

Manejo *in vitro* de antracnosis (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) en aguacate mediante el uso de principios activos botánicos

Management *in vitro* of anthrachnosis (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) in avocado through the use of botanical active principles

Alisa Clementina Barroso-Ake¹ ,
Yisa María Ochoa-Fuentes^{1*} ,
Ernesto Cerna-Chávez¹ ,
Marco Antonio Tucuch-Pérez¹ ,
Víctor Olalde-Portugal² ,
Leticia Robles-Yerena³ 

¹Departamento de Parasitología, Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, Calzada Antonio Narro 1923, Buenavista, CP. 25315, Saltillo, Coahuila, México.

²Departamento de Biotecnología y Bioquímica, Cinvestav, Unidad Irapuato, Libramiento Norte Carretera Irapuato-León Km 9.6, CP. 36824. Irapuato Guanajuato. México.

³SENASICA-DGSV-CNRF, Carretera Federal México-Pachuca km 37.5. CP. 557403. Estado de México, México.

*Autor de correspondencia:
yisa8a@yahoo.com

Nota científica

Recibido: 20 de mayo 2021

Aceptado: 29 de julio 2021

Como citar: Barroso-Ake AC, Ochoa-Fuentes YM, Cerna-Chávez E, Tucuch-Pérez MA, Olalde-Portugal V, Robles-Yerena L (2021) Manejo *in vitro* de antracnosis (*Colletotrichum acutatum* Simmonds) en aguacate mediante el uso de principios activos botánicos. Ecosistemas y Recursos Agropecuarios 8(2): e3038. DOI: 10.19136/era.a8n2.3038

RESUMEN. La antracnosis es una enfermedad causada por el hongo fitopatógeno del género *Colletotrichum*, que disminuye la calidad y rendimiento del aguacate. El objetivo del estudio fue determinar la actividad antifúngica de D-limoneno, β -citronelol y eucaliptol en *Colletotrichum acutatum* de aguacate. Se realizó el aislamiento del patógeno, la identificación morfológica, y molecular mediante técnica (ITS-PCR). Posteriormente, se realizaron pruebas *in vitro* con D-limoneno, eucaliptol y β citronelol. Los datos se analizaron mediante análisis probit, con ANVA y prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). Se midió crecimiento micelial, porcentaje de esporulación y germinación de conidios. Se identificó a la especie *Colletotrichum acutatum*. En la evaluación, β citronelol mostró la mayor efectividad, con intervalos de inhibición de 29 a 89% en el crecimiento micelial, de 61 a 100% en la esporulación y 96 a 100% en la germinación. Por tanto, β citronelol representa una alternativa botánica para el control *in vitro* de la antracnosis.

Palabras clave: Fungistaticos, monoterpenos, metabolitos secundarios, inhibición.

ABSTRACT. Anthracnose is the disease caused by the phytopathogenic fungus of the genus *Colletotrichum*, that decreases quality and yield. The objective of this work was evaluated botanical active principles (PABs) for its control. The pathogen was isolated, the identification was made morphologically, the pathogen identity confirmation was carried out by means of molecular technique (ITS-PCR). Later, *in vitro* tests were carried out with D-limonene, eucalyptol and β citronellol. Data was analyzed by probit analysis, ANOVA and Tukey test ($p \leq 0.05$). The mycelial growth, percentage of sporulation and germination of conidia were measured. The *Colletotrichum acutatum* was identified. In the *in vitro* evaluation, β citronellol showed the greatest effectiveness in the different variables, with inhibition intervals of 29 to 89% in mycelial growth, from 61 to 100% in sporulation, and germination from 96 to 100%. Thus, β citronellol represents a botanical alternative *in vitro* for anthracnose control.

Key words: Fungistatic, monoterpenes, secondary metabolites, inhibition, control.

INTRODUCCIÓN

La enfermedad conocida como antracnosis es ocasionada por el hongo fitopatógeno del género *Colletotrichum*, uno de los principales patógenos del aguacate, no solo por el daño directo en la fruta, sino también porque limita su comercialización y disminuye el valor del producto, lo que impide su exportación (Ávila 2007). La enfermedad se presenta en los tejidos maduros y en desarrollo de la planta, afecta tanto a frutos en campo, como en post cosecha (Prusky *et al.* 2000). El control de la enfermedad se ha enfocado al uso de fungicidas sintéticos; sin embargo, su uso indiscriminado y recurrente trae desequilibrio ecológico, daños en la salud humana, así como resistencia hacia los ingredientes activos por parte de los microorganismos (Pérez *et al.* 2011).

Actualmente se han realizado estudios utilizando extractos vegetales como lo menciona Villacís *et al.* (2017) quienes evaluaron el efecto antifúngico de cinco extractos vegetales: *Datura ferox*, manzanilla (*Chamaemelum nobile*), ortiga (*Urtica dioica*), *Artemisia vulgaris*, y lavanda (*Lavandula officinalis*), para el control de la antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) en tomate de árbol (*Solanum betaceum*), encontrando que el extracto de lavanda presentó el mayor porcentaje de inhibición de crecimiento micelial del hongo (66.23%). Mientras que Bolívar *et al.* (2019) evaluaron el efecto inhibitorio de *Azadirachta indica*, *Phyllanthus niruri*, *Calotropis procera*, *Lippia origanoides*, *Gliricidia sepium* y *Heliotropium indicum* sobre frutos de mango inoculados con *Colletotrichum gloeosporioides*. Encontrando que el diámetro polar, ecuatorial y la pérdida de masa fresca, y las variables químicas no se vieron afectadas por la presencia del hongo, mientras que la apariencia de los frutos tratados con los extractos vegetales se vio en menor proporción afectada por la presencia de *C. gloeosporioides*, en relación el testigo. Con respecto a *Guazuma ulmifolia* (Malvaceae) Ramírez *et al.* (2019) evaluaron el efecto inhibitorio de los extractos de la corteza y fruto, contra *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea*, encontrando que los extractos fueron efectivos para inhibir el crecimiento de *B. cinerea* y *C. gloeosporioides*. En este sentido los prin-

cipios activos botánicos (PABs) son una alternativa para el control de fitopatógenos, ya que presentan actividad fungistática y se tienen pocos estudios. En el marco de una agricultura sostenible, los PABs son promisorios debido a su degradabilidad, bajo costo y elevada efectividad (Martínez *et al.* 2010). Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* de D-limoneno, β-citronelol y eucaliptol en *Colletotrichum acutatum*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Obtención de material vegetal

En huertos del municipio de Uruapan, Michoacán, México, se colectaron 50 muestras directamente del árbol frutos de aguacate con síntomas de antracnosis y se colocaron en bolsas de papel; posteriormente fueron trasladados en hieleras con refrigerante al Laboratorio de Toxicología del Departamento de Parasitología Agrícola de la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro, en Saltillo, Coahuila.

Aislamiento y caracterización morfológica del hongo

Los frutos se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% y se secaron con toallas de papel estériles. Posteriormente, se hicieron cortes de 2 a 3 mm del tejido enfermo, se desinfectaron de nueva cuenta con hipoclorito de sodio al 1% por 3 min, se enjuagaron con agua destilada estéril y se secaron con toallas de papel estériles; se colocaron en cajas Petri con medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) y finalmente se incubaron a 28 °C. Transcurridos cuatro días, se realizó el aislamiento y purificación de cultivos monosporícos.

La caracterización morfológica se realizó mediante la observación de estructuras macroscópicas y microscópicas bajo microscopio (Motic serie Ba310); se utilizó medio PDA después de siete días a 28 °C. Se observó el color al frente, al reverso y del centro de la colonia; se evaluó el tamaño, forma, largo y ancho de conidios, y se determinó la especie mediante las claves taxonómicas de Sutton (1992).

Identificación molecular de los hongos fitopatógenos

Se empleó la técnica ITS-PCR. La extracción de ADN se realizó por el método de Doyle y Doyle (1991), en el cual se raspó el micelio de cada uno de los aislados; se maceraron 0.2 g del micelio adicionando 500 μ L de buffer (Tris-HCL, pH 8.5 50 mM, NaCl 50 mM y SDS 2%). El macerado se colocó en un vórtex durante 30 s; posteriormente, se reposó 15 min en hielo. Despues se adicionaron 500 μ L de cloroformo:alcohol isoamílico 24:1; nuevamente se agitó en el vórtex y se centrifugó a 12 000 rpm durante 15 min; se recuperó el sobrenadante en un nuevo tubo Eppendorf y se añadió un volumen igual de isopropanol al obtenido del sobrenadante. La mezcla reposó en hielo durante 15 min; y se centrifugó a 12 000 rpm durante 10 min y recuperó la pastilla. Finalmente se adicionaron 50 μ L de agua desionizada estéril. La concentración y cuantificación de ADN se llevó a cabo en un espectrofotómetro.

Se amplificaron por PCR las regiones ITS1 e ITS4 entre los genes ribosomales (rDNA) 18S-5.8S-28S, con el par de primers ITS1 (TCCGTAGGTGAAC-CTGCGG)/ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC). Se utilizó un termociclador (AXYGEN); la mezcla de reacción consistió de 0.5 μ L del primer ITS1 a 10 μ L, 0.5 μ L del primer ITS4 a 100 μ M, 0.5 μ L de Taq & Go 5X, 2 μ L de ADN y 17 μ L de agua ultra pura estéril para ajustar a un volumen final de 25 μ L. La amplificación se realizó con 1 ciclo de desnaturación inicial a 95 °C por 30s, 30 ciclos de desnaturación a 95 °C por 30 s, 30 ciclos de alineamiento a 60 °C por 1 min, 30 ciclos de extensión a 68 °C por 1 min y 1 ciclo de extensión final a 68 °C por 5 min. El producto de la PCR se cargó en un gel de agarosa al 1% y se visualizó bajo UV a 60 V, y se purificó y secuenció en el laboratorio nacional del IPICYT. Las secuencias se compararon con las reportadas en la base de datos del banco de genes del National Center for Biotechnology Information (NCBI), mediante el programa BLAST.

Actividad antifúngica de metabolitos secundarios contra *Colletotrichum acutatum*

Se empleó el método de medio envenenado (Ochoa-Fuentes *et al.* 2012). Las concentraciones evaluadas fueron 1 000, 1 500, 2 000, 2 500, 3 000 y 6 000 ppm para los principios activos botánicos D-limoneno y eucaliptol, y de 10, 20, 30, 50 y 100 ppm para β -citronelol. Se utilizaron cinco repeticiones por tratamientos. Se determinó la concentración y el volumen para cada metabolito, a partir de una solución madre y posteriormente se añadió a un matraz con la cantidad requerida de PDA estéril. Se colocaron explantes de 0.5 cm de diámetro con micelio activo del hongo de siete días de crecimiento; finalmente se incubaron a 28 \pm 2 °C hasta que el testigo sin tratamiento llenó la caja por completo. El crecimiento se midió diariamente con un vernier, los dos valores obtenidos en forma de cruz se promediaron para obtener el diámetro micelial desarrollado. El porcentaje de inhibición se determinó mediante la siguiente formula: Porcentaje de inhibición = [(crecimiento micelial del testigo - crecimiento del tratamiento) / crecimiento del testigo] x 100.

Inhibición de la esporulación y la germinación de conidios

Se utilizó la metodología propuesta por González-Estrada *et al.* 2020. Se utilizaron las mismas cajas Petri con las que se determinó el porcentaje de inhibición; transcurridos siete días, se emplearon las mismas concentraciones y tratamientos. Se realizó un barrido de esporas al agregar 9 mL de agua destilada estéril a la caja petri. Las esporas colectadas se transfirieron a un tubo de ensayo y se agitó en un vórtex; se tomaron 20 μ L de la suspensión y se colocaron sobre una cámara Neubauer para cuantificar las esporas en un microscopio óptico (40X) (Motic serie Ba310).

Para la prueba de germinación se prepararon tubos Eppendorff con caldo papa-dextrosa. Cada tubo se inoculó con la misma concentración de esporas, posteriormente se incubaron a 26°C en agitación constante durante 14 h. Se contaron las esporas germinadas y no germinadas con una cámara Neubauer cada 2 h hasta que el control germinó al 100%. Todos

los ensayos se realizaron por triplicado.

Análisis estadístico

Los datos del porcentaje de inhibición micelial se procesaron mediante una regresión Probit, mediante el método de máxima verosimilitud para determinar la CL_{50} y sus límites fiduciales, también, los mismos datos de porcentaje de inhibición de crecimiento y de esporulación y germinación de conidios, se procesaron mediante realizó un análisis de varianza bajo un diseño completamente al azar. Las medias de los tratamientos se compararon con la prueba de Tukey ($p \leq 0.05$). En todos los casos se usó el programa SAS VER 9.0 (SAS 2002).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Aislamiento del patógeno y la caracterización morfológica

Los aislados de hongos fitopatógenos obtenidas a partir del tejido dañado de aguacate por antracnosis fueron denominados como CAU1, CA2, CTU1 y CTU2. Las cepas CAU1, CAU2, CTU1 y CTU2 presentaron características macroscópicas y microscópica similares. Macroscópicas: crecimiento del micelio al azar, blanco denso, gris con la edad, con masas mucilaginosas color rosa salmón, setas y esclerosios ausentes, apresorios pálidos de marrón oscuro, como cápsulas ovoides y ligeramente irregulares. Microscópicas: conidios unicelulares rectos, hialinos, aceptados, cilíndricos con uno o ambos extremos puntiagudos; dimensiones: largo de 8.5 a 16.5 μm x ancho de 2.5 a 4.0 μm . Con base en las claves de Barnett y Hunter (1998) y lo descrito por Sutton (1992), se obtuvo a *Colletotrichum* spp.

Identificación molecular

La amplificación de los fragmentos de genes con los indicadores ITS1 e ITS4 permitió determinar con precisión la especie utilizada en esta investigación. Se identificaron las cepas con índices de identidad de 99% con *C. acutatum* (Tabla 1). Comúnmente, la enfermedad de la antracnosis se ha asociado con la especie *C. gloeosporioides*. Sin embargo, Méndez *et al.* (2015), realizaron

la caracterización molecular de la antracnosis en aguacate en Michoacán, México encontrando a *Colletotrichum golesporoides*, *Colletotrichum acutatum* y *Colletotrichum boninense*, como causantes de la enfermedad.

Inhibición de la esporulación y la germinación de esporas

Los resultados de la esporulación de *C. acutatum* muestran que disminuyó la producción de esporas, con diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre tratamientos. Los compuestos D-limoneno y eucaliptol mostraron un porcentaje de inhibición más bajo que β -citronelol, el cual inhibió la producción al 100% (Tabla 2). La germinación fue totalmente inhibida con las diferentes concentraciones evaluadas, en comparación con el control no tratado. Varios compuestos antimicrobianos inhiben la esporulación y germinación de los hongos, lo cual es importante en el control de estos fitopatógenos porque impide su reproducción y diseminación (Zapata *et al.* 2003, Bautista *et al.* 2004). Los monoterpenos son compuestos que reducen la división celular e inhiben el consumo de oxígeno (Peñuelas *et al.* 1996); también se sabe que inhiben la respiración mitocondrial, la fosforilación oxidativa y la síntesis de ADN (Koitabashi *et al.* 1997). Los monoterpenos obtenidos de hojas de *Sequoia sempervirens* actuaron diferencialmente contra varias especies de hongos; algunas especies se inhibieron con dosis bajas, otras con dosis altas y otras se estimularon por algunos compuestos del extracto (Montes 2009).

Determinación de la efectividad *in vitro* de D-limoneno, eucaliptol y β -citronelol

Los resultados de la actividad antifúngica de los tres PABs evaluados, sobre el desarrollo micelial de *C. acutatum* se muestran en la Tabla 3. β -citronelol presentó la mayor inhibición micelial (34.99 ppm) respecto a los otros metabolitos. Este monoterpenoide acíclico se encuentra naturalmente en varios aceites esenciales de plantas (Sharma *et al.* 2016). Algunos estudios sugieren que la actividad antifúngica de β -citronelol puede ser debido a la inhibición de la biosíntesis de ergosterol (Lim y Shin

Tabla 1. Caracterización molecular del aislados de *Colletotrichum* obtenidos de los frutos de aguacate con síntomas de antracnosis en Uruapan, Michoacán, México.

Código de cepas	Especie	Origen	Nº accesión Gen Bank	% de identidad	Genes amplificados	Hospedero
CAU1	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Uruapan	KF928293	99%	ITS1	<i>Persea americana</i>
CAU1	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Uruapan	KX344998	99%	ITS4	<i>Persea americana</i>
CAU2	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Uruapan	KF928293	99%	ITS1	<i>Persea americana</i>
CAU2	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Uruapan	KX344998	99%	ITS4	<i>Persea americana</i>
CTU1	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Uruapan	KF928293	99%	ITS1	<i>Persea americana</i>
CTU1	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Uruapan	KX344998	99%	ITS4	<i>Persea americana</i>
CTU2	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Uruapan	MT921801	99%	ITS1	<i>Persea americana</i>
CTU2	<i>Colletotrichum acutatum</i>	Uruapan	KX344998	99%	ITS4	<i>Persea americana</i>

Tabla 2. Efecto de diferentes compuestos bioactivos en la esporulación y germinación de *C. acutatum*.

Tratamiento	Esporulación (conidios $\times 10^7$ /mL)	Inhibición de la esporulación (%)	Inhibición de la germinación (%)
β citronelol	1.68E+07	100.00 ^a	100.00 ^a
eucaliptol	4.39E+07	82.27 ^b	100.00 ^a
D-limoneno	5.24E+07	63.13 ^c	100.00 ^a
Control	9.87E+07	0.00 ^d	0.00 ^b

Tabla 3. Concentraciones inhibitorias (ppm) de los compuestos bioactivos contra el crecimiento micelial de *C. acutatum*.

Bioactivo	CL ₅₀ (ppm)	Límite fiducial		CL ₉₀ (ppm)	P-valor	χ^2	Ecuación predicha
		Inferior	Superior				
β -citronelol	34.99	17.49	85.56	203.208	<.0001	25.08	$Y = -2.590 + 1.677X$
eucaliptol	3238	3037	3467	12480	<.0001	49.00	$Y = -76108 + 2.1674X$
D-limoneno	8829	4637	289990	1355761	0.7248	2.05	$Y = 2.312 + 05839X$

2009). La ausencia o presencia reducida de ergosterol en la membrana fúngica resulta en una inestabilidad osmótica y metabólica de la célula fúngica, que compromete la reproducción y la actividad antifúngica. Cerna-Chávez *et al.* (2019) reportaron que β -citronelol inhibe el crecimiento de microrganismos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* y *Rhizoctonia solani*. Con respecto al eucaliptol, la inhibición de *C. acutatum* presentó una CL₅₀ de 3238 ppm. Morcic *et al.* (2012) mencionan que este monoterpeno mostró una fuerte actividad fungicida sobre cepas de hongos micotoxigénicos, pertenecientes a diferentes especies e implicadas en varias enfermedades de plantas, siendo tóxico a los hongos a la concentración más alta. Este compuesto es un monoterpeno líquido, incoloro, soluble en alcoholes, ampliamente utilizado en las industrias farmacológica, cosmética y alimentaria debido a sus propiedades organolépticas (Bhowal y Gopal 2016).

D-limoneno fue el tratamiento con menor porcentaje de inhibición, con una CL₅₀ de 8 829 ppm.

Diversas investigaciones han demostrado que el D-limoneno aumenta la fluidez de las membranas fúngicas, lo que conduce a una alta permeabilidad inespecífica de la membrana y a su pérdida de integridad (Onken y Berger 1999). Sin embargo, en este trabajo *C. acutatum* logró su crecimiento micelial a concentraciones elevadas de D-limoneno. Al respecto, los principales problemas involucrados en los procesos de biotransformación de monoterpenos como el D-limoneno son: i) La inestabilidad química, tanto del precursor, como del producto; ii) La baja solubilidad del precursor; iii) La alta volatilidad, tanto del precursor, como del producto; iv) La alta citotoxicidad, tanto el precursor, como el producto, y v) Las bajas tasas de transformación (Krings y Berger 1998). Las tres primeras complicaciones son muy difíciles de superar, ya se relacionan con las características fisicoquímicas inherentes al sistema; pero un buen cribado de cepas resistentes al limoneno podría superar la citotoxicidad y las bajas tasas de transformación (Bicas y Pastore 2007).

Con respecto a la evaluación con el Eucalyptol la inhibición de *C. acutatum* CL₅₀ de 3 238 ppm, a partir de la concertación máxima evaluada. Morcia *et al.* (2012) mencionaron que este monoterpeno mostró una fuerte actividad fungicida sobre cepas de hongos micotoxigenicos, pertenecientes a diferentes especies e implicadas en varias enfermedades de plantas siendo toxicos a los hongos, en la concentración más alta. Este compuesto es un monoterpeno líquido incoloro soluble en alcoholes y es am-

pliamente utilizado en las industrias farmacológica, cosmética y alimentaria debido a sus propiedades organolépticas (Bhowal 2016).

Las evaluaciones *in vitro* con β-citronelol mostraron altos porcentajes de inhibición en el crecimiento micelial, en la esporulación y en la germinación de *C. acutatum* en dosis bajas, por lo que este bioactivo resulta prometedor y podría evaluarse en el control de la antracnosis del aguacate a nivel campo.

LITERATURA CITADA

Ávila QG, Silva RH, Téliz OD (2007) First report of the anamorph of *Glomerela acutata* causing anthracnose on avocado fruits in Mexico. Plant Disease 91: 1200-1213.

Barnett HL, Hunter BB (1998) Illustrate genera of imperfect fungi. 4th Ed. The American Phytopatological Society. St Paul, Minnesota, USA. 218p.

Bautista BS, Hernández L, Bosque M (2004) Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. Revista Mexicana de Fitopatología 22: 178-186.

Bicas JL, Pastore GM (2007) Isolation and screening of d-limonene-resistant microorganisms. Brazilian Journal of Microbiology 38: 563-567.

Bhowal M, Gopal M (2016) Eucalyptol: Safety and pharmacological profile, RGUHS. Journal of Pharmacological Science 5: 125-131.

Bolívar K, Sanabria ME, Rodríguez D, Ullacio D, de Camacaro MP, Cumana LJ, Crescente O (2009) Calidad poscosecha en frutos de mango (*Mangifera indica* L.) inoculados con *Colletotrichum gloeosporioides* y tratados con extractos vegetales. Revista científica UDO Agrícola 9: 41-50.

Cerna-Chávez E, Alejandro-Rojas G, Ochoa-Fuentes YM, Aguirre-Uribe L, Landeros-Flores J, Hernández-Bautista O (2019) Evaluación *in vitro* de principios activos de origen botánico para el control de hongos fitopatógenos. Scientia Fungorum 49: e1245. DOI: 10.33885/sf.2019.49.1245.

Doyle JJ, Doyle JL (1991) Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 1: 13-15.

González-Estrada RR, Vega-Arreguín J, Villanueva R, Velázquez-Estrada RM, Ramos-Guerrero A, Gutiérrez-Martínez P (2020) Evaluación *in vitro* de productos químicos no convencionales para el control de *Penicillium citrinum*. Polibotánica 49: 161-172.

Koitabashi RT, Suzuki T, Kawazu A, Sakai H, Kuroiwa T, Kuroiwa (1997) 1,8-cineole inhibits root growth and DNA synthesis in the root apical meristem of *Brassica campestris* L. Journal of Plant Research 110: 1-6.

Krings U, Berger RG (1998) Biotechnological production of flavours and fragrances. Applied Microbiology and Biotechnology 49: 1-8.

Lim S, Shin S (2009) Effects of citronellol and thymol on cell membrane composition of *Candida albicans*. Korean Journal of Pharmacognosy 40: 357-364.

Martínez S, Terrazas E, Álvarez T, Mamani O, Vilaa J, Mollinedo P (2010) Actividad antifúngica *in vitro* de extractos polares de plantas del género *Baccharis* sobre fitopatógenos. Revista Boliviana de Química 27: 13-18.

Méndez-Jaimes F, Tlapal-Bolaños B, Almaraz-Sánchez A, Saraiva-Camara A, Guerreiro-Lima W, Silva-Veloso J, Almeida-da Costa C, Brito-Netto MS, Michereff SJ (2015) Caracterización molecular de especies de *Colletotrichum* asociadas a Antracnosis en aguacate de la región centro de Michoacán. *Actas. Proceedings.* pp: 174-180.

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

Morcía C, Malnati M, Terzi V (2012) *In vitro* antifungal activity of terpinen-4-ol, eugenol, carvone, 1, 8-cineole (eucalyptol) and thymol against mycotoxicogenic plant pathogens. *Food Additives & Contaminants: Part A* 29: 415-422.

Ochoa-Fuentes YM, Cerna-Chávez E, Landeros-Flores J, Hernández-Camacho S, Delgado-Ortiz JC (2012) Evaluación *in vitro* de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium* spp. *Phyton* 81: 69-73.

Onken J, Berger RG (1999) Effects of R-(+)-Limonene on Submerged Cultures of the Terpene Transforming Basidiomycete *Pleurotus saidus*. *Journal of Biotechnology* 69: 163-168.

Peñuelas J, Ribas-Carbo M, Giles L (1996) Effects of allelochemicals on plant respiration and oxygen isotope fractionation by the alternative oxidase. *Journal of Chemical Ecology* 22: 801-805.

Pérez A, Rojas J, Chamorro L, Pérez K (2011) Evaluación de la actividad antifúngica de *Melia azederach* sobre aislados de *Colletotrichum* spp. *Revista Colombiana de Ciencia Animal* 3: 309-320.

Prusky D, Freeman S, Dickman M (2000) *Colletotrichum*. Host specificity, pathology, and host-pathogen interaction. St. Paul: American Phytopathological Society Press. USA. 393p.

Ramírez H, Barrientos L, Vargas J, Rodríguez R, Ruíz, M, Virgen G (2019) Inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Botrytis cinerea* con extractos de Guazuma ulmifolia Lam. *Revista Mexicana de Fitopatología* 37: 330-344.

SAS (2002) Guide for personal computers. SAS Institute Inc., Cary. USA. 5136p.

Sharma Y, Khan LA, Manzoor N (2016) Anti-Candida activity of geraniol involves disruption of cell membrane integrity and function. *Journal de Mycologie Médicale* 26: 244-254.

Sutton BC (1992) The genus *Glomerella* and its anamorph *Colletotrichum*. In: Bailey JA, Jeger MJ (eds). *Colletotrichum: Biology, Pathology & Control*. CABi. UK. pp: 1-27.

Villacís L, León O, Santana R, Mangui J, Carranza G, Pazmiño P (2017) Actividad anti fúngica (*in vitro*) de extractos vegetales para el control de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*). *Journal of the Selva Andina Biosphere* 5: 59-64.

Zapata R, Sanabria ME, Rodríguez D (2003) Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de cardón lefaria (*Cereus deficiens* Otto & Dier). *Interciencia* 28: 302-306.