación y desarrollo de plantaciones de arándanos en Austrias. Austria. Pg. 2.
- Gough, R. E. (1983). The highbush blueberry and its management. Food products Press. Haworth Prees, Inc., Binghamton, NY.
- Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Alonso-Hernández, N., Vásquez-López, A., Lagunez-Rivera, L., Rojas-Olivosd, A. (2015). Chemical characterization and mosquito larvicidal activity of essential oil from leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae) against *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 5, (6), 463-467. DOI: 10.1016/S2222-1808(15)60816-7
- Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Soto-Hernández, M., Ruiz-Vega, J., Lagunez-Rivera, L., Alonso-Hernández, N., and Gato-Armas, R. (2014). *Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of Pseudocalymma alliaceum (Bignoniaceae)* *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(8), 594-601. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60101-2
- Jarvis WR. (1977). *Botryotinia* and *Botrytis* species. Taxonomy and pathogenicity. Can Dep Agric. Monogr 15, Harrow, Ontario, Canadá.
- Kagale, S.; Marimuthu, T.; Thayumanavan, B.; Nandakuman, R. y Samiyappan, R. (2004). Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 65(2), 91-100. DOI.org/10.1016/j.pmpp.2004.11.008
- Konarska, A. (2015). Morphological, anatomical, and ultrastructural changes in *Vaccinium corymbosum* fruits during ontogeny. *Botany*, 93, 589–602. dx.doi.org/10.1139/cjb-2015-0050

- Kong, C.S., Qiu, X.L., Yi, K.S y Yu, X.F. (2010). First Report of *Neofusicoccum vitifusiforme* causing Blueberry Blight of blueberry in China. *The American Phytopathological Society*, 94(11), 1373. DOI: 10.1094/PDIS-05-10-0393
- Kwon, Jin-Hyeuk., Cheon, Mi-Geon., Choi, Okhee., and Kim Jinwoo. (2011). First Report of *Botrytis cinerea* as a Postharvest Pathogen of Blueberry in Korea. *Mycobiology*, 39(1), 52-53. DOI:10.4489/MYCO.2011.39.1.052
- La Rosa, R., Sánchez, M., and Pérez, E. (2017). Internal morphology and histology of blueberry *Vaccinium corymbosum* L. (*Ericaceae*) in Lima, Perú. *Agronomía Colombiana*, 35(2) ,176-181. Doi: 10.15446/agron.colomb.v35n2.63146
- López, A., Castro, S., Andinaa, M.J., Ures, X., Munguía, B., Llabotb, J.M., Elder,H., Dellacassa, E., Palma, S. y Domingueza, L. (2014). Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 53, 209-216. DOI.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.038
- López-Menenses, A. K., Plascencia-Jatomea, M., Lizardi-Mendoza, J., Fernández-Quiroz, D., Rodríguez-Felix, F., Mouriño-Perez, R.R., and Cortez-Rocha, M. O. (2018). *Schinus molle* L. essential oil-loaded chitosan nanoparticles: Preparation, characterization, antifungal and anti-aflatoxigenic properties. *Food Science and Technology*, 96, 597-603. DOI.org/10.1016/j.lwt.2018.06.013
- Macedo, I. T. F., Bevilaqua, C. M. L., de Oliveira, L. M. B., Camurca Vasconcelos, A. L. F., Vieira, L. D., Oliveira, F. R., Queiroz, E. M., Tome, A. D., and Nascimento, N. R. F. (2010). Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*,173(1-2) ,93-98. DOI.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.004
- Mandal, S., and DebMandal, M. (2016). Chapter 94: Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* 825-834. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00094-8>
- Martínez, A. (2003). Aceites esenciales. Facultad Química Farmacéutica Medellín, Atioquia.

- Martins, M.R., Arantes, S., Candeias, F., Tinoco, M.T., Cruz-Mora, J. (2014). Antioxidant, antimicrobial and toxicological properties of *Schinus molle* L. essential oils. *Journal of Ethnopharmacology*, 151(1), 485-492. DOI.org/10.1016/j.jep.2013.10.063
- Miles, T., y Schilder, A. (2008). Anthracnose Fruit Rot (*Ripe Rot*). Extension Bulletin E 3039. [https://archive.lib.msu.edu/DMC/extension\\_publications/e3039/E3039.pdf](https://archive.lib.msu.edu/DMC/extension_publications/e3039/E3039.pdf)
- Milholland, R. D. (1970). Histology of *Botryosphaeria* canker of susceptible and resistant highbush blueberries. *Phytopathology*, 60, 70-74. DOI:10.1094/Phyto-60-70
- Mondragón Flores, A., López Medina, J., Ochoa Ascencio, S., y Gutiérrez Contreras, M. (2012). Hongos Asociados a la Parte Aérea del Arándano en Los Reyes, Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30,141-144. Recuperado en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018533092012000200004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092012000200004&lng=es&nrm=iso)>
- Noriega Rivera, P .F. (2009). Extracción, química, actividad biológica, control de calidad y potencial económico de los aceites esenciales. La Granja. *Revista de Ciencias de la vida*, 10(2), 3-15. ISSN: 1390-3799.
- OEIDRUS, (2011). Oficina estatal de Información para el Desarrollo Rural Sustentable. México
- Pereira, P.S., Maia, A.J., Tintino, S.R., Oliveira-Tintino, C.D.de.M., Raulino, I.S.de S., Vega, M.C., Rolón, M., Coronel, C., Marivando B, L., Duarte, A.E., Menezes, de R.A.I, E., Coutinho D.M.H., G da Silva, T. (2017). Trypanocide, antileishmania y actividades citotóxicas del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L *in vitro*. *Industrial Crops and Products*, 109, 724-729. DOI.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.030
- Rebolledo, C. (2013). Establecimiento del arándano. Eds. Undurraga, P. y Vargas, S. Manual del arándano. Boletín INIA N° 263. 120 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile

- Rivera, S. A., Zoffoli, J. P., and Latorre, B. A. (2013). Infection risk and critical period for the postharvest control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on blueberry in Chile. *Plant Disease*, 97, 1069-1074. DOI.org/10.1094/PDIS-12-12-1112-RE
- Saito, S., Michailides, T. J., and Xia, C. L. (2014). First report of *Botrytis pseudocinerea* causing gray mold on blueberry in North America. *Disease Notes*, 98(12), 1743. DOI.org/10.1094/PDIS-06-14-0573-PDN
- Sajur, S. A.; Ferullo L. M.; Isla, M. I. (2007). Anatomía del fruto de *Vaccinium corymbosum*: fresco y conservado en sistemas combinados no convencionales Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas. Santiago de Chile. Núm. 5; 6: 223-224
- San Martín, J. (2013). Situación varietal en arándano. Eds. Undurraga, P. y Vargas, S. Manual del arándano. Boletín INIA N° 263. 120 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile.
- Servicio de información y Estadística Agroalimentaria y Pesca (2015). SIAP. México.
- Servicio de información y Estadística Agroalimentaria y Pesca (2016). SIAP. México
- Sisterna, M.N., Pérez, B.A., Divo de Cesa, M., y Wright, E.R. (2009). Blueberry blight caused by *Bipolaris cynodontis* in Argentina. *Plant Pathology*, 58,399. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.2008.01967.x>
- Smith, B. J. (1998). Botrytis blossom blight of southern blueberries: Cultivar susceptibility and effect of chemical treatments. *Plant Disease*, 82(8), 924-927. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.8.924>
- Szyndel, M., and Wisniewska, J. (1982). Anatomical changes in the stems of highbush blueberry (*Vaccinium australe* Small), caused by the fungus *Godronia cassandrae* f. *vaccinii* (Peck) Groves. *Acta Agrobotanica* 35, (1), 101-106. DOI: 10.5586/aa.1982.010
- Thiago P. Chaves, T. P; E. Pinheiro, R. E; Melo, E. S; Soares, Ma. J. dos S; N.Souza, J. S; De Andrade, T. B; Gomes de Lemos, T. L; M. Coutinho, H. D. (2018). Essential

oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates  $\beta$ -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. *Industrial Crops and Products*, 112, 70-74. DOI.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.048

Tripathi, P., Dubey, N. K. y Shukla, A.K. (2008). Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 39–46. DOI.org/10.1007/s11274-007-9435-2

Vasquez, P., Baldomá, J. A., Wright, E. R., Pérez, A., and Divo de Sesar, M. (2007). First report of blueberry *Botrytis* blight in Buenos Aires, entre Ríos, and Córdoba Argentina. *Disease Notes*, 91(5), 639. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-5-0639C>

Villa-Ruano N, Pacheco-Hernández Y, Cruz-Durán R Y Lozoya-Gloria E. (2015). Volatiles and seasonal variation of the essential oil composition from the leaves of *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum* and its biological activities. *Industrial Crops and Products*, 77,741-747. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.050>

Walter, M., Jaspers, M. V., Eade, K., Frampton, C. M., and Stewart, A. (2001). Control of *Botrytis cinerea* in grape using thyme oil. *Australasian Plant Pathology*. 30: 21–25

Wang, J. H., Liu, H., Zhao, J. L., Gao, H. F., Zhou, L. G., Liu, Z. L., Chen, Y. Q., and Sui, P. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of the root bark essential oil of *Periploca sepium* and its main component 2-hydroxy-4methoxybenzaldehyde. *Molecules*, 15, 5807-5817. 37. DOI: 103390/molecules15085807

Wharton, P.S., y Schilder, A.C. (2008). Novel infection strategies of *Colletotrichum acutatum* on ripe blueberry fruit. *Plant Pathology*, 57,122-134. DOI.org/10.1111/j.1365-3059.2007.01698.x

Wink, M. (2010). *Biochemistry of Plant Secondary Metabolism*. (2°.Ed.). Gerny: Blakwell Publishing Ltd. Annual Plant Reviews, Vol 40.

## **CAPÍTULO 2. ETIOLOGÍA E HISTOPATOLOGÍA DE LA NECROSIS DEL FRUTO DE ARÁNDANO (*Vaccinium corymbosum* L.), EN SAN PEDRO NEXICHO, OAXACA**

### **RESUMEN**

La necrosis del fruto de arándano es una enfermedad importante del cultivo en la región de la Sierra norte del estado de Oaxaca. El objetivo del presente estudio fue determinar la etiología e histopatología de la enfermedad en frutos producidos en San Pedro Nexicho, Oaxaca, México. De frutos maduros sintomáticos se aisló consistentemente a *Botrytis* sp. Se verificó la patogenicidad mediante la inoculación una solución conidial de  $1 \times 10^3$  esporas  $\text{mL}^{-1}$  sobre 100 frutos sanos; A los 50 frutos control se les colocó agua destilada estéril. Después de 8 días de inoculación se presentaron hendiduras con lesiones café claro y con esporulaciones de color café claro; los frutos control permanecieron sanos; se reaisló *B. cinerea* de los frutos necrosados, para la caracterización morfológica y molecular. Los daños anatómicos en los frutos se presentaron a partir del día 4, donde la capa de cera ya no se observó y las células de la epidermis se observaron desorganizadas; a los 8 días después de la inoculación no se observó la capa de cera y las células de la epidermis se observaron desorganizadas y con lisis por lo que los polifenoles no se mantuvieron dentro. Entre las células del parénquima se observaron fragmentos de micelio semejante a *B. cinerea*. La pudrición completa fue a los 12 días. Con base al estudio, se determinó a *Botrytis Cinerea* como agente causal de la necrosis y daño anatómico del fruto de arándano en San Pedro Nexicho, Oaxaca, siendo este el primer reporte de patógeno para México.

**Palabras clave:** *Botrytis cinerea*, necrosis, daños anatómicos.

## CHAPTER 2. ETIOLOGY AND HISTOPATHOLOGY OF THE NECROSIS OF THE FRUIT OF BLUEBERRY (*Vaccinium corymbosum* L.), IN SAN PEDRO NEXICHO OAXACA

### ABSTRACT

The necrosis of the blueberry fruit is an important crop disease in the northern Sierra region of the state of Oaxaca. The objective of the present study was to determine the etiology and histopathology of the disease in fruits produced in San Pedro Nexicho, Oaxaca, Mexico. *Botrytis* sp was consistently isolated from ripe fruits. The pathogenicity was verified by inoculating a conidial solution of  $1 \times 10^3$  spores mL<sup>-1</sup> on 100 healthy fruits; sterile distilled water was applied to the 50 control fruits. After 8 days of inoculation, clefts with light brown lesions and a light brown sporulation were formed; the control fruits remained healthy; *B. cinerea* was re-isolated from the necrotized fruits for the morphological and molecular characterization. The anatomical damages in the fruits appeared from day 4, where the wax coating was no longer observed and the epidermis cells were observed disorganized; 8 days after the inoculation, the wax coating was not observed and the epidermis cells were observed disorganized and with lysis, so the polyphenols did not remain inside. Fragments of mycelium similar to *B. cinerea* were observed among the parenchymal cells. The complete rotting process took 12 days. Based on the study, *Botrytis Cinerea* was determined as the causative agent of the necrosis and the anatomical damage of the blueberry fruit in San Pedro Nexicho, Oaxaca, this being the first report of the pathogen for Mexico.

**Key words:** *Botrytis cinerea*, necrosis, anatomical damage

## INTRODUCCIÓN

El arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) es una planta originaria de Norteamérica (EE.UU. y Canadá). A principios de 1911, en el Departamento de Agricultura de EE.UU. se implementó un programa de mejoramiento genético (San Martín, 2013), que sentó bases, para la creación de variedades mejoradas que han conducido con éxito al manejo comercial del cultivo. En la actualidad, los países con mayor producción de arándano son EEUU (262,539 t); Canadá (182,275 t), México (18,031 t) y Polonia (12,469 t) (FAOSTAT, 2014). En México, la producción de la frutilla se ha incrementado de manera significativa. De acuerdo al SIAP, 2016, en el año 2007 sólo se registró una producción de 124 t; en tanto que en 2011 se produjeron 6,704 t y en 2016 la producción fue de 29,067 t. Actualmente, la producción se concentra en los estados de Jalisco (52%), Colima (14%), Baja California (12%), Michoacán (10%) y Sinaloa (8%) (SIAP, 2016).

El arándano es una especie vigorosa con altos rendimientos, pero susceptible a varias enfermedades principalmente fúngicas que afectan considerablemente su vida productiva pero sobre todo la calidad y cantidad del fruto (Díaz-Montenegro, 2002). El fruto del arándano es susceptible a diversas enfermedades, entre ellas se encuentra la pudrición que puede ser inducida por *Botrytis cinerea* Pers, *Alternaria* spp., *Alternaria tenuissima*, *Colletotrichum acutatum*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Monilinia vaccinii corymbosi* (APS, 2018). Específicamente en Chile se ha reportado que la pudrición de frutos por *Botrytis cinerea*, *Cladosporium herbarum*, *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Pestalotia guepini* y *Penicillium* sp. en tres variedades de arándano Berkeley, Brigitta y Elliott (Figueroa *et al.*, 2010). En México se ha reportado que la enfermedad es asociado a sintomatologías presentes en frutos del arándano, inducida por *Alternaria* y *Colletotrichum*, los cuales fueron reportados en el estado de Michoacán (Mondragón *et al.*, 2012).

En el estado de Oaxaca, en el año 2015, se estableció un lote con el cultivo de arándano de la var. *biloxi* en San Pedro Nexicho. A partir del año 2016, se observó que las plantas son atacadas por una enfermedad cuya sintomatología fue necrosis en tallos dejándolos secos por completo; en flores también se presentó marchitamiento y necrosis

lo cual llevaba al aborto del fruto; en frutos de 20 mm de diámetro fueron más severos los daños, los cuales presentaban hundimientos y necrosis en color café llegando al crecimiento de micelio y producción de esporas en la parte superficial del fruto, mientras internamente el fruto ya se encontraba deshidratado más de la mitad, la cual presentaba una consistencia corchosa en color café oscuro.

Debido a que el cultivo del arándano es de reciente introducción en Oaxaca, no se ha determinado el agente causal primario de la enfermedad y mucho menos se ha caracterizado cómo incide el patógeno a nivel celular; en este contexto, el objetivo del presente estudio fue determinar la etiología e histopatología de la pudrición del fruto de arándano (*Vaccinium corymbosum* L) var. *biloxi* producido en San Pedro Nexicho, Oaxaca, México.

## **MATERIALES Y MÉTODOS**

### **Etiología**

**Sitio de estudio y material vegetal.** En un cultivo comercial de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.) var. *biloxi*; ubicado en **San Pedro Nexicho**, Municipio de Santa Catarina Ixtepeji; Oaxaca (17°05'08"N, 96°31'36" O, a 2106 msnm), se recolectaron, en noviembre de 2016, 50 frutos de arándano con síntomas de necrosis y pudrición; éstos se guardaron en bolsas de papel y se transportaron al laboratorio de Fitopatología del CIIDIR unidad Oaxaca-IPN donde se realizó el aislamiento de los microorganismos asociados a la enfermedad.

**Aislamiento y purificación de hongos.** Dentro de una campana de flujo laminar, los frutos se lavaron con agua destilada estéril; se desinfectaron con hipoclorito de sodio a 1% durante 3 min; se enjuagaron tres veces consecutivas en agua destilada estéril y se secaron sobre toallas de papel estéril durante 20 min. De cada muestra se cortó una sección de 0.5 cm<sup>3</sup>; éstas se sembraron en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA)

(BD Bioxon® Becton Dickinson de México) con antibióticos (ampicilina 20 mg L<sup>-1</sup> y rifampicina 20 mg L<sup>-1</sup>) y se incubaron a 22±3°C con luz blanca durante 8 días. Las colonias desarrolladas se transfirieron, de manera individual, a PDA con antibióticos y se incubaron a 22±3°C con luz blanca durante 15 días; posteriormente se purificaron mediante la técnica de cultivo monospórico (Scruggs and Quezada-Ocampo, 2016) (Anexo A) y se preservaron en tubos con PDA cubiertos con aceite mineral estéril (Anexo B).

### **Pruebas de patogenicidad**

Las pruebas de patogenicidad se realizaron con una cepa con las características y estructuras fungosas semejantes a *Botrytis* sp. aislado de frutos sintomáticos cosechados en San Pedro Nexicho. La patogenicidad de la cepa experimental se verificó en frutos maduros de arándano cosechados de plantas de 2 años de edad. En el laboratorio, el incremento del inóculo primario (conidios) se realizó cultivando el hongo sobre medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (BD Bioxon® Becton Dickinson de México), a 23°C±, con luz natural durante 10 días.

Para realizar el experimento, se formaron dos lotes de 100 frutos de arándano cada uno. A los frutos de uno de los lotes se les provocó una herida de 0.5 mm de profundidad en la zona ecuatorial con la aguja de una jeringa de insulina. Los frutos del segundo lote permanecieron sin herida. Cada uno de los frutos experimentales fue inoculado con 10 µL de una solución conidial del hongo concentrada a 1×10<sup>3</sup> esporas mL<sup>-1</sup>, el inóculo se colocó en la zona ecuatorial de los frutos y se cubrió con un algodón humedecido con agua destilada estéril durante 48 h. De manera independiente, los frutos de cada lote se incubaron dentro de una charola de plástico durante 8 días con luz natural; los datos de temperatura y humedad relativa se registraron con un Data Logger HOBO® U12-011.

## Identificación de fitopatógenos

**Caracterización morfológica.** Una colonia monoconidial del hongo se cultivó en PDA a 23°C± por 10 días con luz natural. Las características culturales registradas fueron: color, textura y velocidad de crecimiento de la colonia. Se prepararon microcultivos (Anexo C) que se incubaron a 25°C por 7 días; en ellos se midieron 100 conidios y 100 conidióforos; estas estructuras se observaron en un microscopio compuesto modelo primo Strar marca Carl Zeiss equipado con una cámara modelo Axion Cam ICc1 marca Carl Zeiss; las mediciones se estimaron con el software Zen 2012. La identificación a nivel de género se realizó siguiendo las claves taxonómicas de Barnett y Hunter (2006), y para especie se utilizaron las descripciones especializadas de Ellis (1971) y Crous *et al.* (2009).

**Caracterización molecular.** En el Laboratorio de Fitopatología del CIIDIR Unidad Oaxaca del Instituto Politécnico Nacional se realizaron cultivos monospóricos de la cepa experimental. Para ello, la cepa se cultivó en PDA a 25 °C con luz natural por 10 días. La colonia fungosa pura se envió al Laboratorio de Diagnóstico Integral fitosanitario (LADIFIT) del Colegio de Postgraduados donde se realizó la caracterización molecular a partir de la amplificación de las regiones ITS1 e ITS2 de los genes ribosomales de acuerdo al protocolo del LADIFIT.

## Histopatología

**Sitio de estudio y material vegetal.** En el presente estudio se utilizó la cepa de *Botrytis* sp. cuya patogenicidad sobre frutos de arándano *var.* Biloxi ya se había confirmado previamente. Los frutos de arándano que se utilizaron en este experimento fueron de la *var.* Biloxi cosechados de plantas de 2 años de edad cultivadas en la localidad de San Pedro Nexicho (17°26´ N, 96°58´ O, a 2,150 msnm), municipio de Santa Catarina Ixtepeji, Oaxaca.

**Preparación del inóculo.** Para incrementar el inóculo (producción de esporas) del hongo experimental, éste se cultivó en medio de cultivo Papa Dextrosa Agar (PDA) (BD Bioxon® Becton Dickinson de México) con antibióticos (ampicilina 20 mg L<sup>-1</sup> y rifampicina 20 mg L<sup>-1</sup>) e incubó a 25°C con luz blanca durante 15 días. Posteriormente se realizó un barrido de esporas; éstas se colocaron en 10 mL de agua destilada estéril y se hicieron las diluciones correspondientes hasta tener una solución conidial a 1×10<sup>3</sup> esporas mL<sup>-1</sup> y se agregó polisorbato 20 (0.1%).

**Inoculación de frutos.** El proceso de patogénesis se documentó en frutos sanos de arándano *var.* Biloxi. En una charola de plástico estéril se colocó un lote de 100 frutos maduros y sanos a los que se les provocó una herida artificial de 1.0 mm de profundidad en la zona ecuatorial con la aguja de una jeringa de insulina estéril. En todos los frutos, sobre la zona con herida se depositaron 10 µL de la solución conidial a 1×10<sup>3</sup> esporas mL<sup>-1</sup> + polisorbato 20 (0.1%). La zona se cubrió con un algodón humedecido con agua destilada estéril durante 24 h; después de este tiempo el algodón se retiró.

**Toma de muestras.** Del lote experimental se tomaron, y se introdujeron en una solución fijadora FAA [formaldehído (35%), ácido acético glacial, etanol absoluto (70%) en una proporción de 2:1:1], 2 frutos cada 8 h durante 8 días. Los primeros frutos se tomaron inmediatamente después de la inoculación (hora cero) y consecutivamente se muestrearon a las 8, 16, 24, 32, 40, 48, 56, 64, 72, 80, 88, 96, 104, 112, 120, 128, 136, 144, 152, 160, 168, 176, 184 y 192 h. Los frutos muestreados se almacenaron en recipientes de plástico con capacidad de 25 mL conteniendo la solución fijadora FAA y se almacenaron a 4°C durante 5 días.

**Cortes histológicos.** Los frutos se retiraron de la solución fijadora FAA y se lavaron tres veces consecutivas con agua destilada. El proceso de deshidratación del tejido vegetal se hizo gradualmente con una serie ascendente de alcohol etílico a 50, 70, 96, 100% (4 h/alcohol) y alcohol absoluto (100%) (12 h a 4°C). El proceso de clarificación se realizó con etanol absoluto (100%) + xileno (2:1); etanol absoluto (100%) + xileno (1:1); etanol absoluto (100%) + xileno (1:2) (30 min/solución) y dos pasos por xileno (1 h/paso). El

proceso de infiltración se hizo con xileno + parafina (paraplast plus® SIGMA) (2:1); xileno + parafina (1:1); xileno + parafina (1:2) (30 min/paso a 42°C); luego las muestras se pasaron por parafina líquida (58°C) tres veces; el primer paso fue por 1 h; mientras que el segundo y tercer fue por 12 h cada uno. El tejido infiltrado se incluyó en parafina fundida (58°C) y se dejó solidificar por 48 h a 4°C. El tejido incluido se seccionó con un microtomo de desplazamiento manual marca Bright serie 8000 y se obtuvieron cortes de 10 µm de espesor; éstos se colocaron en un baño de flotación con 3.0 g de grenetina a 68°C por 30 seg y se montaron en portaobjetos.

La tinción celular se efectuó mediante la técnica de *tinción diferencial safranina O - verde rápido* bajo el siguiente protocolo: dos pasos por xileno (5 min/paso); la hidratación se efectuó en una serie gradual descendente de alcohol etílico a 100, 96, 70 y 50%. La primera tinción fue en una solución de safranina O [safranina O (1.5 g), etanol al 96% (150 mL) y agua destilada (150 mL)] por 10 min. El proceso de deshidratación fue con etanol (96%) acidificado con HCL por 30 s. Las muestras se lavaron en etanol (96%) + 4 gotas de hidróxido de amonio (para 100 mL) por un min y después en etanol (100%). La segunda tinción fue una solución de verde rápido [verde rápido (1.5 g), etanol absoluto (100%) (150 mL) y eugenol (150 mL)] por 2 min. El exceso de la solución verde rápido se eliminó con una solución a base de etanol absoluto (100%)-xileno (2:1:1); posteriormente, las muestras se lavaron con una solución clarificante (2-metoxietanol-etanol absoluto (100%)-xileno; 2:1:1). Los cortes histológicos se pasaron tres veces por xileno (3 min por paso) y se sellaron con bálsamo de Canadá. Las preparaciones se observaron en un microscopio compuesto marca Carl Zeiss.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Etiología

Descripción de síntomas. En condiciones de campo, la enfermedad se presentó en frutos maduros de aproximadamente 20 mm de diámetro producidos en plantas de arándano de 2 años de edad. Los síntomas en los frutos fueron: deshidratación y necrosis de áreas en la zona basal del fruto; progresivamente la necrosis avanzó hasta cubrirlo por completo (Figura 1A). El fruto tomó una consistencia corchosa en la parte interna, donde el epicarpo con células epidérmicas se encontraban deshidratadas y necrosadas al igual que el mesocarpo en color café; y en el endocarpo se pueden ver los lóculos en pudrición, mientras la parte sana empieza a colapsar y deshidratarse (Figura 1B).



Figura 1. Frutos de arándano necrosados. A) fruto de arándano maduro, con 20 mm de diámetro, necrosado en la parte basal. B) corte transversal del fruto, donde el epicarpo (ep) está deshidratado y necrosado al igual que el mesocarpo (me), mientras el endocarpo (ed) se aprecian los lóculos (L) necrosados con un estado de pudrición avanzada.

## Hongos aislados

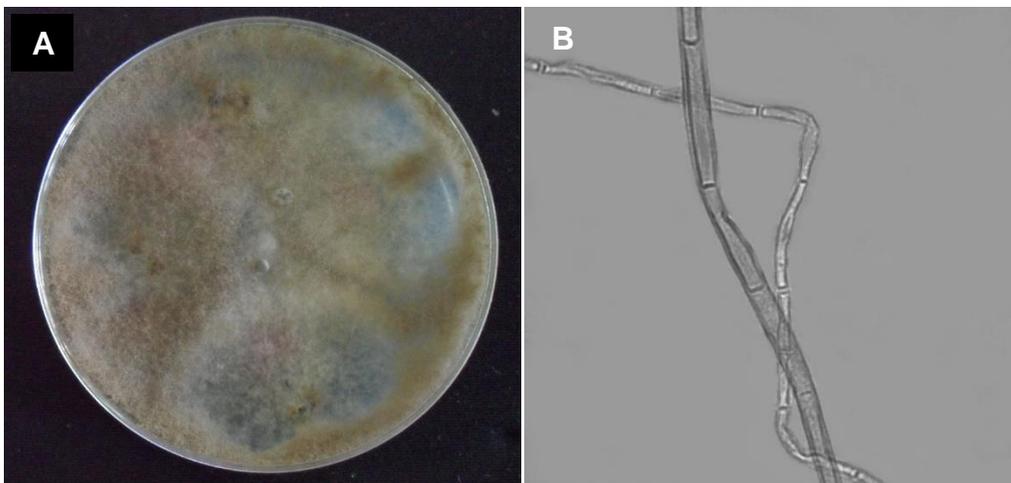
De los frutos con síntomas de necrosis y pudrición se obtuvieron en total 50 aislados fungosos, el 100% de ellos presentaron características culturales y estructuras fungosas correspondientes al género *Botrytis*.

## Pruebas de patogenicidad

A 8 días después de la inoculación (ddi), los frutos mostraron hundimiento del sitio inoculado; a los 10 días se desarrolló abundante micelio con producción de esporas. A los 12 días se observó deshidratación del fruto adquiriendo una consistencia arrugada. A partir de los frutos sintomáticos, se re-aisló a *Botrytis* sp.

## Identificación morfométrica y molecular

La colonia de *Botrytis* sp. presentó crecimiento micelial concéntrico, de consistencia afelpada y color café claro (Figura 2A). Después de 15 días, el micelio se tornó color café oscuro. Los aislados más viejos formaron una gran cantidad de esclerocios negros de forma irregular, con un diámetro de 1.5 a 2.5 mm. Conidióforos de color café, largos, originados irregularmente, septados, con pared lisa y en el ápice con racimos de conidios (Figuras 2B y 2C). Conidios amerosporas, ovoides, lisos, hialinos de 5.8 a 9.8 x 8.8 a 14.6  $\mu\text{m}$  largo/ancho (promedio 8.3 x 11.3  $\mu\text{m}$ ) (Figura 2D). Las características morfométricas coincidieron a las descritas por Ellis (1971) y Crous *et al.* (2009) para *Botrytis cinerea*. La caracterización molecular confirmó la especie del hongo.



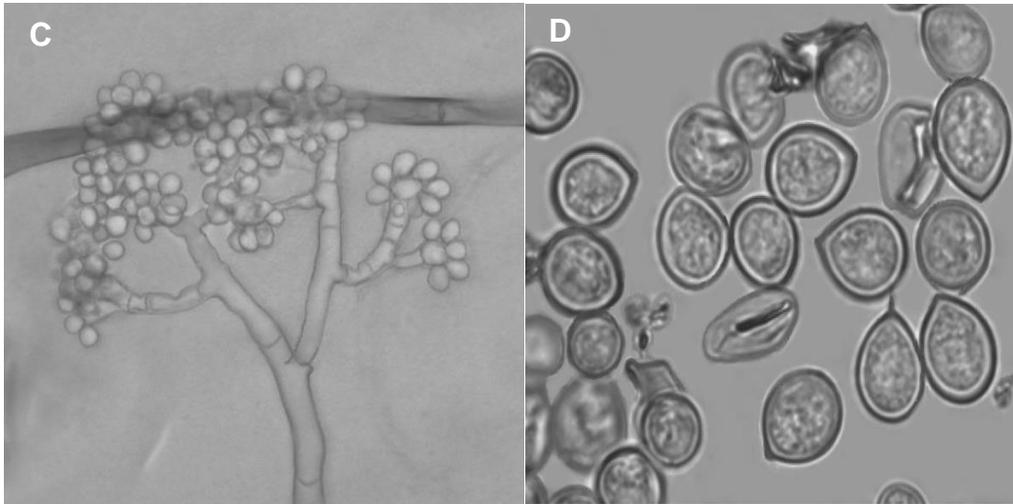


Fig.2. Caracteres de un aislado de *Botrytis cinerea* obtenido a partir de frutos de arándano con síntomas de pudrición y necrosis. A) Colonia de 10 días de edad cultivada en medio de cultivo PDA; B) conidióforo largo y septado; C) Ápice ramificado de un conidióforo con racimos de conidios; D) Conidios hialinos.

De acuerdo a los estudio etiológicos hechos en el patosistema arándano-*B. cinerea*, específicamente solo se han reportado de diferentes partes vegetales del arándano como flores, hojas, ramas tiernas y viejas, tallos viejos (Smith,1998; Vasquez *et al.* 2007), en donde mencionan características morfológicas que son propias del patógeno *Botrytis cinerea*, mas no en fruto. También está el estudio de Rivera *et al.* (2013) quienes señalan que es una enfermedad importante en cultivo de arándano, sobre todo en fruto sin embargo solo da a conocer su comportamiento del patógeno mas no sus características morfológicas y moleculares. Recientemente estudios hechos por Saito *et al.* (2014) menciona a dos especies hermanas de *Botrytis cinerea*, mismas que son encontradas en frutos de arándano, pero de acuerdo a los caracteres morfológicos no fueron capaz de diferenciar entre ambos grupos, pues ambos presentaban las sintomatologías iguales, sin embargo demostraron que dicho hongo si es patógeno. El estudio más relacionado a nuestra investigación fue el de Kwon *et al.* (2011) donde daban a conocer por primera vez a *Botrytis cinerea*, como patógeno en la poscosecha de frutos arándano variedad 'Northland' (*V. corymbosum*); en dicha investigación proporcionan la descripción detallada del hongo, basada en características morfológicas y datos moleculares; así

como la forma en que aparece la enfermedad en los frutos antes de ser cortados. Este último estudio con nuestra investigación presentan similitudes como: todas las características morfológicas y moleculares son de *Botrytis cinerea*; es el primer reporte de dicho hongo como patógeno del fruto de arándano variedad “Biloxi” (*V. corymbosum* L.), pertenecientes ambas a la misma familia a nivel nacional de México, pues no hay reportes con respecto a dicho patógeno.

### Histopatología

**Inoculación de frutos.** Los frutos con herida permanecieron asintomáticos hasta las 96 h; después de este tiempo, se observó hundimiento en la zona inoculada y fue hasta las 144 h cuando se observó crecimiento micelial de *B. cinerea* con abundante esporulación en esta zona. En la Figura 3A, se muestran los frutos de arándano inoculados con *B. cinerea* a las 192 h después de la inoculación, así como micelio de *B. cinerea* en el fruto Figura 3B.

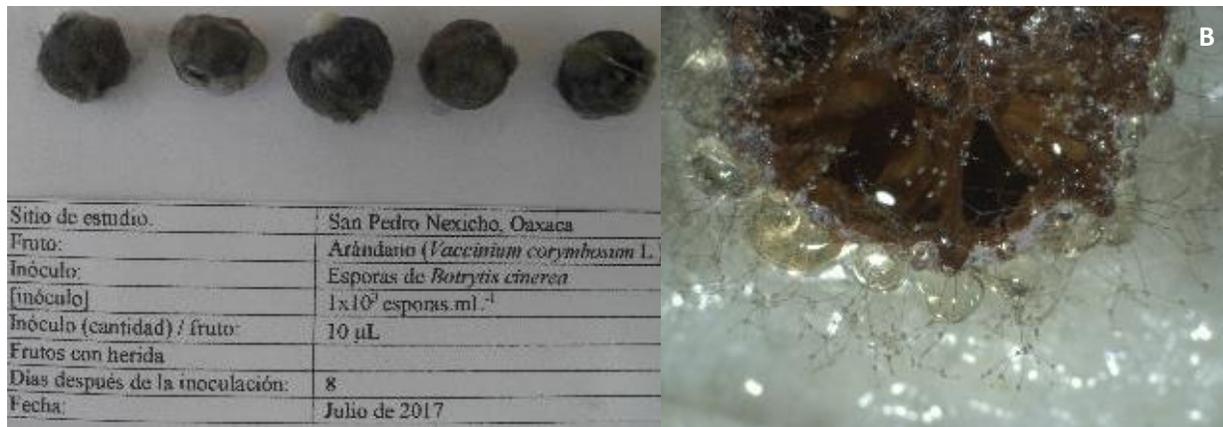


Figura 3. Frutos de arándano var. *biloxi* inoculados con *Botrytis cinerea*. A) Frutos cubiertos de micelio (mc) a las 192 h después de la inoculación. B) Corte transversal de un fruto de arándano con invasión micelial de *B. cinerea* (Bc) interior y exterior.

**Descripción de los cambios a nivel celular.** En los cortes histológicos de los frutos muestreados a la hora cero, se observó una delgada capa de cera, abajo se encontró una sola capa de células epidermales conteniendo polifenoles; en este caso las células conservaron su forma rectangular y no se observó daño en la pared celular (Figura 4A);

también hubo presencia de estomas. Debajo de la epidermis se encontraron una o dos capas de células de la hipodermis; estas células tendieron a ser de forma rectangular, de mayor tamaño que las células de la epidermis. Las células de la hipodermis se observaron con polifenoles pero sin daños en la pared celular (Figura 4A).

Posteriormente se observaron las células del parénquima que fueron de forma irregular con tendencia a ser circulares, permanecieron sin polifenoles, también sin daño de la pared celular (Figura 4A). En la zona de la hipodermis se notaron paquetes vasculares que conservaron su forma y sin cambios en la pared celular. En estos cortes no se observó penetración de micelio de *Botrytis cinerea* inter o intracelular.

En los cortes de los frutos muestreados a 4 días después de la inoculación ya no se observó la capa de cera y las células de la epidermis se observaron desorganizadas, es decir, las células ya no se mantuvieron unidas, sin embargo conservaron su forma rectangular y conservaron sus polifenoles. Entre las células de esta capa se observaron pequeños fragmentos de hifas de color café, con septos transversales semejantes a *B. cinerea*. Las células hipodermales y del parénquima se desorganizaron y perdieron su forma y se observaron polifenoles al interior; aunque en estas capas no se presentó evidencias de micelio. Quizá por esta lisis de las células es que el fruto se observa con marchitez (Figura 4B).

En los cortes de los frutos muestreados a 8 días después de la inoculación no se observó la capa de cera y las células de la epidermis se observaron desorganizadas y con lisis por lo que los polifenoles no se mantuvieron dentro. Las células hipodermales y del parénquima también se desorganizaron, hubo lisis y perdieron su forma, en todas estas células hubo presencia de polifenoles en el interior; además se hicieron presentes células esclereidas quizá como un mecanismo de defensa física contra el patógeno. Entre las células del parénquima se observaron fragmentos de micelio semejante a *B. cinerea*. Toda la desorganización, lisis y muerte de células de los diferentes estratos que conforman el cuerpo del fruto del arándano hacen que éste presente marchitez y finalmente pudrición.

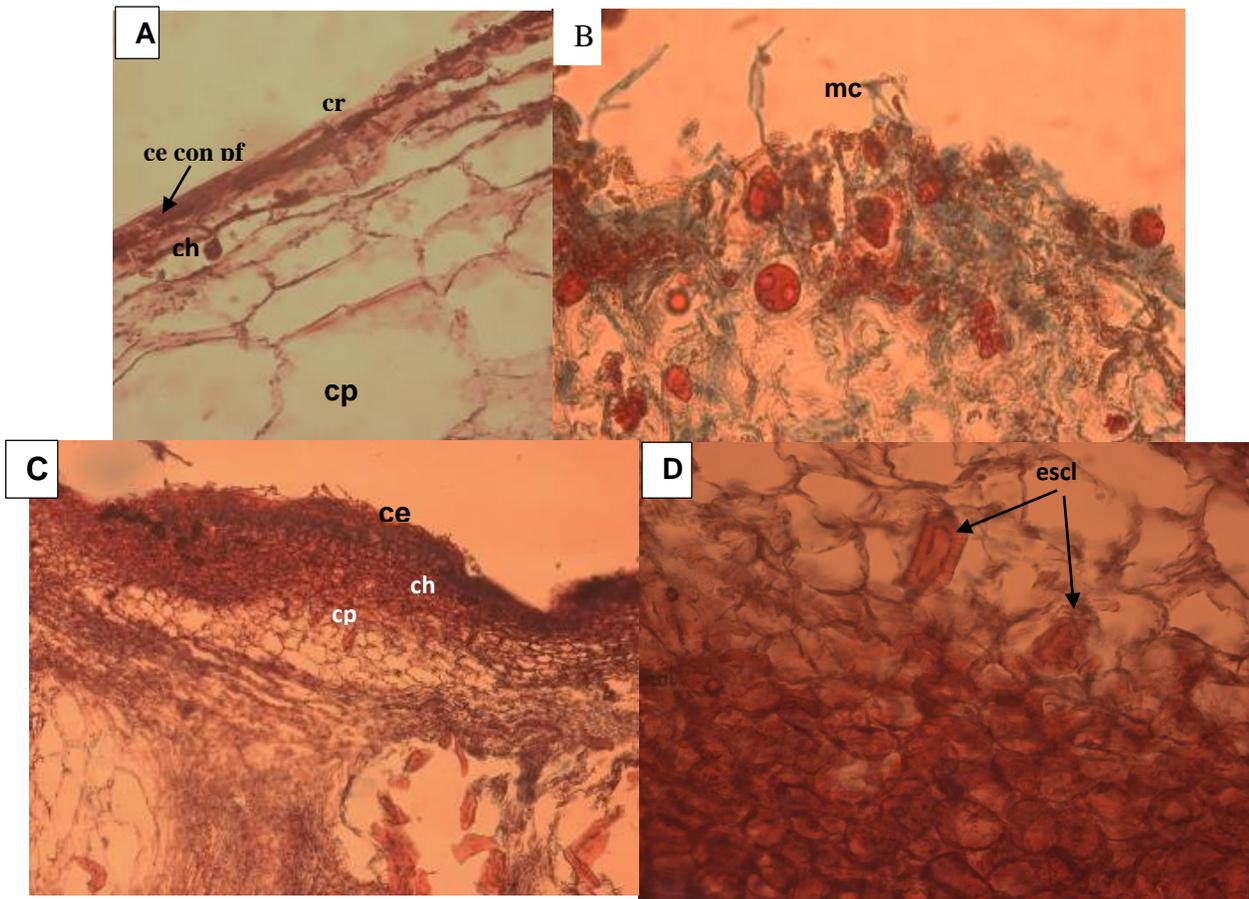


Figura 4. Cortes histológicos de frutos de arándano inoculados con *Botrytis cinerea*. A) Corte histológico longitudinal de un fruto de arándano a las cero horas después de la inoculación mostrando evidencias de una capa cerosa (cr) y células epidermales (ce) conteniendo polifenoles (pf); así como células de hipodermis (ch) y del parénquima (cp). Las células conservaron su organización y su forma. B) Corte de un fruto a las 96 h después de la inoculación; existe desorganización de las células en todos los estratos y se nota presencia e introducción de hifas al interior de las células (mc). C y D) Corte de un fruto a las 96 h después de la inoculación; se observó desorganización y lisis de las células en todos los estratos; además hubo presencia de células esclereidas (escl).

Existen una cantidad suficiente de información sobre el cultivo, uso, propiedades medicinales y patógenos que atacan a *Vaccinium corymbosum*. Particularmente, se han reportado una serie de enfermedades fungosas, bacterianas y virosas en el cultivo (Polashock *et al.*, 2009; Schilder *et al.*, 2011; Lui *et al.*, 2014; Norman and Bocsanczy, 2018) donde se describe la sintomatología inducida por los patógenos, pero no se documentan los cambios celulares que ellos provocan. Los estudios sobre el proceso de la patogénesis en el sistema arándano-*Botrytis cinerea* no se había documentado previamente; realmente son escasos los estudios que se han realizado en materia de histología del fruto; los trabajos referentes más recientes es el de La Rosa *et al.* (2017), quienes estudiaron la morfología interna e histología del fruto de arándano para entender la baja germinación de semillas y el de Konarska (2015) quien comparó la anatomía de frutos en tres estados de madurez de dos variedades de arándano (Earliblue y Patriot) para documentar esas diferencias morfológicas que dan al fruto atributos de calidad y duración en la vida de anaquel. En los dos trabajos citados, los autores evidencian la morfología y estructura celular interna de los frutos de arándano pero no evidencian cambios celulares por la actividad de organismos patógenos. En el presente proyecto se exhibió la estructura interna del fruto poniendo énfasis en los daños celulares, como son desorganización celular, lisis, presencia de polifenoles y esclereidas, como resultado del ataque de *Botrytis cinerea*, un patógeno capaz de inducir muerte en la planta completa de *V. corymbosum*.

## **CONCLUSIÓN**

Con base al estudio se puede concluir que *Botrytis cinerea* es el principal agente causal en la necrosis arándano que ocasionan daños importantes en la producción en San Pedro Nexicho, Oaxaca. A nivel nacional es el primer reporte de este patógeno en el arándano (*Vaccinium corymbosum* L), var. biloxi, ya que no hay ningún reporte respecto a la necrosis del fruto en el país, solo se ha reportado a nivel internacional.

En el estudio histopatológico se pudo apreciar si hay daños a nivel celular en el fruto de arándano (*V. corymbosum*), como resultado de la invasión y ataque de *Botrytis cinerea*, siendo también el primer estudio donde se presentan cambios celulares por la actividad del organismo patógeno estudiado.

## BIBLIOGRAFÍA

- Adaskaveg, J. E., Förster, H., and Thompson, D. F. (2000). Identification and etiology of visible quiescent infections of *Monilinia fructicola* and *Botrytis cinerea* in sweet cherry fruit. *Plant Disease*, 84(3), 328-333. DOI.org/10.1094/PDIS.2000.84.3.328
- American Phytopathological Society (APS). (2018).  
<http://www.apsnet.org/publications/commonnames/Pages/Blueberry.aspx>
- Barnett, H. L., and Hunter, B. B. (2006). Illustrated genera of imperfect fungi. Fourth edition. Burgess publishing company. New York, USA. 241 p.
- Crous, P. W., Verkley, G. J. M., Groenewald, J. Z., and Samson, R. A. (2009). Fungal Biodiversity. CBS-KNAW. Utrecht, The Netherlands. 269 p.
- Díaz- Montenegro, D.H. (2002). Fisiología de árboles frutales. AGT Editor. México, D. F. 390 p.
- Elad Y., Vivier M., Fillinger S. (2016) *Botrytis*, the Good, the Bad and the Ugly. In: Fillinger S., Elad Y. (eds) *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems*. Springer, Cham. DOI [https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0\\_1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_1)
- Ellis, M. B. (1971). *Dematiaceous Hyphomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, United Kingdom. 608 p.
- FAOSTAT (2016). Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura <http://www.fao.org/faostat/es/#data>
- Figueroa S. D., Guerrero C. J., Bensch T. E. (2010). Efecto de momento de cosecha y permanencia en huerto sobre la incidencia de hongos de poscosecha en arándano alto (*Vaccinium corymbosum* L.), cvs. Berkeley, Brigitta y Elliott durante la temporada 2005-2006. IDESIA (Chile) 28,2:9-19. Recuperado en <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=4196879>

- Konarska, A. (2015). Development of fruit quality traits and comparison of the fruit structure of two *Vaccinium corymbosum* (L.) cultivars. *Scientia Horticulturae*, 194, 79-90. DOI.org/10.1016/j.scienta.2015.08.007 0304-4238/
- Kong, C.S., Qiu, X.L., Yi, K.S y Yu, X.F. (2010). First Report of *Neofusicoccum vitifusiforme* causing Blueberry Blight of blueberry in China. *The American Phytopathological Society*, 94(11), 1373. DOI: 10.1094/PDIS-05-10-0393
- La Rosa, R., Sánchez, M., and Pérez, E. (2017). Internal morphology and histology of blueberry *Vaccinium corymbosum* L. (*Ericaceae*) in Lima, Perú. *Agronomía Colombiana*, 35(2) ,176-181. Doi: 10.15446/agron.colomb.v35n2.63146
- Mondragón Flores, A., López Medina, J., Ochoa Ascencio, S., y Gutiérrez Contreras, M. (2012). Hongos Asociados a la Parte Aérea del Arándano en Los Reyes, Michoacán, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 30,141-144. Recuperado en [http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci\\_arttext&pid=S018533092012000200004&lng=es&nrm=iso](http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S018533092012000200004&lng=es&nrm=iso)>
- Polashock, J.J., Oudemans, P.V., Caruso, F.L., Mcmanus, P., and Crouch, J. (2009). Population structure of the North American cranberry fruit rot complex. *Plant Pathology*. 58: 1116–1127
- Rivera, S. A., Zoffoli, J. P., and Latorre, B. A. (2013). Infection risk and critical period for the postharvest control of gray mold (*Botrytis cinerea*) on blueberry in Chile. *Plant Disease*, 97, 1069-1074. DOI.org/10.1094/PDIS-12-12-1112-RE
- Saito, S., Michailides, T. J., and Xia, C. L. (2014). First report of *Botrytis pseudocinerea* causing gray mold on blueberry in North America. *Disease Notes*, 98(12), 1743. DOI.org/10.1094/PDIS-06-14-0573-PDN
- San Martín, J. (2013). Situación varietal en arándano. Eds. Undurraga, P. y Vargas, S. Manual del arándano. Boletín INIA N° 263. 120 p. Instituto de Investigaciones Agropecuarias INIA, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Chillán, Chile.

Scruggs, A.C., and Quesada Ocampo, L. M. 2016. Cultural, chemical, and alternative control strategies for *Rhizopus* soft rot of sweetpotato. *Plant Disease*, 100,1532-1540

Servicio de información y Estadística Agroalimentaria y Pesca. (2016). SIAP. México.

Servicio de información y Estadística Agroalimentaria y Pesca. (2014). SIAP. México.

Smith, B. J. (1998). *Botrytis* blossom blight of southern blueberries: Cultivar susceptibility and effect of chemical treatments. *Plant Disease*, 82(8), 924-927. <https://doi.org/10.1094/PDIS.1998.82.8.924>

Vasquez, P., Baldomá, J. A., Wright, E. R., Pérez, A., and Divo de Sesar, M. (2007). First report of blueberry *Botrytis* blight in Buenos Aires, entre Ríos, and Córdoba Argentina. *Disease Notes*, 91(5), 639. <https://doi.org/10.1094/PDIS-91-5-0639C>

Woodward, J. E., Brenneman, T. B., Kemerait, Jr, R. C., and Culbreath, A.K. (2005). First Report of *Botrytis Blight* of Peanut Caused by *Botrytis cinerea* in Georgia. *Plant Disease*, 89(8), 910.3. <http://dx.doi.org/10.1094/PD-89-0910C>

### CAPÍTULO 3. EFECTIVIDAD BIOLÓGICA DE ACEITES ESENCIALES EN EL CRECIMIENTO *IN VITRO* DE *Botrytis cinerea*, PATÓGENO DE FRUTOS DE ARÁNDANO EN OAXACA

#### RESUMEN

En San Pedro Nexicho, Oaxaca, la incidencia de la pudrición de frutos de arándano (*Vaccinium corymbosum* L.), inducida por *Botrytis cinerea*, se ha incrementado considerablemente. En este estudio, se evaluó la efectividad biológica de 5 dosis (100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de los aceites esenciales de orégano (*Origanum vulgare*); romero (*Rosmarinus officinalis*); pirul (*Schinus molle*); aguacatillo (*Persea americana*); eucalipto (*Eucalyptus*); tomillo (*Thymus vulgaris*); poleo (*Clinopodium macrostemum*); té limón (*Cymbopogon citratus*); bejuco de ajo (*Pseudocalymma alliaceum*) y de clavo (*Syzygium aromaticum*), sobre el desarrollo *in vitro* de *B. cinerea*. En el año 2017 se preparó medio de cultivo papa-dextrosa-agar (2%), mezclado con aceite esencial y polisorbato 20 (0.1%), se sembró individualmente, un disco micelial ( $\varnothing = 0.4$  cm) de la cepa de *B. cinerea*. La efectividad biológica, se estimó a los 10 días mediante el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo. El aceite esencial de bejuco de ajo inhibió el desarrollo micelial de *B. cinerea* en un 100% en todas las dosis; el aceite de clavo a partir de una dosis de 200  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ . El aceite de té limón y poleo inhibieron el crecimiento del hongo en 73% a partir de una dosis de 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ; el aceite de tomillo desde 400  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  inhibió en 66% el crecimiento micelial. En este estudio se evidenció la efectividad biológica antifúngica de los aceites esenciales del bejuco de ajo y clavo en las diferentes dosis sobre *B. cinerea*, inhibiendo el crecimiento y desarrollo del patógeno.

**Palabras clave:** *Botrytis cinerea*; *Clinopodium macrostemum*; *Cymbopogon citratus*; *Pseudocalymma alliaceum*; *Syzygium aromaticum*; *Thymus vulgaris*; *Vaccinium corymbosum*.

### CHAPTER 3: BIOLOGICAL EFFECTIVENESS OF ESSENTIAL OILS ON THE *IN VITRO* GROWTH OF *Botrytis cinerea*, PATHOGEN OF BLUEBERRY FRUITS IN OAXACA.

#### ABSTRACT

In San Pedro Nexicho, Oaxaca, the incidence of the rotting process of blueberry fruits (*Vaccinium corymbosum* L.), induced by *Botrytis cinerea*, has increased considerably. In this study, the biological effectiveness of 5 doses (100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ) of the essential oils was evaluated, extracted from: oregano (*Origanum vulgare*); Rosemary (*Rosmarinus officinalis*); Peppertree (*Schinus molle*); avocado (*Persea americana*); eucalyptus (*Eucalyptus*); thyme (*Thymus vulgaris*); Poleo (*Clinopodium macrostemum*); lemongrass (*Cymbopogon citratus*); garlic vine (*Pseudocalymma alliaceum*) and clove (*Syzygium aromaticum*), on the *in vitro* growth of *B. cinerea*. In 2017, potato-dextrose-agar (2%) culture medium was prepared, mixed with essential oil and polysorbate 20 (0.1%), a mycelial disk ( $\text{Ø} = 0.4$  cm) of the *B. cinerea* strain was individually grown. The biological effectiveness was estimated after 10 days by measuring the percentage of inhibition of mycelial growth of the fungus. The essential oil of garlic vine inhibited the mycelial growth of *B. cinerea* by 100% in all the doses; the clove oil as of a dose of 200  $\mu\text{L.L}^{-1}$ . The Lemongrass and Poleo oils inhibited the fungus growth by 73% as of a dose of 500  $\mu\text{L.L}^{-1}$ . The thyme oil as of a dose of 400  $\mu\text{L.L}^{-1}$  inhibited the mycelial growth by 66%. In this study, the biological antifungal effectiveness of the essential oils of the garlic vine and the clove was proven on the different doses on the *B. cinerea*, inhibiting the growth and development of the pathogen.

**Key words:** *Vaccinium corymbosum*; *Botrytis cinerea*; *Pseudocalymma alliaceum*; *Syzygium aromaticum*; *Cymbopogon citratus*; *Clinopodium macrostemum* and *Thymus vulgaris*.

## INTRODUCCION

Los aceites esenciales (AE) son mezclas de moléculas orgánicas volátiles sintetizadas como metabolitos secundarios; estos se componen de alcoholes, acetonas, cetonas, éteres, aldehídos, taninos, esteroides, terpenoides, fenoles, etc., se producen y almacenan en los canales secretores de las plantas (Bruneton, 2001). Los AE se pueden obtener de aproximadamente 50 familias de plantas, destacando la familia *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Brassicaceae*, *Lauraceae*, *Myrtaceae* y *Labiatae* (Celis *et al.*, 2009; Soyly *et al.*, 2010).

Los AE tienen uso potencial en la industria cosmética, farmacéutica, alimenticia (Bakkali *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2010) y agrícola; en esta última, los AE han demostrado propiedad nematocida, insecticida y fungicidas (Macedo *et al.*, 2010; Granados-Echegoyen *et al.*, 2014; Aguilar-González *et al.*, 2015). Al respecto, podemos citar la actividad antifúngica del extracto de *Pseudocalymma alliaceum* en agua, metanol, cloroformo y éter de petróleo contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botryodiplodia theobromae* en el cultivo de mango (Aswini *et al.*, 2009). El aceite esencial de *Syzygium aromaticum* ha mostrado capacidad para inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* en fresa (Aguilar-González *et al.*, 2015); mientras que el aceite de *Clinopodium macrostemum* ha mostrado efectividad para inhibir el crecimiento de *Aspergillus niger* y *Fusarium oxysporum* en el cultivo de jitomate (Villa-Ruano *et al.*, 2015). La actividad antifúngica del AE de *Thymus vulgaris* se atribuye a compuestos específicos como el timol, p-cimeno, carvacrol y  $\gamma$ -terpipeno; los cuales inhiben el crecimiento de *Fusarium oxysporum* (Shyamapada-Mandal and Manisha-DebMandal, 2016).

Estudios previos han demostrado la susceptibilidad de *B. cinérea* a diversos AE; entre ellos *Cymbopogon martini*, *Thymus zygis*, *Cinnamomum zeylanicum* y *Eugenia caryophyllata*; los cuales mostraron actividad esporicida sobre el hongo (Wilson *et al.*, 1997); *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus citriodora*, *Eupatorium cannabinum* (Tripathi *et al.*, 2008); *Syzygium aromaticum* y *Brassica negra*, inhibieron completamente el crecimiento de *B. cinérea* (Aguilar-González *et al.*, 2015). En este contexto, el objetivo de esta investigación fue determinar la efectividad biológica de 5 dosis (100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ) de los aceites esenciales de 10 especies vegetales para inhibir el crecimiento *in vitro* de *B. cinérea*, agente causal de la pudrición de frutos de arándanos en San Pedro Nexicho, Oaxaca.

## MATERIALES Y MÉTODOS

**Aceites esenciales.** Los AE se obtuvieron de las hojas de orégano (*Origanum vulgare*); romero (*Rosmarinus officinalis*); pirul (*Schinus molle*); aguacatillo (*Persea americana*); eucalipto (*Eucalyptus*); tomillo (*Thymus vulgaris*); poleo (*Clinopodium macrosternum*); té limón (*Cymbopogon citratus*); bejuco de ajo (*Pseudocalymma alliaceum*) y de los frutos de clavo (*Syzygium aromaticum*); todos ellos recolectados durante 2017 en diferentes partes del estado de Oaxaca. El material vegetal se secó a la sombra durante 20 días y posteriormente se pulverizó en un molino mecánico.

La extracción de los AE se hizo mediante la técnica de hidrodestilación asistida por microondas. En un aparato de tipo Clevenger (MODELO Y ORIGEN) se colocaron 500 g de material vegetal pulverizado durante 3 h agregándole agua y después se sometió a calor, para lo cual se utilizó un horno de microondas con una salida de frecuencia de 2450 MHz, en ciclos de 15 min. La capa de AE se separó de la fase acuosa usando un embudo de decantación y el aceite esencial resultante se secó usando sulfato de sodio anhidro ( $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ). Los AE se preservaron en frascos de color ámbar refrigerados a 4 °C.

**Preparación del inóculo.** En este estudio se utilizó un aislado puro de *B. cinerea* con capacidad patogénica en frutos de arándano. El hongo se cultivó sobre medio de cultivo PDA (2%) durante 8 días a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  y luz natural.

**Bioensayos.** En esta fase experimental, se evaluaron las siguientes dosis de cada uno de los 10 AE experimentales: 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  de PDA. Se preparó medio de cultivo PDA (2%) y cuando alcanzó una temperatura de  $30^\circ\text{C}$  se le agregó la dosis correspondiente del aceite y se le adicionó polisorbato 20 a razón de 0.1%. El tratamiento testigo fue PDA + polisorbato 20 sin AE. El medio de cultivo se vació en cajas de Petri de 8.0 cm de diámetro y se dejó solidificar durante 24 h. Posteriormente, en cada caja se sembró un disco micelial ( $\varnothing = 0.4$  cm) de la cepa de *B. cinerea*. Las cajas se incubaron a  $25\pm 1^\circ\text{C}$  y luz natural hasta finalizar el experimento. Se establecieron 60 tratamientos, resultantes de la interacción de 6 dosis (0,

100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ) y 10 aceites esenciales; cada tratamiento tuvo 5 repeticiones (Cuadro 1).

La efectividad biológica de los tratamientos se determinó a través del parámetro de porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo de acuerdo a la siguiente ecuación:

$$ICM = \left[ \frac{CMT - CMA}{CMT} \right] \times 100$$

Donde: ICM: Porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo; CMT: Crecimiento radial del micelio (cm) del hongo en el tratamiento testigo; CMA: Crecimiento radial del micelio (cm) del hongo en el tratamiento con aceite esencial

De acuerdo al porcentaje de inhibición del crecimiento micelial del hongo en cada tratamiento, éstos se agruparon en una escala de porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio de *B. cinerea*, construida de 6 niveles; donde nivel 1 = [100-80] % de inhibición (PI); nivel 2 = (80-60] % de PI; nivel 3 = (60-40] % de PI; nivel 4 = (40-20] % de PI; nivel 5 = (20-10] % de PI; nivel 6 < 10 % de PI (Figura 2 y Cuadro 1)

**Análisis estadístico.** Los bioensayos se establecieron bajo un diseño completamente aleatorizado con arreglo factorial (6×10, dosis-aceites), utilizando como unidad experimental el cultivo de caja Petri; el ICM se transformó a  $\text{Log}(x)$  para el cumplimiento de los supuestos del análisis de varianza. Se realizó análisis de varianza y comparación de medias (Tukey, 0.05) usando el programa SAS System v.9.4 (SAS Institute Inc, 2016).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Bioensayos de efectividad biológica. Los aceites y dosis evaluados mostraron alta significancia ( $p < 0.01$ ) en los datos transformados (valores de F: 78.6 y 200.7, respectivamente), al igual que la interacción aceite x dosis ( $F = 5.6$ ). Por otro lado, se destaca el aceite esencial de bejuco de ajo (A10) que mostró la media mayor inhibición (83.72 %), seguido del clavo (69.38%), quienes mostraron la mayor heterogeneidad (Figura 1A). La mejor dosis fue la de 500  $\mu\text{L}$  para el experimento y la menor efecto fue la de 100  $\mu\text{L}$  en la media del porcentaje de 22.63% (Figura 1B).

El AE de bejuco de ajo (*Pseudocalymma alliaceum*) a partir de una dosis de 100  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  inhibió en 100% el crecimiento micelial de *B. cinerea* (Figuras 2A y 4). Mientras que el aceite de clavo (*Syzygium aromaticum*) lo hizo a partir de una dosis de 200  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$  (Figuras 2A y 5).

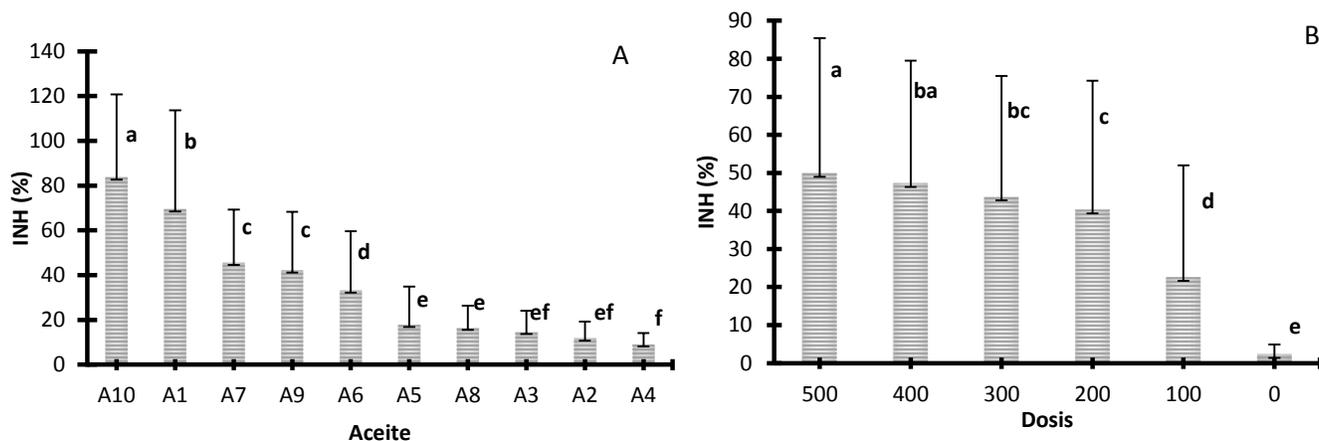


Figura 1. Porcentaje de inhibición (INH) de aceites esenciales (A) y dosis (B). Medias con la misma letra no tienen diferencia estadística significativa (Tukey,  $\alpha = 0.05$ ). Las líneas verticales sobre las barras indican la desviación estándar. Ajo (A10), clavo (A1), tomillo (A7); poleo (A9); té limón (A6), orégano (A5), aguacatillo (A8), pirul (A3), eucalipto (A2), romero (A4).

Por otro lado también se puede apreciar de manera representativa a los 10 aceites y el testigo como van inhibiendo de manera gradual a *botrytis cinerea* a los 10 días de crecimiento en la dosis de 500  $\mu\text{L}$  (Figura 3).

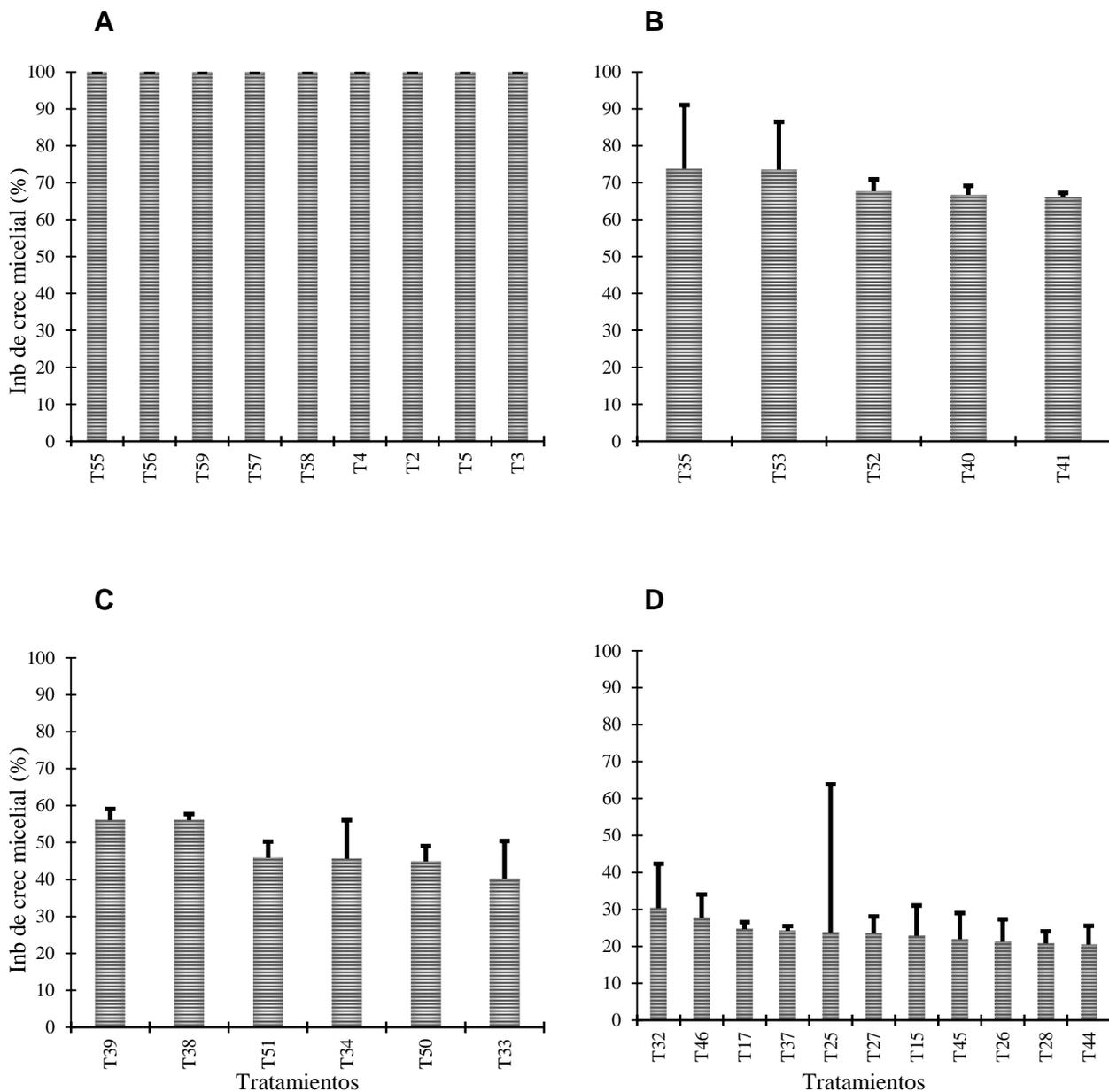
**Cuadro 1.** Inhibición del crecimiento radial del micelio de *Botrytis cinerea*.

<b>Aceite</b>	<b>Dosis</b>	<b>Tratamiento</b>	<b>Aceite</b>	<b>Dosis</b>	<b>Tratamiento</b>
Bejuco	100±0	T56	Aguacatillo	200±5.07	T45
Bejuco	200±0	T57	Eucalipto	500±8.96	T12
Bejuco	500±0	T60	Pirul	400±1.02	T17
Bejuco	300±0	T57	Poleo	100±6.39	T50
Bejuco	400±0	T59	Aguacatillo	500±4.46	T48
Clavo	400±0	T5	Eucalipto	400±3.12	T11
Clavo	200±0	T3	Romero	500±4.90	T24
Clavo	500±0	T6	Orégano	100±40.09	T26
Clavo	300±0	T4	Clavo	100±9.14	T2
Te limón	500±17.35	T36	Eucalipto	200±5.62	T9
Poleo	500±12.97	T54	Pirul	200±4.08	T15
Poleo	400±3.24	T53	Eucalipto	300±5.21	T10
Tomillo	400±2.40	T41	Romero	100±2.40	T20
Tomillo	500±1.25	T42	Aguacatillo	100±3.17	T44
Tomillo	300±3.09	T40	Eucalipto	100±3.31	T8
Tomillo	200±1.71	T39	Romero	300±1.92	T22
Poleo	300±4.40	T52	Romero	400±1.76	T23
Té limón	400±10.49	T35	Pirul	100±4.71	T14
Poleo	200±4.16	T51	Romero	200±3.60	T21
Té limón	300±10.19	T34	te limón	100±6.46	T32
Té limón	200±12.12	T33	Tomillo	0±3.04	T37
Aguacatillo	400±6.34	T47	Poleo	0±2.10	T49
Pirul	500±1.89	T18	te limón	0±3.04	T31
Tomillo	100±1.27	T38	Orégano	0±2.68	T25
Orégano	500±2.07	T30	Romero	0±2.56	T19
Orégano	400±3.32	T29	Clavo	0±2.19	T1
Pirul	300±8.21	T16	Bejuco	0±2.97	T55
Aguacatillo	300±7.12	T46	Aguacatillo	0±3.04	T43
Orégano	300±4.58	T28	Eucalipto	0±1.25	T7
Orégano	200±6.12	T27	Pirul	0±2.10	T13

Los valores incluyen ± la desviación estándar.

El té limón, a partir de una dosis de 500  $\mu\text{L.L}^{-1}$ , inhibió en 73.7% el crecimiento micelial del hongo (Figuras 2B y 6); El poleo fue de 67.7% a partir de 400  $\mu\text{L.L}^{-1}$  (Cuadro1, Figuras 2B y 7). El aceite de tomillo fue el tercero en inhibir un 56% de crecimiento micelial (Figura 1A) con una dosis de 200  $\mu\text{L.L}^{-1}$ (Figuras 2C y 8); mientras que para en las dosis menores el porcentaje de inhibición fue menor a 46% (Cuadro 1, Figuras 2C y D).

Los porcentajes menores de inhibición se presentaron en: aceite de aguacatillo (400  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ), pirul (500  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ), orégano (100  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ), eucalipto (500  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ) y romero (300  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ) fue de 27.7, 24.7, 23.7, 19.5 y 15.8%; respectivamente (Cuadro 1, Figuras 2E y F).



Continuación de figuras.....

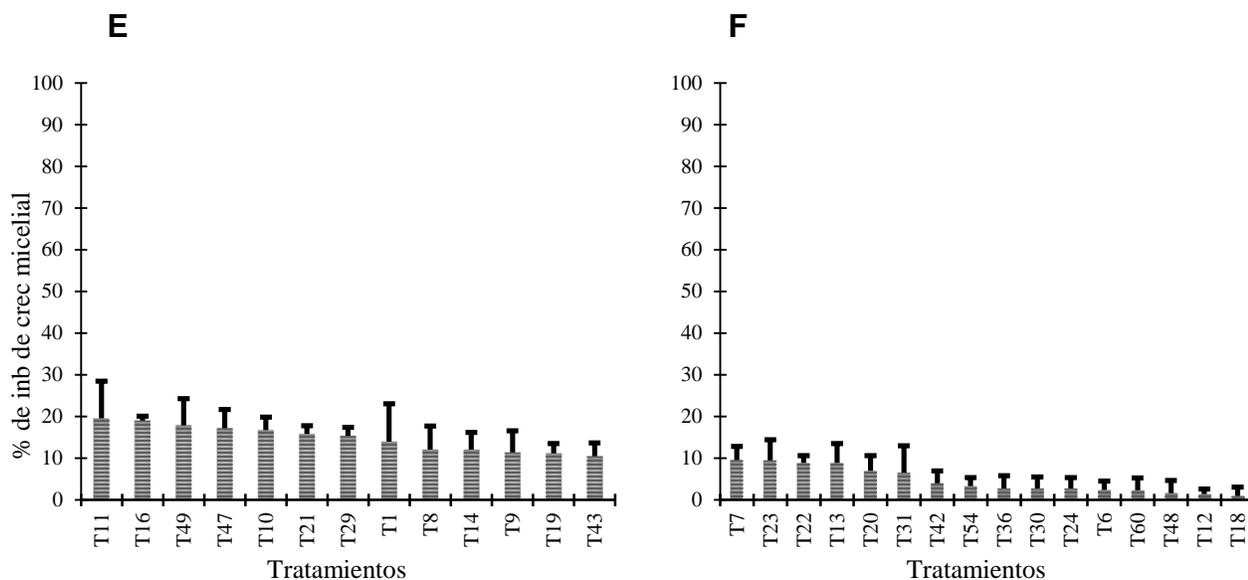


Fig. 2 Efectividad biológica de seis dosis (0, 100, 200, 300, 400 y 500  $\mu\text{L.L}^{-1}$ ) de los aceites esenciales de 10 especies vegetales sobre el crecimiento *in vitro* de *Botrytis cinérea*, agrupados de acuerdo a la “escala de porcentaje de inhibición del crecimiento radial del micelio de *B. cinerea*”. A) nivel 1 = 100-80 %; B) nivel 2 = 79.9-60 %; C) nivel 3 = 59.9-40; D) nivel 4 = 39.9-20 %; E) nivel 5 = 19.9-10 %; F) nivel 6 = 9.9-0%.



Figura 3. *Botrytis cinerea* / aceite esencial de: A) testigo; B) orégano; C) romero; D) pirul; E) aguacatillo; F) eucalipto; G) tomillo; H) poleo; I) te limón; J) clavo; K) bejuco de ajo. Dosis de 500  $\mu\text{L.L}^{-1}$  Dds: 10 días

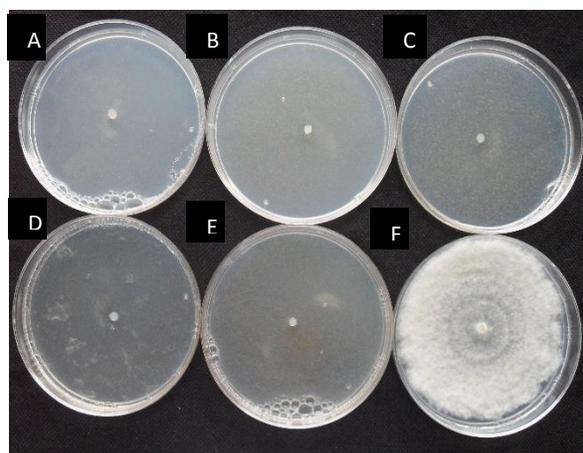


Figura 4. *Botrytis cinerea* / aceite esencial de bejuco de ajo (*Pseudocalymma alliaceum*). Dosis ( $\mu\text{L. L}^{-1}$ ): A) 100, B) 200, C) 300, D) 400, E) 500, F) testigo. Dds. 10 días

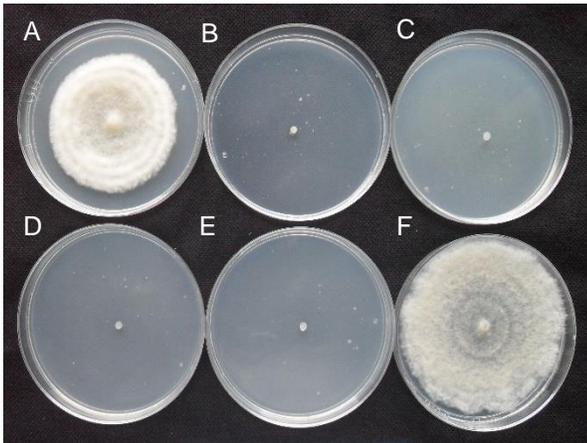


Figura 5. *Botrytis cinerea* / aceite esencial de clavo (*Syzygium aromaticum*). Dosis ( $\mu\text{L. L}^{-1}$ ): A) 100, B) 200, C) 300, D) 400, E) 500, F) testigo. Dds. 10 días.

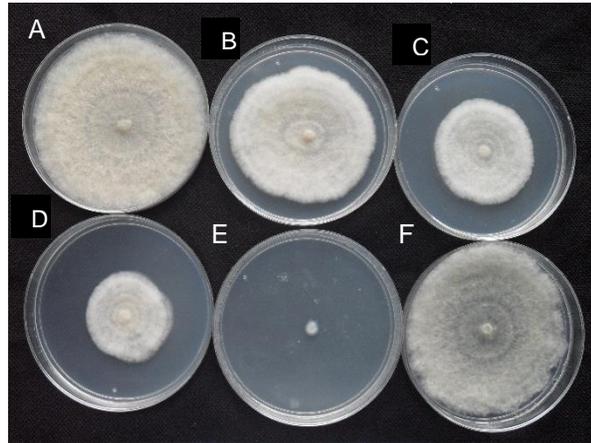


Figura 6. *Botrytis cinerea* / aceite esencial de te limón (*Cymbopogon citratus*). Dosis ( $\mu\text{L. L}^{-1}$ ): A) 100, B) 200, C) 300, D) 400, E) 500, F) testigo. Dds. 10 días.

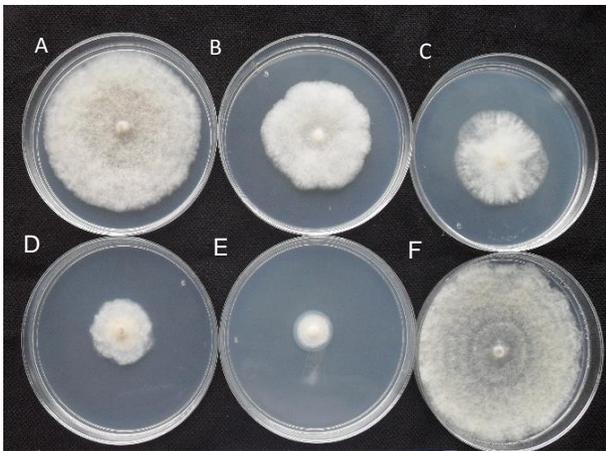


Figura 7. *Botrytis cinerea* / aceite esencial de poleo (*Clinopodium macrostemum*). Dosis ( $\mu\text{L. L}^{-1}$ ): A) 100, B) 200, C) 300, D) 400, E) 500, F) testigo. Dds. 10 días.



Figura 8. *Botrytis cinerea* / aceite esencial de tomillo (*Thymus vulgaris*). Dosis ( $\mu\text{L. L}^{-1}$ ): A) 100, B) 200, C) 300, D) 400, E) 500, F) testigo. Dds. 10 días.

El bejuco de ajo (*Adenocalymma alliaceum* o *Pseudocalymma alliaceum*) es una planta de la que poco se ha documentado sobre su actividad antifúngica. En un estudio previo, se demostró que el extracto de esta planta en agua, metanol, cloroformo y éter de petróleo tiene actividad esporicida en cepas de *Colletotrichum gloeosporioides* aislados del cultivo de mango (Aswini *et al.*, 2009). Así mismo, Granados-Echegoyen *et al.* (2015) reportaron que el aceite esencial también posee propiedad larvicida en poblaciones del mosquito *Culex quinquefasciatus*.

En este mismo estudio se hizo la caracterización química de *Pseudocalymma alliaceum* indicando que sus componentes principales son disulfuro de dialilo, sulfito de dialilo y Trisulfuro, di-2-propenilo. Nuestros resultados mostraron que el aceite esencial del bejuco de ajo también tiene excelente propiedad fungicida *in vitro* y que puede ser considerada como una alternativa con potencial para el manejo de fitopatógenos.

Por otro lado, el AE del clavo ha mostrado efectividad contra *Alternaria alternata*, *Aspergillus flavus*, *Curvularia lunata* y *Fusarium oxysporum*; esta acción se atribuye a dos de sus componentes, el eugenol y el geraniol (Kishore *et al.*, 2007). Aguilar-González *et al.* (2015) señalaron que el AE del clavo tiene efecto inhibitorio en el crecimiento de *Botrytis cinerea* e indicaron que se debe principalmente a la acción del eugenol que se encuentra hasta en 75,4% en el AE. Tanzeela Nisar *et al.* (2017) consignaron que el aceite de clavo tiene potencial para incorporarse a la pectina de cítricos y generar películas o recubrimientos comestibles antimicrobianos para diversas aplicaciones alimentarias. En este contexto, y de acuerdo a nuestros resultados, podemos indicar que el eugenol también tiene propiedad fungicida sobre cepas de *B. cinerea* aislado de frutos de arándano.

Diferentes extractos de té limón han mostrado excelentes propiedades antimicrobianas dado por los componentes químicos como son taninos, esteroides, terpenoides, fenoles, cetonas, flavonoides, entre otros (Lawal *et al.*, 2017). En otro estudio Ajayi *et al.* (2016b) señalan que en la composición química del AE sobresalen compuestos químicos más específicos antifúngicos como el Citral seguido de 2-isopropenil-5-metilhex-4-enal, p-cimeno y 2-thujene. Sin embargo, en nuestro estudio encontramos que este AE tuvo una efectividad biológica contra *B. cinerea* al 70% en la dosis de mayor y menor en un 50% cuando se aplicaron hasta 400  $\mu\text{L}\cdot\text{L}^{-1}$ ; lo cual indica que podría ser una alternativa más para seguir aplicando en otros patógenos para ver su efectividad, ya que no todos los fitopatógenos reaccionan igual.

En términos generales, observamos que el AE de poleo y tomillo son dos compuestos con alto potencial para el manejo de *B. cinerea*. El primero de ellos contiene compuestos con efecto antimicrobiano, tal es el caso de los monoterpenos oxigenados de tipo metano como la mentonona (34%) y el óxido de piperitona (30%), los cuales inhiben a *Clavibacter michiganensis*, *Pseudomonas syringae* y *Fusarium oxysporum* (Villa-Ruano *et al.*, 2015; Dunkić *et al.*, 2017). Mientras que el segundo, contienen timol, p-cimeno, carvacrol y  $\gamma$ -

terpipeno con importante propiedad antibacteriana, antifúngica y antioxidante (Shyamapada Mandal and Manisha DebMandal, 2016; Abdulrahman *et al.*, 2017). Eguchi *et al.* (2016) consignaron que, de manera individual, la molécula de p-cimeno ejerce acción fungicida sobre *Botrytis cinerea*. En tanto que Kolsum Divband *et al.* (2017) encontraron que el timol y el p-cimeno actúan contra cepas de *Fusarium oxysporum*.

Derivado de esta investigación, podemos decir que todos los aceites evaluados en este estudio presentaron actividad antifúngica; aunque la mayoría de los tratamientos inhibieron el crecimiento radial del micelio del fitopatógeno por abajo del 50%. La capacidad fungicida se debió probablemente a las acción de moléculas específicas presentes en los AE; tal es el caso de  $\beta$ -ciclodextrina en orégano con capacidad para actuar contra *B. cinerea* (Munhuweyi *et al.*, 2017); o de los componentes  $\alpha$ -pynene, alcanfor, 1, 8 cienole y  $\beta$ -cariofileno encontrados en las plantas de romero (Pereira *et al.*, 2017); Thiago *et al.* (2018) menciona como principales compuestos con 1,8 cineol (76,93%),  $\beta$ -pineno (11,49%) y  $\alpha$ -pineno (7,15%) en eucalipto y en tanto Tripathi *et al.*, (2008) lo menciona como fungitóxica absoluta en *Botrytis cinerea*. En pirúl se encontraron compuestos en su mayoría  $\alpha$ - y  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -cadinol (Gomes *et al.*, 2013); mientras tanto López *et al.*, (2014) lo menciona como excelente insecticida en contra de la mosca *Haematobia irritans* L. mas no como fungicida. El aceite de aguacatillo (*Persea americana*) es un excelente larvicida debido a moléculas como el estragol, sabineno y 1R- $\alpha$ -pineno (Granados-Echegoyen *et al.*, 2015); pero su actividad antifúngica no está reportada.

## CONCLUSIÓN

La efectividad biológica del aceite esencial (AE) del bejuco de ajo (*Pseudocalymma alliaceum*) y del clavo (*Syzygium aromaticum*) contra *B. cinerea*, patógeno de los frutos de arándano, fue altamente significativa ya que inhibieron en 100% el crecimiento radial del micelio del fitopatógeno a partir de una dosis de 100 y 200  $\mu\text{L.L}^{-1}$ , respectivamente. Los AE de tomillo, poleo y té limón que inhibieron el crecimiento micelial del hongo por arriba del 50% cuando se aplicaron dosis de 200, 400 y 500  $\mu\text{L.L}^{-1}$ , respectivamente. Los AE son una excelente alternativa para el control *in vitro* de *B. cinerea* en el cultivo de arándano establecido en el estado de Oaxaca.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdulrahman Khazim Al-Asmari., Md Tanwir Athar., Ahmed Abdullah Al-Faraidy., and Mohammed Salim Almuhaiza. (2017). Chemical composition of essential oil of *Thymus vulgaris* collected from Saudi Arabian market. *Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine*, 7, (2), 147-150. DOI.org/10.1016/j.apjtb.2016.11.023
- Aguilar-González, A. E., Palou, E., and López-Malo, A. (2015). Antifungal activity of essential oils of clove (*Syzygium aromaticum*) and/or mustard (*Brassica nigra*) in vapor phase against grey mold (*Botrytis cinerea*) in strawberries. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 32, 181-185. doi: 10.1016/j.ifset.2015.09.003
- Ajayi, E. O., Sadimenko, A. P., Afolayan, A. J. (2016). GC–MS evaluation of *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf oil obtained using modified hydrodistillation and microwave extraction methods. *Food Chemistry*, 209, 262-266. DOI.org/10.1016/j.foodchem.2016.04.071
- Ajayi, E. O., Sadimenko, A. P., Afolayan, A. J. (2016). Data showing chemical compositions of the essential oils of the leaves of *Cymbopogon citratus* obtained by varying pH of the extraction medium. *Data in Brief*, 8, 599-604. DOI.org/10.1016/j.dib.2016.06.019
- Aswini, D., Prabakar, K., Rajendran, L., Karthikeyan, G., Raguchander, T. (2009) Efficacy of new EC formulation derived from garlic creeper (*Adenocalymma alliaceum* Miers.) against anthracnose and stem end rot diseases of mango. *World J Microbiol Biotechnol.* 26, 1107–1116. DOI 10.1007/s11274-009-0277-y
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D., and Idaomar, M. (2008). Biological effects of essential oils—A review. *Food and Chemical Toxicology*, 46 (2), 446–475. Doi.org/10.1016/j.fct.2007.09.106
- Bruneton, J. (2001). Farmacognosia. Fitoquímica. Plantas Medicinales. 2ª Ed. Zaragoza: Acribia S. A.
- Celis, A. Mendoza, C. Pachón, M. E. (2009). Revisión: uso de Extractos Vegetales en el Manejo Integrado de Plagas, Enfermedades y Arvenses. *Agronomía Colombiana*. 26(1), 97-106
- Dunkić, V., Kremer, D., Jurišić Grubešić, R., Vuković Rodríguez, J. Y Stabentheiner, E. (2017). Micromorphological and phytochemical traits of four *Clinopodium* L. species

(Lamiaceae). *South African Journal of Botany*, 111, 232-24.  
DOI.org/10.1016/j.sajb.2017.03.013

- Eguchi Y, Widiastuti A, Odani H, Chinta YD, Shinohara M, Misu H, Kamoda H, Watanabe T, Hasegawa M, Sato T. 2016. Identification of terpenoids volatilized from *Thymus vulgaris* L. by heat treatment and their in vitro antimicrobial activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 94, 83-89. DOI: 10.1016/j.pmpp.2016.05.004
- Gomes, V; Agostini, G ; Agostini, F; Atti dos Santos, A. C; Rossato, M; 2013. Variation in the essential oils composition in Brazilian populations of *Schinus molle* L. (Anacardiaceae). *Biochemical Systematics and Ecology*, 48, 222-227.  
<https://doi.org/10.1016/j.bse.2013.01.003>
- Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Alonso-Hernández, N., Vásquez-López ,A., Lagunez-Rivera, L., Rojas-Olivosd, A. (2015). Chemical characterization and mosquito larvicidal activity of essential oil from leaves of *Persea americana* Mill (Lauraceae) against *Culex quinquefasciatus* (Say). *Asian Pacific Journal of Tropical Disease*. 5, (6), 463-467. DOI: 10.1016/S2222-1808(15)60816-7
- Granados-Echegoyen, C., Pérez-Pacheco, R., Soto-Hernández, M., Ruiz-Vega, J., Lagunez-Rivera, L., Alonso-Hernández, N., and Gato-Armas, R. (2014). *Inhibition of the growth and development of mosquito larvae of Culex quinquefasciatus (Diptera: Culicidae) treated with extract from leaves of Pseudocalymma alliaceum (Bignoniaceae)* *Asian Pacific Journal of Tropical Medicine*, 7(8), 594-601. DOI: 10.1016/S1995-7645(14)60101-2
- Kishore, G. K., Pande, S., and Harish, S. (2007). Evaluation of essential oils and their components for broad-spectrum antifungal activity and control of late leaf spot and crown rot diseases in peanut. *Plant Disease*, 91(4), 375-379. DOI.org/10.1094/PDIS-91-4-0375
- Kolsum Divband, Hojjatollah Shokri, Ali Reza Khosravi. (2017). Down-regulatory effect of *Thymus vulgaris* L. on growth and Tri4 gene expression in *Fusarium oxysporum* strains. *Microbial Pathogenesis*, 104, 1-5. DOI.org/10.1016/j.micpath.2017.01.011.

- Lawal, O. A., Ogundajo, A. L., Avoseh, N. O., Y Ogunwande, I. A. (2017). Chapter 18: *Cymbopogon citratus*. *Medicinal Spices and Vegetables from Africa*, 397-423. DOI.org/10.1016/B978-0-12-809286-6.00018-2
- López, A., Castro, S., Andinaa, M.J., Ures, X., Munguía, B., Llabotb, J.M., Elder, H., Dellacassa, E., Palma, S. y Domingueza, L. (2014). Insecticidal activity of microencapsulated *Schinus molle* essential oil. *Industrial Crops and Products*, 53, 209-216. DOI.org/10.1016/j.indcrop.2013.12.038
- Macedo, I. T. F., Bevilaqua, C. M. L., de Oliveira, L. M. B., Camurca Vasconcelos, A. L. F., Vieira, L. D., Oliveira, F. R., Queiroz, E. M., Tome, A. D., and Nascimento, N. R. F. (2010). Anthelmintic effect of *Eucalyptus staigeriana* essential oil against goat gastrointestinal nematodes. *Veterinary Parasitology*, 173(1-2), 93-98. DOI.org/10.1016/j.vetpar.2010.06.004
- Mandal, S., and DebMandal, M. (2016). Chapter 94: Thyme (*Thymus vulgaris* L.) Oils. *Essential Oils in Food Preservation, Flavor and Safety* 825-834. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-416641-7.00094-8>
- Martínez-Gordillo, M., Fragoso-Martínez, I., García-Peña, M., y Montiel, O. (2013). Géneros de Lamiaceae de México, diversidad y endemismo. *Revista Mexicana de Biodiversidad*, 84(1), 30-86. DOI.org/10.7550/rmb.30158
- Munhuweyi, K., Caleb, O.J., van Reenen, A.J., Opara, U.L. (2017). Physical and antifungal properties of  $\beta$ -cyclodextrin microcapsules and nanofibre films containing cinnamon and oregano essential oils. *LWT - Food Science and Technology*, 87, 413-422. DOI.org/10.1016/j.lwt.2017.09.012
- Pereira, P.S., J.Maia, A., Tintino, S.R., Oliveira-Tintino, C.D.de.M., Raulino, I.S.de S., Vega, M.C., Rolón, M., Coronel, C., Marivando Barros, L., Duarte, A.E., Irwin R.A.de Menezes, E., D.M.Coutinho, H., G da Silva, T. (2017). Trypanocide, antileishmania y actividades citotóxicas del aceite esencial de *Rosmarinus officinalis* L in vitro. *Industrial Crops and Products*, 109, 724-729. DOI.org/10.1016/j.indcrop.2017.09.030
- SAS Institute Inc. 2016. SAS 9.4 OLAP server: User's Guide, SAS Institute. Fifth Edition. Cary, North Carolina, USA. Disponible en línea: [https://www.sas.com/es\\_mx/software/sas9.html](https://www.sas.com/es_mx/software/sas9.html)

- Soylu, E. M., Kurt, S., and Soylu, S. (2010). In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *International Journal of Food Microbiology*, 143(3)183-189. DOI.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015
- Tanzeela Nisar, Zi-Chao Wang, Xi Yang, You Tian, Muneeb Iqbal, Yurong Guo. (2017) Characterization of citrus pectin films integrated with clove bud essential oil: Physical, thermal, barrier, antioxidant and antibacterial properties. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 670-680. DOI.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.08.068
- Thiago P. Chaves, T. P; E. Pinheiro, R. E; Melo, E. S; Soares, Ma. J. dos S; N.Souza, J. S; De Andrade, T. B; Gomes de Lemos, T. L; M. Coutinho, H. D. (2018). Essential oil of *Eucalyptus camaldulensis* Dehn potentiates  $\beta$ -lactam activity against *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* resistant strains. *Industrial Crops and Products*, 112, 70-74. DOI.org/10.1016/j.indcrop.2017.10.048
- Tripathi, P., Dubey, N. K. y Shukla, A.K. (2008). Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by *Botrytis cinerea*. *World J Microbiol Biotechnol*, 24, 39–46. DOI.org/10.1007/s11274-007-9435-2
- Villa-Ruano N, Pacheco-Hernández Y, Cruz-Durán R Y Lozoya-Gloria E. (2015). Volatiles and seasonal variation of the essential oil composition from the leaves of *Clinopodium macrostemum* var. *laevigatum* and its biological activities. *Industrial Crops and Products*, 77,741-747. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2015.09.050>
- Wang, J. H., Liu, H., Zhao, J. L., Gao, H. F., Zhou, L. G., Liu, Z. L., Chen, Y. Q., and Sui, P. (2010). Antimicrobial and antioxidant activities of the root bark essential oil of *Periploca sepium* and its main component 2-hydroxy-4methoxybenzaldehyde. *Molecules*, 15, 5807-5817. 37. DOI: 103390/molecules15085807
- Wilson, C. L., Solar, J. M., El Ghaouth, A., and Wisniewski, M. E. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 81(2), 204-210. DOI.org/10.1094/PDIS.1997.81.2.204

## **ANEXOS**

### **Anexo: A**

#### **CULTIVO MONOSPORICO**

Cultivo monosporico a partir de una colonia

Componentes: tubos eppendorf, hematocímetro, cajas de Petri con cultivo papa dextrosa agar (PDA) (BD Bioxon® Becton Dickinson de México), agua destilada esteril.

Procedimiento: De una caja petri con el hongo se toma un disco micelial ( $\varnothing = 0.4$  cm) de la cepa de *B. cinerea*, el cual se colocó en un tubo eppendorf con 10 ml de agua destilada, se agito ligeramente para la separación de esporas. Se cargó el hematocímetro, se colocó 1 ml de la solución para el conteo de esporas. Posteriormente se hacen diluciones hasta llegar a la adecuada del inculo. Se sembraron 100  $\mu$ l de la concentración del inculo de en una caja petri con PDA el cual se distribuyó de manera uniforme en toda la caja dentro del cámara de siembra. Se incubo a 25 °C por 48 horas hasta la formación de la colonia o espora para así cortarla con una jeringa de insulina y transferirla a otra caja Petri con PDA limpia donde queda completamente una solo espora del hongo de esta manera queda purificado el hongo.

### **Anexo: B**

#### **PRESERVACION EN ACEITE MINERAL**

Componentes: tubos de ensayo, lanceta de siembra, medio de cultivo papa dextrosa agar (PDA) (BD Bioxon® Becton Dickinson de México), aceite mineral esterilizado.

Procedimiento: se llenan a mitad los tubos de ensayo de medio de PDA y se deja solidificar de manera inclinada, para la siembra se flamea la lanceta y se toma un fragmento de micelio el cual se coloca en la parte media del tubo, luego se tapa con algodón y se incubo a 27°C por 8 días. Cuando el hongo esta esporulando se agrega el aceite mineral hasta cubrir por completo el hongo y se tapa con algodón, para concluir se sella parafilm y se guarda en lugar oscuro a 27°C.

## **Anexo: C**

### **MICRO CULTIVO**

Componentes: cajas de Petri de vidrio; portaobjetos; cubreobjetos; aros de plástico; papel absorbente; pinzas de disección; lanceta de siembra; agua destilada (todo el material es esterilizado). Azul de metileno, parafilm.

Procedimiento: en la caja Petri de vidrio se introduce el papel absorbente y sobre él se pone el aro de plástico, luego se coloca el portaobjetos sobre el aro de plástico. Se recorta un cubo de medio de cultivo y se coloca sobre el portaobjetos; se toma un fragmento del micelio y se inocula en los cuatro lados del cubo del medio de cultivo; se coloca el cubreobjetos sobre el cubo de cultivo inoculado, posteriormente se agregó el agua destilada estéril en la caja Petri para después cerrarla y sellarla con parafilm e incubar por 7 días a temperatura de  $25^{\circ}\text{C}\pm$  con la luz del día.

Observación: se coloca una gota de azul de metileno sobre un portabjetos limpio, se flamean las pinzas y se retira el cubreobjetos de la caja Petri donde se inoculo el cubo de PDA y se pone el portaobjetos dejando unos instantes para que actué el azul de metileno. Se observa en el microscopio para localizar las estructuras características del hongo (conidióforos, esporangios,...)