



TECNOLÓGICO
NACIONAL DE MÉXICO



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

**EFFECTO DE FRACCIONES DE METABOLITOS SECUNDARIOS
PRODUCIDOS POR ELICITACIÓN DEL SISTEMA DE DEFENSA DE
AGUACATE HASS (*Persea americana*) SOBRE LA INHIBICIÓN DE
*Colletotrichum gloeosporioides***

por:

ARIANA FABIOLA TORRES SALINAS

DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE

MAESTRO EN CIENCIAS
EN ALIMENTOS

Director: Dra. Martina Alejandra Chacón López

Co-Director: Dra. Rosa Isela Ortiz Basurto



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC

**EFFECTO DE FRACCIONES DE METABOLITOS SECUNDARIOS
PRODUCIDOS POR ELICITACIÓN DEL SISTEMA DE DEFENSA DE
AGUACATE HASS (*Persea americana*) SOBRE LA INHIBICIÓN DE
*Colletotrichum gloeosporioides***

por:
ARIANA FABIOLA TORRES SALINAS

DOCUMENTO DE TESIS ENTREGADO A LA
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO
E INVESTIGACIÓN

COMO REQUISITO PARCIAL PARA
OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS
EN ALIMENTOS

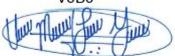
 DIRECTOR:
Dra. Martina Alejandra Chacón López

Vo.Bo.

Dra. Montserrat Calderón Santoyo

CO-DIRECTOR:
Dra. Rosa Isela Ortiz Basurto



VoBo

Dr. Ulises Miguel López García

Tepic, Nayarit, México

noviembre, 2020



“2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria”

Tepic, Nayarit, **19/NOVIEMBRE/2020**

CONSEJO DE LA MAESTRÍA EN CIENCIAS EN ALIMENTOS
No. Oficio CMCA: 33-2020

M.C. Luz del Carmen Romero Islas
JEFE DE LA DIV. DE EST. DE POSG. E INV.
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC
P R E S E N T E

Por este conducto comunico a usted que el Consejo de la Maestría en Ciencias en Alimentos ha designado como revisores de la tesis de la alumna **IBQ. ARIANA FABIOLA TORRES SALINAS** con número de control **G12400390**, cuyo título es **“EFECTO DE FRACCIONES DE METABOLITOS SECUNDARIOS PRODUCIDOS POR ELICITACIÓN DEL SISTEMA DE DEFENSA DE AGUACATE HASS (*Persea americana*) SOBRE LA INHIBICIÓN DE *Colletotrichum gloeosporioides*”** a los miembros que a continuación se enlistan, mismos que han evaluado y aprobado el contenido del manuscrito para obtener el grado de Maestro(a) en Ciencias en Alimentos y que firman de conformidad.


Dra. Martina Alejandra Chacón López
(Presidente)


Dra. Rosa Isela Ortiz Basurto
(Secretario)


Dra. Montserrat Calderón Santoyo
(Vocal)


Dr. Ulises Miguel López García
(Vocal suplente)

Por lo anterior, le solicito se sirva elaborar los oficios correspondientes para **AUTORIZAR LA IMPRESIÓN DE TESIS**. Agradeciendo de antemano la atención prestada a la presente, aprovecho la ocasión para enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica®



Dr. Ulises Miguel López García
Presidente del Consejo de Maestría en Ciencias en Alimentos

c.c.p. Expediente





"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Tepic, Nayarit 21/Noviembre/2020
DIVISION DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
25/681/2020

**IBQ. ARIANA FABIOLA TORRES SALINAS
PRESENTE**

De acuerdo con el reglamento de los Institutos tecnológicos dependientes de la Dirección General de Educación Superior Tecnológica de la Secretaría de Educación Pública y habiendo cumplido con todas las indicaciones que la comisión revisora le hizo a su trabajo de Tesis de Maestría en Ciencias en Alimentos; denominado **"Efecto de fracciones de metabolitos secundarios producidos por eliatación del sistema de defensa de aguacate has (*Persea americana*) sobre la inhibición de colletotrichum gloeosporioides"**

La División de Estudios de Posgrado e Investigación le autoriza para que proceda a la impresión de la misma.

Sin más por el momento quedo de usted.



SECRETARIA DE EDUCACIÓN PÚBLICA
INSTITUTO TECNOLÓGICO
DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE
POSGRADO E INVESTIGACIÓN

ATENTAMENTE
Excelencia en Educación Tecnológica
Sabiduría Tecnológica, Pasión de Nuestro Espíritu.

**M.C. LUZ DEL CARMEN ROMERO ILSAS
JEFA DE LA DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN**

ccp. Archivo DEPI.

**agvl





"2020, Año de Leona Vicario, Benemérita Madre de la Patria"

Tepic, Nayarit, **04/11/2020**

No. Oficio: 25-668-2020

Asunto: Constancia Originalidad de Trabajo de Tesis

A QUIEN CORRESPONDA:

Por medio de la presente se CERTIFICA que una vez analizado mediante el uso del Software PLAGIARISM v. 1740, el trabajo de tesis "Efecto de fracciones de metabolitos secundarios producidos por elicitación del sistema de defensa de Aguacate Hass (Persea americana) sobre la inhibición de Colletotrichum gloesporioides" para obtener el grado de Maestro (a) en Ciencias en Alimentos de la C. IBQ ARIANA FABIOLA TORRES SALINAS con numero de control G12400390 cuenta con un nivel de originalidad Excelente según lo definido en el Procedimiento para la Verificación de Originalidad, por lo cual se determina que no constituye un plagio.

Es importante mencionar que de los trabajos de tesis se publican artículos en revistas Indizadas y/o arbitradas por lo que las técnicas utilizadas son citadas frecuentemente.

Se extiende la presente para los fines que mejor convengan al interesado.

Sin mas por el momento envío saludos cordiales

A T E N T A M E N T E
Excelencia en Educación Tecnológica
Sabiduría Tecnológica, Pasión de nuestro espíritu®

MANUEL ANGEL URIBE VAZQUEZ
DIRECTOR




OCTM/LRA/agvl
Ccp. Archivo DEPI



TECNOLÓGICO NACIONAL DE MÉXICO
INSTITUTO TECNOLÓGICO DE TEPIC
DIVISIÓN DE ESTUDIOS DE POSGRADO E INVESTIGACIÓN
POSGRADO EN CIENCIAS EN ALIMENTOS

En la ciudad de Tepic, Nayarit., el mes de Julio, el que suscribe alumno (a) **Ariana Fabiola Torres Salinas** del Programa de Maestría en Ciencias en Alimentos con número de control **G12400367**, manifiesta que todos los resultados derivados de sus estudios de posgrado y realizados bajo la dirección del (la) **Dra. Martina Alejandra Chacón López** pertenecen al Instituto Tecnológico de Tepic, por lo que cedo los derechos de los mismos a este instituto con fines académicos y de investigación. Así mismo manifiesto que es de mi conocimiento que si de estos resultados se originan patentes o publicaciones, participaré como coautor y de los beneficios que se deriven.

ATENTAMENTE,

IBQ. Ariana Fabiola Torres Salinas

FIRMA

A handwritten signature in black ink, enclosed in a hand-drawn oval. The signature appears to be 'Ariana' followed by some initials.

RESUMEN

Torres-Salinas, Ariana, Fabiola MCA. Tecnológico Nacional de México campus Tepic
Efecto de fracciones de metabolitos secundarios producidos por elicitación del sistema de defensa de aguacate Hass (*Persea americana*) sobre la inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides*. Noviembre 2020. Director: Dra. Martina Alejandra Chacón López
Co-Director: Dra. Rosa Isela Ortiz Basurto

La antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* ocasiona grandes pérdidas en la producción de aguacate y una de las alternativas para el manejo de la enfermedad es el uso de inductores del sistema de defensa. El objetivo de este trabajo fue probar el efecto de los extractos metabólicos completos y fraccionados producidos a través de la inducción del sistema de defensa, sobre el desarrollo del hongo causante de la antracnosis. Se aplicaron distintos elicitors (Metil Jasmonato (MeJ, 0.1 mM), ácido salicílico (AS, 2 mM), peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 10 mL/L), inulina 20 g/L, acemananos 20 g/L, FAGP 20 g/L y Quitosano 15 g/L) al epicarpio de frutos de aguacate Hass. Se extrajeron los metabolitos inducidos mediante solventes y fueron probados de forma *in vitro* e *in vivo* contra el patógeno. Se cuantificó el contenido de fenoles totales y se identificaron algunos de los metabolitos presentes en los extractos. En la inhibición del crecimiento micelial, los extractos metabólicos mostraron una reducción estadísticamente significativa respecto al control negativo, obteniendo el mejor resultado con la aplicación de inulina (80.24±1.82%) como inductor. En el parámetro de esporulación, se obtuvieron inhibiciones de la esporulación de hasta 83.8%. En cuanto a la germinación de esporas, se obtuvieron resultados de hasta 0±0%. En las pruebas *in vivo* de severidad de la enfermedad, el mejor efecto se obtuvo con la fracción de metabolitos retenidos producidos mediante la aplicación de quitosano como inductor (0.11±0.16 mm). Al analizar el contenido de fenoles totales, se encontraron diferencias significativas en relación a los inductores y fracciones estudiadas, observando los mejores resultados con el extracto completo (16.18±6.62) del inductor quitosano (18.53±1.74). Se identificó la presencia de compuestos de tipo fenólico. De acuerdo con los resultados obtenidos en este trabajo, el uso de metabolitos secundarios inducidos fue efectivo para el control de *C. gloeosporioides* en condiciones *in vitro* e *in vitro*, incluso siendo competitivo con fungicidas sintéticos utilizados comercialmente.

Palabras clave: Aguacate, inductor, *Colletotrichum*

ABSTRACT

Torres-Salinas, Ariana, Fabiola MCA. Tecnológico Nacional de México campus Tepic
Effect of secondary metabolites fractions produced by elicitation of the defense system
of Hass avocado (*Persea americana*) on the inhibition of *Colletotrichum
gloeosporioides*. Noviembre 2020. Director: Dra. Martina Alejandra Chacón López
Co-Director: Dra. Rosa Isela Ortiz Basurto

Anthrachnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* entail great losses in avocado production, one of the alternatives for the management of the disease is the use of elicitors of the defence system. The objective of this work is to assay the secondary metabolites produced through the induction of the defence system on the development of the fungus causal agent of the disease. Different elicitors (methyl jasmonate (MeJ, 0.1 mM), salicylic acid (AS, 2 mM), chitosan (15 g/L), hydrogen peroxide (H₂O₂, 10 mL/L), fructanos 20 g/L, acemannan 20 g/L and inuline 20 g/L) were applied to Hass avocado fruits. The metabolites were extracted from the epicarp of the fruit using solvents. The extracts were tested *in vitro* and *in vivo* assay on the pathogen. Regarding the inhibition of mycelial growth, the metabolic extracts caused a statistically significant reduction with respect to the negative control, obtaining the best result with the application of inulin (80.24 ± 1.82%) as inductor. When comparing this variable with respect to the positive control (azoxystrobin), the mycelial reductions of up to 107.84 ± 2.45%. In the sporulation parameter, the best result was an inhibition of sporulation of up to 83.8%, using H₂O₂ as elicitor. Regarding the spore germination, we obtained results of up to 0 ± 0%. *In vivo* tests of disease severity, related differences were observed between the treatments, the negative control and the control with preformed metabolites. Obtaining the best antifungal effect *in vivo* by the fraction of retained metabolites produced by applying chitosan as an inducer (0.11 ± 0.16). Likewise, the best results in the quantification of phenolic were obtained by the complete extract (16.18 ± 6.62) and the inducer chitosan (18.53 ± 1.74). The partial identification of the phenolic, demonstrated the presence of epicatechin, naringenin, trans-cinnamic acid, mevalonic acid, taxifolin and kaempferol. The application of secondary metabolites extracted from the epicarp of the avocado, produced through the induction of defence system, were effectives for the control of *C. gloeosporioides* *in vitro* and *in vitro* conditions, even, they are competitive against commercially synthetic fungicides.

Key words: Avocado, elicitor, *Colletotrichum*

CONTENIDO

RESUMEN	i
ABSTRACT	vii
LISTA DE CUADROS	xi
LISTA DE FIGURAS	xi
CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN	2
CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES	5
2.1 Generalidades del aguacate	5
2.2 Principales problemas fitosanitarios del aguacate	6
2.3 Antracnosis en aguacate por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	6
2.4 Control de la antracnosis	7
2.5 Alternativas a los fungicidas	8
2.6 Los elicitores del sistema de defensa de las plantas	9
2.6.1 Generalidades de los elicitores	9
2.6.2 Mecanismos de acción de los elicitores	10
2.6.3 Elicitores empleados para inducir el sistema de defensa vegetal	12
2.6.3.1 Quitosano (Qt)	12
2.6.3.2 Metil jasmonato (MeJA)	13
2.6.3.3 Ácido salicílico (AS)	13
2.6.3.4 Peróxido de hidrógeno (H ₂ O ₂)	14
2.6.3.5 Fructanos de Agave como elicitores	14
2.6.3.6 Acemananos	16
2.7 El mercado de los inductores de defensa	16
2.8 Metabolitos secundarios	17
2.8.1 Generalidades de los metabolitos secundarios	17
2.8.2 Extracción de metabolitos secundarios	18
2.8.3 Fraccionamiento de metabolitos secundarios	19
2.8.3.1 Filtración con membranas	19
2.8.3.2 Clasificación de los procesos de separación por membranas	19
2.8.3.3 Purificación de metabolitos secundarios mediante membranas	20
2.8.4 Identificación preliminar de metabolitos secundarios	21
CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN	24
CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS	26
CAPÍTULO 5. OBJETIVOS	28

5.1. General	28
5.2 Específicos	28
CAPÍTULO 6. METODOLOGÍA	30
6.1 Etapa 1: Elicitación, extracción y pruebas de inhibición <i>in vitro</i>	30
6.1.1 Material vegetal	30
6.1.2 Elicitación del sistema de defensa del fruto	30
6.1.3 Extracción y concentración de metabolitos secundarios	31
6.1.4 Pruebas de inhibición <i>in vitro</i>	32
6.1.4.1 Re-inoculación de cepa pre aislada de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	32
6.1.4.2 Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial (%ICM)	32
6.1.4.3 Prueba de esporulación	33
6.1.4.4 Prueba de germinación (%G)	34
6.1.4.5 Evaluación de capacidad fungicida y fungistática sobre espora y micelio	35
6.1.4.6 Diseño experimental y análisis estadístico de Etapa 1	35
6.2 Etapa 2: Fraccionamiento y pruebas de inhibición <i>in vivo</i> .	35
6.2.1 Fraccionamiento de metabolitos secundarios	35
6.2.2 Ajuste de las concentraciones mediante análisis de sólidos disueltos	36
6.2.2 Prueba <i>in vivo</i> con las fracciones de metabolitos	36
6.2.2.1 Preparación de suspensión de esporas	36
6.2.2.2 Prueba <i>in vivo</i> con fracciones de metabolitos secundarios	36
6.2.2.3 Porcentaje de severidad de la enfermedad	37
6.2.3 Diseño experimental y análisis estadístico de la Etapa 2	37
6.3 Etapa 3: Cuantificación de fenoles totales e identificación parcial de los compuestos fenólicos	37
6.3.1 Cuantificación de fenoles totales	38
6.3.2 Identificación de los componentes	38
6.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico de la Etapa 3	39
CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN	41
7.1 Etapa 1: Elicitación, extracción y pruebas de inhibición <i>in vitro</i>	41
7.1.1 Inhibición del crecimiento micelial (ICM)	41
7.1.2 Inhibición del crecimiento micelial con respecto a un control positivo (%ICM C+)	48
7.1.3 Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre la esporulación	51
7.1.4 Germinación de esporas (%G) obtenidos mediante la aplicación de los tratamientos.	54
7.1.5 Efecto fungicida vs fungistático de extractos de metabolitos secundarios	57

7.2 Efecto antifúngico <i>in vivo</i> de fracciones de metabolitos secundarios producidos por elicitación del sistema de defensa del fruto	60
7.3 Cuantificación de fenoles totales e identificación parcial de los compuestos fenólicos	66
7.3.1 Cuantificación de fenoles totales	66
7.3.2 Identificación y relación de áreas de los componentes en los extractos de metabolitos secundarios	69
CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES	75
CAPÍTULO 9. REFERENCIAS	80
CAPITULO 10. ANEXOS	100
10.1 Evidencia fotográfica de la prueba <i>in vitro</i> .	100
10.2 Evidencia fotográfica de la prueba <i>in vivo</i> .	109

LISTA DE CUADROS

Cuadro 2. 1 Fungicidas empleados en el control de la antracnosis	8
Cuadro 2.2 Clasificación de los procesos de separación por membranas	21
Cuadro 6.1. Método empleado para el análisis cromatográfico en razón a eluyente B	38
Cuadro 7.1 Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial (%ICM), se muestran las diferencias significativas entre tratamientos	43
Cuadro 7.2 Inductores y sus efectos sobre los frutos	46
Cuadro 7.3 Porcentajes de Inhibición del Crecimiento Micelial con respecto a un control positivo (%ICMC+)	50
Cuadro 7.4. Resultados de esporulación (esp/mL) para los tratamientos	52
Cuadro 7. 5 porcentajes de Germinación (%) de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> para los tratamientos	55
Cuadro 7.6 Efecto sobre la disminución de severidad de fracciones de metabolitos secundarios producidos por elicitación del sistema de defensa de fruto	61
Cuadro 7.7 Concentración de fenoles totales presentados por las fracciones estudiada	67
Cuadro 7.8. Tiempos de retención registrados por los estándares estudiados	70
Cuadro 7.9. Comportamiento de la concentración de los metabolitos secundarios en relación al control	72

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 Apariencia física del fruto del aguacate (<i>Persea americana</i>)	5
Figura 2.2 Daño causado por <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> Penz en el fruto del aguacate (Nelson, 2008)	7
Figura 2.3 Esquema general de la Resistencia sistémica (RS)	11
Figura 2.4 Estructura química de los fructanos de agave: (a)Inulinas. (b)Levanos, (c)Graminanos y (d)Agavinas	15
Figura 2.5 Diagrama general de un proceso de filtración por membranas	20
Figura 6.1. Esquematización general de las etapas del proyecto	30
Figura 7.1 Inhibición del crecimiento micelial	44
Figura 7.2 Efecto fungicida vs fungistático en el micelio	57
Figura 7.3 Efecto fungicida vs fungistático en espora	57
Figura 7.4 Efecto de fracciones de metabolitos secundarios producidos por elicitación del sistema de defensa de fruto en la severidad de antracnosis	62
Figura 7.5 Principales rutas metabólicas relacionadas con compuestos del tipo fenólico que son activadas por procesos de inducción	68
Figura 7.6 Ruta metabólica explicada para frutos inducidos en madurez intermedia de acuerdo a datos cromatográficos	73
Figura 10.1 Evidencia fotográfica de la prueba <i>in vitro</i> : Inhibición del crecimiento micelial	100
Figura 10.2 Evidencia fotográfica de la prueba <i>in vivo</i> : Severidad de la enfermedad	109

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

CAPÍTULO 1. INTRODUCCIÓN

El aguacate es un fruto de origen mexicano que cuenta con más de 400 variedades distintas, entre ellas, la variedad Hass que es la de mayor interés comercial a nivel mundial (SAGARPA, 2000; 2018). Entre las limitantes más relevantes para su exportación se encuentran las de origen fitosanitario, siendo las infecciones fúngicas las más comunes. La antracnosis es una de las enfermedades más importantes debido a que ocasiona pérdidas de entre 20 y 30% de la producción, siendo su agente causal *Colletotrichum* sp. (Zamora-Magdaleno y cols., 2001; Intagri 2017).

Para el control de afecciones de origen fúngico generalmente se emplean fungicidas sintéticos, los cuales pueden ocasionar daños a la salud humana, medio ambiente y fomentar el desarrollo de cepas de alta resistencia a los ingredientes activos de dichos productos (Torres-Calzada y cols., 2013; Landero-Valenzuela y cols., 2017). Debido a lo anterior, es necesaria la búsqueda de alternativas a la utilización de este tipo de sustancias, siendo una de las opciones estudiadas, el uso de elicitores.

Los elicitores son factores físicos, químicos o biológicos que estimulan respuestas fisiológicas o morfológicas de las plantas. Éstos pueden ser derivados del mismo receptor, de su respuesta inmune, parte del organismo patógeno o factores abióticos (Radman y cols., 2003). A partir de la respuesta inmune de la planta se genera una gran variedad de compuestos, entre los que encontramos metabolitos secundarios de interés para la protección de la planta (Conrath y cols., 2001).

Por lo anterior, el presente trabajo de tesis evalúa la utilización de distintos elicitores para la inducción el sistema de defensa del fruto, con el objetivo de aumentar la concentración de metabolitos secundarios con poder antifúngico en el epicarpio del fruto de aguacate, evaluando a los mismos en función de su capacidad antifúngica sobre el hongo *Colletotrichum gloeosporioides* mediante pruebas *in vitro*.

Una vez determinado el elicitor con mayor efecto, los extractos de metabolitos obtenidos de frutos tratados con ellos, fueron fraccionados para su respectiva evaluación contra el patógeno mediante pruebas *in vivo*.

Finalmente, para comprobar si efectivamente hubo una inducción del sistema de defensa del fruto, traducándose esto en la biosíntesis de los metabolitos, se realizó la cuantificación e identificación parcial de los compuestos presentes en la fracción con mayor actividad antifúngica

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

CAPÍTULO 2. ANTECEDENTES

2.1 Generalidades del aguacate

El fruto del aguacate, es de origen mexicano; se describe como “drupa carnosa”, es decir, que la parte interna del pericarpo (endocarpo) se vuelve dura y pétrea, rodeando y protegiendo a una única semilla, hueso o pireno. El fruto se constituye por epicarpio (cáscara), mesocarpio (pulpa) y endocarpo (semilla) (Fig.2.1) (Robayo-Medina, 2016; SAGARPA, 2018). Existen más de 400 variedades de aguacate en el mundo, siendo la variedad Hass la que más se consume (SAGARPA, 2000).

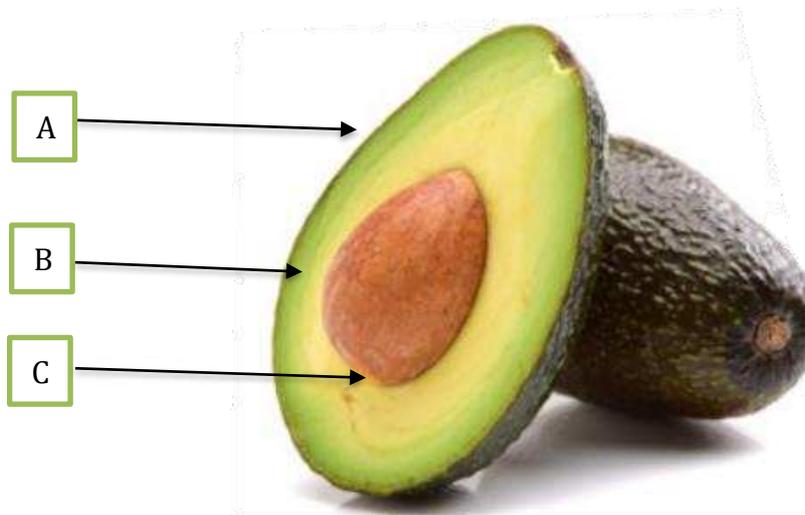


Figura 2.1. Apariencia física del fruto del aguacate (*Persea americana*). A: Epicarpio; B: Mesocarpio; C: Endocarpo.

El aguacate es uno de los productos más exitosos de la exportación agroalimentaria nacional, siendo México el principal productor de este fruto a nivel mundial, con una

aportación del 45.95%, que representa el 4.39% del PIB agrícola nacional. El 78% de la producción nacional de aguacate se cultiva en Michoacán, que, junto con Jalisco, son los únicos Estados con certificación para exportar a Estados Unidos. Sin embargo, los problemas fitosanitarios son considerados una de las principales causas que limitan la exportación del fruto (SENASICA 2017; SAGARPA, 2018).

2.2 Principales problemas fitosanitarios del aguacate

Entre los problemas sanitarios del aguacate, se encuentra el barrenador de ramas del aguacatero (*Copturus aguacatae*), la palomilla barrenadora del hueso (*Stenomacatenifer*) (SENASICA, 2017), los nemátodos *Helicotylenchus* sp., *Rotylenchulus* sp. y *Pratylenchus* sp., y algunas otras enfermedades causadas por hongos, entre las que destaca la antracnosis, una enfermedad causada por hongos del género *Colletotrichum* spp., principalmente por *Colletotrichum gloeosporioides* (Zamora-Magdaleno y cols., 2001).

2.3 Antracnosis en aguacate por *Colletotrichum gloeosporioides*

Como se ha mencionado, la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* es una de las principales patologías que atacan al fruto de aguacate, llegando a causar pérdidas de entre el 20 y el 30%. Es una enfermedad que además de dañar el amarre de la flor y el fruto, también daña ramas tiernas y hojas, con lo cual se limita la capacidad fotosintética del árbol (Intagri, 2017). En frutos, aparecen pequeñas protuberancias de color verde brillante, las lesiones son circulares, tornándose posteriormente de color café a negro claro (Fig.2.2) (Vidales-Fernández y cols., 2005).

La enfermedad puede dispersarse por medio del aire o por salpicaduras de lluvia, cuando se dispersan, los conidios se adhieren al huésped por medio de una capa compuesta de polisacáridos y glucoproteínas (Téliz y Mora, 2007).



Figura 2.2. Daño causado por *Colletotrichum gloeosporioides* Penz en el fruto del aguacate (Nelson, 2008).

La infección del hongo inicia con el establecimiento de la espora a través del reconocimiento de alcoholes grasos y ceras en la superficie del fruto. Una vez que se establece la espora y encuentra condiciones favorables se forma el apresorio (hifas unicelulares laterales cortas cuyo propósito es la fijación mecánica a la cutícula del hospedero) y finalmente se producen las hifas infectivas, las cuales proveen de presión y secretan enzimas que degradan la pared celular de las células vegetales (Beno-Moualem y Prusky, 2000). Los frutos de aguacate contienen metabolitos secundarios como las especies reactivas de oxígeno (ROS), compuestos del tipo fenólico o terpenos, los cuales tienen un efecto fungistático, que mantienen al hongo en latencia; conforme el fruto va alcanzando su madurez de consumo, la concentración de estos compuestos disminuye, lo que favorece el desarrollo del hongo y por ende la aparición de los síntomas de la antracnosis (Rodríguez-López y cols., 2009; Aymacaña-Albán, 2018).

2.4 Control de la antracnosis

Entre los métodos de control empleados contra *C. gloeosporioides*, la estrategia más ampliamente utilizada es la del enfoque químico, específicamente el uso de plaguicidas. Lamentablemente, el uso de plaguicidas puede conllevar nuevas amenazas contra la salud humana y el medio ambiente, además de que su aplicación indiscriminada ha abierto la puerta al surgimiento de cepas con resistencia a dichos compuestos (Torres-Calzada y cols., 2013; Landero-Valenzuela y cols., 2017).

Para el caso concreto del aguacate, se puede encontrar una amplia gama de opciones (Cuadro 2.1) entre las que encontramos el oxicloruro de cobre, hidróxido de cobre y el azoxystrobin, que han tenido resultados satisfactorios para el control de la antracnosis (APEAM, 2014; Intagri, 2017).

Cuadro 2. 1 Fungicidas empleados en el control de la antracnosis.

Plaguicida	Compuesto activo
Piraclostrobina	N-(2-{[1-(4-clorofenil)-1H-pirazol-3-il]oximetil} fenil) N-metoxi carbamato de metilo
Folpet	2- (triclorometilsulfanil) isoindol-1,3-diona
Sulfocop-f	Azufre elemental y Oxicloruro de cobre
Azoxystrobin	(E)-2-{2-[6-(2-cianofenoxi) pirimidin-4-iloxi]fenil}-3-metoxiacrilato de metilo
Fludioxonil	4-(2,2-difluoro-1,3-benzodioxol-4-il)-1H-pirrol-3-carbonitrilo
Tiabendazol	2-(tiazol-4-il)bencimidazol, o bien 2-(4-tiazolil)-1H-benzimidazol

Los potenciales peligros del uso de pesticidas pueden ser alertados, por ejemplo, al leer la descripción de los productos. Al pesticida oxicloruro de cobre, se le ha demostrado genotoxicidad y efectos crónico hepatotóxico en humanos; en cuanto al medio ambiente, se ha reportado toxicidad media en abejas, aves y lombrices, ser muy tóxico para organismos acuáticos y es catalogado en cuanto a su persistencia en suelo como “Extrema” (IRET, 2017).

2.5 Alternativas a los fungicidas

Dados los problemas que pueden generar los fungicidas sintéticos, varios investigadores han buscado alternativas para inhibir el desarrollo de fitopatógenos como *Colletotrichum* sp. Se ha probado el uso de aire caliente (Karabulut y Baykal, 2004), tratamientos hidrotérmicos (Gutierrez-Alonso y cols., 2004), altas presiones (Ragazzo-Sánchez y cols., 2015), microorganismos como agentes antagónicos (Spadaro y Gullino, 2004; Vos y cols., 2014) y extractos de plantas (Bautista-Baños y cols., 2003).

En el trabajo de Peñuelas-Rubio y cols., (2015), se probó el efecto del extracto de la gobernadora (*Larrea tridentata* (D.C) Coville L.) sobre *Alternaria tenuissima*,

Aspergillus niger, *Penicillium polonicum* y *Rhizopus oryzae*, la cual produce metabolitos secundarios con actividad biocida, como son el ácido nordihidroguaiarético (ANDG). Por su parte, Bautista-Baños y cols., (2003), estudiaron extractos vegetales de ajo (*Allium sativum* L.), acuyo (*Piper auritum* HBK.), guayaba (*Psidium guajava* L.) y eucalipto blanco (*Eucalyptus globulus* Labill.) y los evaluaron sobre el desarrollo de *C. gloeosporioides*, documentando la reducción significativa del crecimiento micelial en 54.3, 48.8, 47.7 y 39%, respectivamente. Adicionalmente, la preocupación por la protección del medio ambiente y la salud humana han incentivado el desarrollo de un tipo diferente de modulador del desarrollo de hongos como son los inductores o elicitores del sistema de defensa vegetal.

2.6 Los elicitores del sistema de defensa de las plantas

2.6.1 Generalidades de los elicitores

El término “elictor” es utilizado para denominar los factores físicos, químicos y biológicos que son responsables de las respuestas fisiológicas o morfológicas de las plantas. Según su origen y estructura molecular pueden ser clasificados como bióticos (de composición simple o compleja) o abióticos, físicos o químicos (Radman y cols., 2003).

Los elicitores, son capaces de inducir mecanismos defensivos en las plantas ante el ataque de patógenos, es decir, producir resistencia sistémica (RS). Lo anterior se ha evidenciado por el incremento de enzimas como fenilalanina-amonio liasa (PAL), (EC 4.3.1.24), responsable de la formación de metabolitos secundarios involucrados en la defensa vegetal como las fitoalexinas, además, estos inductores estimulan la síntesis de enzimas involucradas en la defensa, como glucanasas (EC 3.2.1.6 y EC 3.2.1.8), quitinasas (EC 3.2.1.14), quitosanasas (EC 3.2.1.132) y peroxidasas (EC 1.11.1.7). Esta clase de compuestos pueden ser aplicados de forma preventiva directamente a las plantas para evitar o reducir su colonización por organismos patógenos (Inui y cols., 1997; Sathiyabama y Balasubramanian, 1998).

En general, el mecanismo de acción de esta clase de compuestos se basa en la interacción de la molécula elicitora con un receptor de la membrana vegetal, que, a través de un mecanismo que aún no está completamente dilucidado, activa genes específicos, lo que resulta en la síntesis de casi todas las clases de metabolitos secundarios producidos en la planta (Cosio y cols., 1990).

2.6.2 Mecanismos de acción de los elicitores

Para entender el mecanismo de acción de los elicitores, es necesario comprender la interacción planta patógeno, en específico, la diferencia entre interacción compatible e incompatible. En una interacción incompatible, la infección o desarrollo del patógeno es detenida por una combinación de barreras químicas y estructurales de la planta, gracias a la activación de mecanismos de defensa que son inducidos mediante el reconocimiento del patógeno por una proteína del huésped que percibe elementos de virulencia (Honée, 1999).

La activación de los mecanismos de defensa se lleva a cabo en tres etapas, siendo la primera el reconocimiento del patógeno, la segunda la emisión de una señal o mensajero primario que desencadena una cascada de señalización que llevan a la tercera y última etapa que es la activación de genes vinculados a la defensa del fruto, que a su vez ocasionan la biosíntesis sincronizada, sistemática (resistencia sistemática) y/o localizada de metabolitos secundarios con el efecto de retrasar o detener la colonización o el desarrollo del agente patógeno (Honée, 1999; Van-Loon y Van-Strien, 1999). En el caso contrario, al tratarse de una interacción compatible planta-patógeno, alguna de las etapas antes descritas falla y el patógeno logra infectar y desarrollarse en el huésped (Morales, 1998).

La Resistencia Sistémica (RS), (Fig.2.3), es un conjunto de reacciones que ocurren en la planta para protegerse de una infección por patógenos biotróficos, necrotrofos y hemibiotrofos, en ella se busca la transformación de una relación compatible en una incompatible mediante su interferencia en alguna de las etapas antes descritas, a fin de encontrar la mejor forma de activación del sistema de defensa del fruto, que como se ha descrito con anterioridad, este proceso se lleva a cabo mediante el reconocimiento, señalización y activación de la expresión de genes específicos (Leite y cols., 1997).

La etapa de reconocimiento se da por la interacción de un elicitore con un receptor presente en la célula vegetal. Generalmente, el receptor es de naturaleza proteica y puede estar localizado tanto en la membrana plasmática como dentro de la célula vegetal. La unión receptor-elicitore, puede no ser específica y el elicitore puede unirse a más de un receptor o en más de un sitio del mismo receptor, es decir, es multivalente (Bertozzi y Kiessling, 2001).

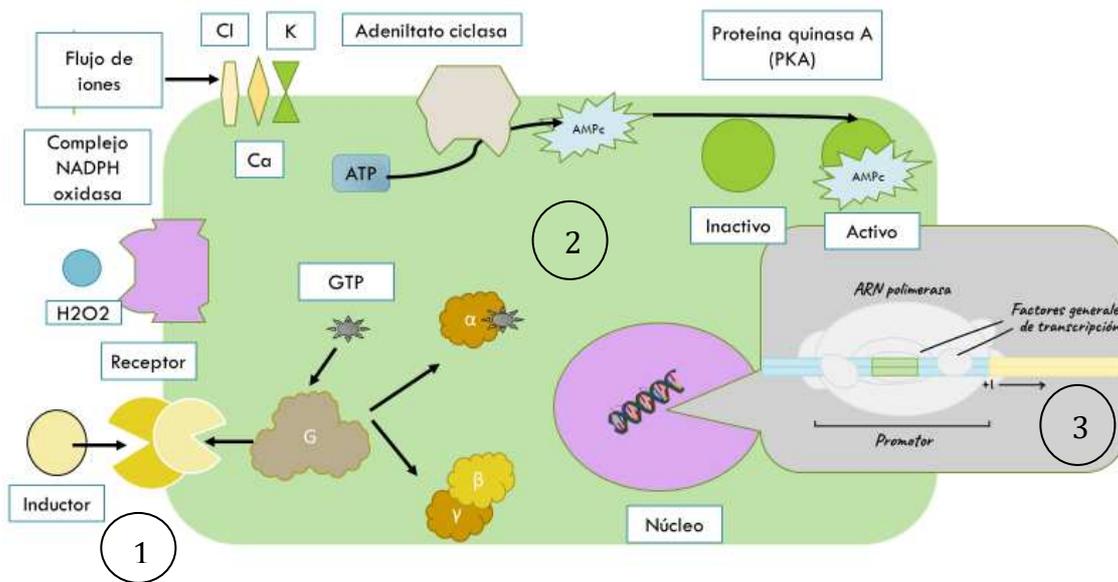


Figura 2.3 Esquema general de la Resistencia sistémica (RS). Siendo: 1- Interacción Inductor/Receptor. 2-Cascada de señalización. 3-Aumento de la expresión de genes específico.

Después de la etapa de reconocimiento se ha especulado que uno de los eventos necesarios para el estímulo de las reacciones de defensa es la modificación de la conformación de la molécula receptora, lo que lleva a la exposición de un sitio de unión para proteína G, donde este tipo de proteínas son las encargadas de percibir información del medio extracelular y transmitir señales a componentes de señalización dentro de la célula (Urano y Jones, 2013, Wolfenstetter y cols., 2015). Después de la unión de la proteína G con el receptor modificado, aumenta la afinidad de la proteína por el guanosin trifosfato (GTP), activándola y causando la separación de sus subunidades. El anterior proceso conlleva a la activación de proteínas, como la fosfolipasa (EC 3.1.4.11), canales de iones, adenil ciclasa (EC 4.6.1.1) y receptores de las quinasa (Leite y cols., 1997; Low y Schroeder, 2001).

Con el objetivo de que ocurra la respuesta defensiva es necesaria la generación de señales primarias, las cuales activan reacciones en cascada que causan la activación o represión de genes relacionados a la defensa. La identidad de los señalizadores primarios se ha hipotetizado como una señal eléctrica (Kuć, 1995).

Los procesos antes descritos llevan a la formación de mensajeros secundarios, como las ROS (moléculas derivadas del oxígeno, los radicales y los no radicales), Ca^{2+} , proteína quinasa, jasmonatos, ácido salicílico (ácido 2-hidroxibenzoico), entre otros (Leite y cols., 1997; Benezzer-Benezzer y cols., 2008).

Una vez activado el sistema de defensa se desarrolla una serie de eventos, como el cambio en el flujo de iones a través de la membrana citoplasmática (Ca^{2+} , K^+ y H^+), la alteración de la concentración del adenosín monofosfato cíclico (cAMP), fosforilaciones y desfosforilaciones de las proteínas reguladoras y la explosión oxidativa (Leite y cols., 1997, Low y Schroeder, 2001). Lo que lleva a la modificación del pH intracelular y de la actividad de las enzimas (debido a su pH óptimo de trabajo), que resulta en la activación de genes de defensa y en el mantenimiento de otros genes en estado de “priming” o alerta. Una vez establecido el primer contacto con el patógeno los genes en estado de alerta se activan, llevando a la síntesis de metabolitos secundarios y al aumento de la actividad de enzimas propias de la defensa, como la PAL y peroxidasa (POD), la síntesis de compuestos tóxicos y la formación de barreras (Conrath y cols., 2001).

2.6.3 Elicitores empleados para inducir el sistema de defensa vegetal

Con base en bibliografía, los elicitores tienen la capacidad de inducir mecanismos de defensa en las plantas debido a que imitan en algún punto las interacciones o reacciones naturales de defensa de la planta ante la presencia de un patógeno. Existen estudios donde se han aplicado diversas moléculas que tienen capacidad elicitora, a continuación, se describen las de interés para este estudio.

2.6.3.1 Quitosano (Qt)

Para el control de patógenos, el quitosano presenta doble efecto: inhibir el crecimiento micelial de algunos hongos fitopatógenos y activar mecanismos defensivos en las plantas (Sathiyabama y Balasubramanian, 1998). Este elicitor y sus derivados han demostrado estimular la síntesis de enzimas defensivas y una disminución de los síntomas de diversas enfermedades producidas por fitopatógenos como la *Phytophthora parasítica* (Pospieszny, 1999, Falcón y cols., 2002).

Falcón y cols., (2002) aplicaron Qt a plántulas de tabaco y las infectaron con *Phytophthora parasitica*, logrando una inducción de la actividad de las enzimas PAL

y glucanasa. Por otro lado, en hojas de maní después de aplicar Qt, se infectaron con *Puccinia arachidis* y se observó una estimulación en la actividad quitinasa y glucanasa, que indujo a una disminución de las lesiones causadas por la enfermedad (Sathiyabama y Balasubramanian, 1998). En cuanto al cultivo del arroz (*Oryza sativa*, L.) Rodríguez y cols., (2004) encontraron que la adición de Qt y derivados estimulan la producción de enzimas defensivas como PAL, β -1,3 glucanasa, quitinasa y quitosanasa, las cuales son importantes para el sistema de defensa de la planta.

2.6.3.2 Metil jasmonato (MeJA)

El ácido jasmónico (JA, (1R,2R)-3-Oxo-2-(2Z)-2-fentenil-cyclopentaneacetico ácido), y sus derivados han demostrado ser reguladores hormonales naturales en plantas. En trabajos como el de Ramírez y cols., (2014), se estudió el efecto de distintos elicitores entre ellos el MeJA, con el que lograron una disminución del desarrollo de *Dickeya* sp. en banano (*Musa* sp.) del 59% en condiciones de invernadero. Belhadj y cols., (2008) encontraron que el MeJA en presencia de carbohidratos como sacarosa inducen varios mecanismos de defensa, entre ellos, la estimulación de varias enzimas como fenilalanina amonio liasa, chalcona sintasa, estilbeno sintasa y la expresión de quitinasa.

2.6.3.3 Ácido salicílico (AS)

El ácido salicílico es una fitohormona, la cual tiene entre sus funciones mediar un tipo de RS, la resistencia sistémica adquirida (RSA). La RSA, a diferencia de la Resistencia sistémica inducida (RSI), tiene como característica estar regulada por el AS, ser respuesta tanto a estrés de tipo biótico como abiótico y se genera un aumento en la síntesis de proteínas relacionadas a la patogenicidad (PR). La RSI es mediada por jasmonatos/etileno (eteno, ET), es respuesta a un inductor únicamente de tipo biótico y no se genera un aumento de proteínas PR (Samaniego-Gámez y cols., 2017).

Una alternativa para disminuir el efecto de fitopatógenos en el cultivo, es la utilización de metabolitos secundarios de plantas, entre ellos polifenoles y otros metabolitos secundarios (Castillo-Reyes y cols., 2017). Arora y cols., (2010) incrementaron en 14 veces el contenido de estilbeno (trans-1,2-difeniletileno) en el cultivo de células de *Cayratia trifolia* con la adición de 3% sacarosa en combinación con el ácido salicílico y un extracto de cuscuta. Roat y Ramawat (2009) realizaron estudios en el cultivo de células

de *Cayratia trifolia* revelando el efecto del AS, el MeJA y el etefón (ácido 2-cloroetilfosfónico), en la producción de polifenoles.

2.6.3.4 Peróxido de hidrógeno (H₂O₂)

El H₂O₂ pueden actuar en los sistemas de señalización intracelular para lograr la aclimatación y la tolerancia al estrés biótico y abiótico. (Foyer y cols., 1997).

Leon y cols., (1995) reportaron que el H₂O₂ indujo la acumulación de ácido benzoico libre (BA) y SA en las hojas de tabaco (*Nicotiana tabacum* L. cv Xanthi-nc). Seis horas después de la infiltración con 300 mM de H₂O₂, los niveles de BA y SA en las hojas aumentaron 5 veces sobre los niveles detectados en las hojas control.

2.6.3.5 Fructanos de Agave como elicitores

Los fructanos son la reserva energética de los agaves; son polímeros de fructosa de diferentes longitud y/o grado de polimerización (GP) que van desde dos a cientos de residuos unidos; estos, pueden ser clasificados de acuerdo a esta característica o a su estructura (lineal o ramificada) (Ritsema y Smeekens, 2003).

De acuerdo con su grado de polimerización, que varía, por ejemplo, entre 2 y 80 para *Agave tequilana* Weber, los fructanos pueden ser clasificados como de bajo (2-9 residuos) o fructooligosacáridos (FOS), medio (10-40) o alto grado de polimerización (FAAGP, mayor a 40 residuos unidos), (Montañez-Soto y cols., 2011; Espinosa y Ortiz, 2013).

Las estructuras de los fructanos dependen del tipo de enlace que contienen, categorizados en: estructuras lineales con glucosa final; inulinas β (2→1) y levanos β (2→6); con glucosa interna (fructanos neoseries) y ramificados con enlaces β (2→1) y β (2→6) con glucosa external (graminanos). En específico, los fructanos de agave que poseen la estructura más compleja, es clasificada como agavinas (por su origen), formada por enlaces β (2→1) y β (2→6) con glucosa intermedia (Fig.2.4), (López y cols., 2003; Ortiz-Basurto, 2008; Mellado-Mojica y López-Pérez, 2013). Los fructanos de agave se caracterizan por es una mezcla de todos los isómeros reportados, en los que el principal es agavinas. A la fecha no existen muchos reportes sobre su efecto elicitor.

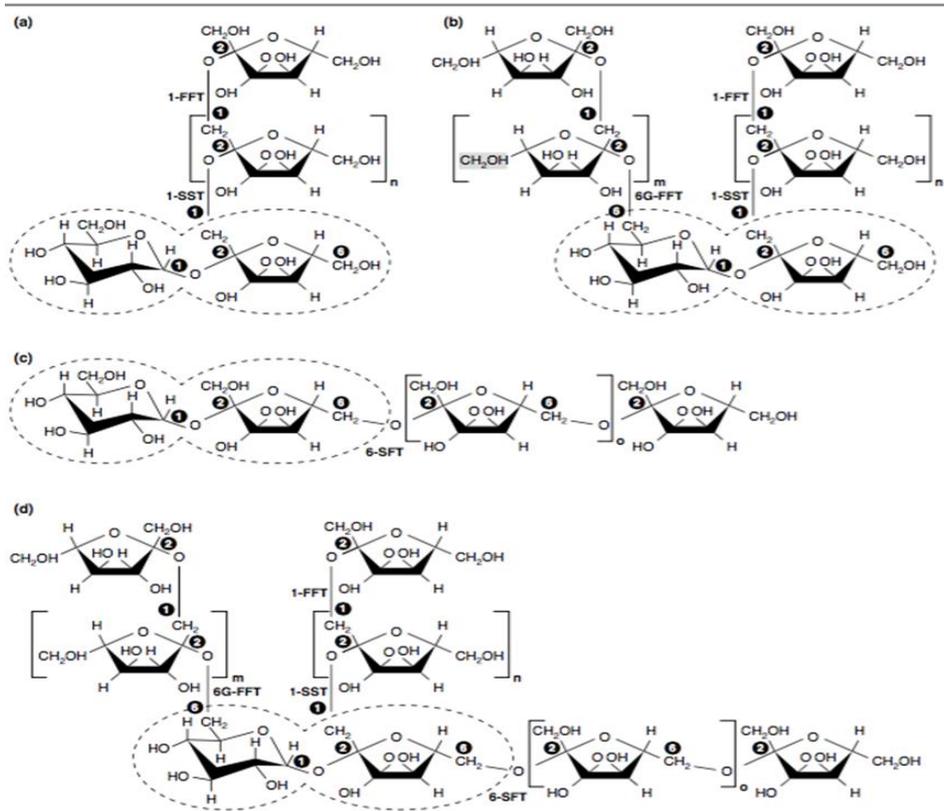


Figura 2.4 Estructura química de los fructanos de agave: (a) Inulinas. (b) Levanos, (c) Graminanos y (d) Agavinas.

Respecto a la estructura de carbohidratos con actividad elicitora, se debe resaltar la importancia del grado de polimerización para dicha propiedad; generalmente sólo los oligómeros dentro de una banda estrecha de GP son activos (Svalheim y Robertsen, 1993; Slováková y cols., 2000). Los carbohidratos con poder elicitor han sido aislados de la pared celular fúngica (Schaffrath y cols., 1995; Schweizer y cols., 2000), muchos de los cuales son compuestos, como glucanas, y oligómeros de manano. La habilidad elicitora de estos compuestos, plantea la posibilidad de que las enzimas asociadas a la actividad de defensa en plantas, tales como quitinasa y β -1,3-glucanasa, pueden liberar estos compuestos, los cuales a su vez activan el sistema de defensa de la planta (Hammerschmidt, 1999).

Los fructanos también son producidos por algunas bacterias y hongos; las especies de hongos que producen levanos se encuentran en los géneros *Aspergillus*, *Aureobasidium*,

Penicillium, *Fusarium*, *Pestalotiopsis*, *Myrothecium*, *Trichoderma*, y *Phytophthora*.

Los grados de polimerización de las levanas producidas por mohos varía entre especies del mismo género. Por ejemplo, las levanas sintetizadas por *Aspergillus sydowi* llegan a un grado de polimerización arriba de las 30 unidades, mientras que *Aspergillus niger*, *Aspergillus phoenix*, *Aspergillus foetidus* y *Aspergillus oryzae* forman cadenas con grados de polimerización entre 3 y 8. Se ha reportado la existencia de levanas sintetizadas tanto por bacterias Gram positivas como por Gram negativas, mientras que la inulina sólo se ha encontrado en especies Gram positivas como *Streptococcus mutans*, *Lactobacillus reuteri* y *Leuconostoc citreum*. Las levanas e inulinas producidas alcanzan grados de polimerización de entre 10^4 a 10^6 unidades monoméricas (Madrigal y Sangronis 2007).

Una posible explicación para la actividad elicitora de estos compuestos y de la importancia que tiene el GP sobre dicha actividad, podría ser explicada por la similitud estructural de los fructanos con compuestos similares (levanas o inulinas) sintetizados por bacterias u hongos. En el caso de ser dada por la similitud con levanas o inulinas, podríamos tener un proceso de elicitación con GP variados, de 3 a 30 para mohos y de 10^4 a 10^6 unidades monoméricas para bacterias (Madrigal y Sangronis, 2007).

2.6.3.6 Acemananos

Otros compuestos de características similares presentes en la pared celular de hongos son los acemananos, los cuales son mucopolisacáridos, polímeros de manosa. Los acemananos están abundantemente presentes en el gel de *Aloe vera*, a esta planta se le ha demostrado capacidad fungicida y antibiótica, propiedades que han sido relacionadas con la presencia de dichos compuestos (Hernández-Monzón y Romagosa-Ibieta 2015; Pérez y cols., 2016).

Si bien, únicamente se ha determinado su capacidad fungicida por acción directa, el hecho de que compuestos similares como los mananos se encuentren formando parte de la pared celular de hongos, los hace un candidato viable para presentar carácter elicitor.

2.7 El mercado de los inductores de defensa

En la actualidad ya existe un interés comercial por el uso de elicitores para el control de patógenos, entre los que destacan el Oryzemate®, Bion®, Messenger®, Oxycom™ y el Elexa®.

El Oryzemate ® (probenazol) es un producto lanzado en 1975 que ha sido empleado para el control de *Pyricularia*, causante de la bruzzone o quemado del arroz, sin surgimiento de resistencia por parte del patógeno. Además de su aplicación en el arroz, este elicitor ha sido utilizado con éxito en algunos cultivos hortícolas mostrando efectividad contra hongos, bacterias y virus (Koganezawa y cols., 1998). Del Bion ® (ácido benzolar S-metilo, ASM), existen formulaciones en donde el ASM es el producto activo y otras en las que el ASM se encuentra conjugado a un fungicida, este último, debido a que se ha reportado que el uso de un inductor de resistencia, junto con un fungicida, presentan un efecto sinérgico (Molina y cols., 1998; Hammerschmidt, 1999). Por su parte Messenger ® contiene una proteína producida por un gen hrp de *Erwinia amylovora*. ELEXA ® contiene Qt (Safescience, 2001), OXYCOM™ es una combinación de nutrientes y una mezcla de ácido peracético (ácido etanoperóxico), ácido acético (ácido etanoico) y H₂O₂ (Kim y cols., 2001).

Los ingredientes activos de estos productos comerciales son elicitores, por consiguiente, tienen la capacidad de activar una cascada de señalización que desemboca en la producción de metabolitos secundarios propios de la defensa de la planta contra fitopatógenos. Cuando se activa el sistema de defensa vegetal, muchos de los genes involucrados en este proceso codifican para enzimas que participan en la biosíntesis de metabolitos secundarios con actividad antifúngica. De aquí la importancia de conocer los metabolitos secundarios que se pueden biosintetizar al inducir el sistema de defensa vegetal.

2.8 Metabolitos secundarios

2.8.1 Generalidades de los metabolitos secundarios

Los metabolitos secundarios son compuestos que, si bien no cuentan con una función en el metabolismo primario, es decir en el crecimiento o reproducción, sí tienen otras funciones, como la defensa contra herbívoros, virus, hongos, bacterias, tal es el caso de, las sustancias alelopáticas, fitoalexinas o disuasorios nutritivos, etc., mientras que otros tienen una función fisiológica, como transporte, almacenamiento o protección contra rayos ultravioleta (Bourgaud y cols., 2001; Wink, 2008; Shilpa y cols., 2010).

Como ya se ha mencionado en anteriores puntos, algunos metabolitos secundarios son característicos de la defensa de las plantas, por lo que la aplicación de este tipo de

compuestos al fruto podría ser la primera línea de defensa contra organismos patógenos, además de tener una posible actividad elicitora. Para lograr obtener de manera diferencial los metabolitos secundarios con actividad elicitora se requeriría de su extracción y un posterior fraccionamiento, con el fin de evitar la presencia de los metabolitos supresores en los extractos, los cuales podrían interferir o reprimir la acción de elicitación o represión (Shiraishi y cols., 1997; Wulff y Pascholati, 1999).

2.8.2 Extracción de metabolitos secundarios

La extracción de metabolitos secundarios suele hacerse mediante el uso de solventes. El solvente adecuado para realizar la extracción es aquél que permite extraer la mayor cantidad del compuesto deseado empleando la menor cantidad de solvente para obtener el mayor grado de pureza (Treybal, 1998; Kim, 2004). Para la obtención de los mejores resultados es recomendable combinar la extracción tradicional con técnicas que permitan aumentar la solubilidad del metabolito o la velocidad de transferencia de masa (Vongsangnak y cols., 2004), por ejemplo la utilización de microondas o ultrasonido (Hemwimol y cols., 2006), donde este último es ampliamente utilizado con el propósito de liberar los compuestos intracelulares al medio, debido a que aumenta la penetración del solvente y permeabiliza la pared celular, mediante la colisión de burbujas de cavitación que causa una mayor reducción en el tamaño de las partículas, facilitando la lixiviación (Soria y Villamiel, 2010).

Para la extracción de metabolitos secundarios se han empleado diversos solventes y combinaciones de solventes. Lenis y cols., (2007) extrajeron metabolitos secundarios de *Bostrychia calliptera* mediante un proceso de extracción con una mezcla de etanol:agua (90:10) a temperatura ambiente y posteriormente fraccionada con hexano (4x100 mL), luego con cloruro de metileno (4x500 mL) y finalmente con etanol. Stashenko y cols., (2003) obtuvieron metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia *Verbenaceae* utilizando agua como solvente e hidrodestilando durante 2 h. García-Peña y cols., (2009) extrajeron metabolitos secundarios de muestras secas de *Passiflora incarnata* L., *Matricaria recutita* L. y *Morinda citrifolia* L. en condiciones isocráticas utilizando 0.1 g de base seca/20 mL metanol como solvente de extracción en condiciones ambientales.

2.8.3 Fraccionamiento de metabolitos secundarios

El objetivo principal del fraccionamiento, es la separación de componentes de una mezcla compleja, a fin de lograr mayor efectividad en el propósito que se persigue, en este caso, en la prevención de enfermedades causadas por fitopatógenos. En el caso de los elicitores, como se ha mencionado con antelación, la purificación cobra mayor importancia, debido a la posible presencia de compuestos que pueden tener actividad supresora, los cuales podrían interferir con la acción de elicitación (Shiraishi y cols., 1997; Wulff y Pascholati, 1999).

Entre los métodos de separación más empleados encontramos la tecnología de filtración con membranas, la cual se aplica a un amplio rango de procesos de separación, purificación y/o concentración, debido a que ofrece ventajas respecto a otros métodos, tales como un costo reducido, mayor selectividad y menor aparición de productos no deseados, es un método simple, con un bajo consumo de energía, facilidad de combinación con otros procesos y de fácil escalamiento (Férez-Martínez, 2004).

2.8.3.1 Filtración con membranas

La filtración permite la separación de dos o más componentes de una corriente fluida, la membrana (Fig.2.5) actúa como barrera selectiva entre las dos fases: el retenido en donde se concentran las partículas que no logran pasar por restricción de tamaño y el filtrado o permeado, compuesto por partículas de menor tamaño que se mantienen dentro del sistema en equilibrio osmótico con el retenido (Cheryan, 1986).

2.8.3.2 Clasificación de los procesos de separación por membranas

Los procesos de separación por membranas que involucran la aplicación de presiones pueden ser clasificados en cuatro categorías en función del tamaño de poro de la membrana, las cuales son: microfiltración (MF), ultrafiltración (UF), nanofiltración (NF) y ósmosis inversa (RO). Las categorías se ven explicadas en el Cuadro 2.2 (Cheryan, 1986).

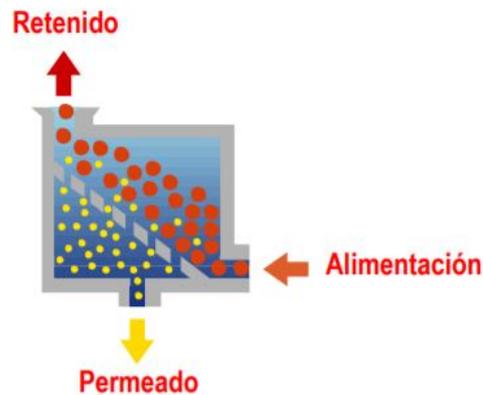


Figura 2. 5 Diagrama general de un proceso de filtración por membranas.

2.8.3.3 Purificación de metabolitos secundarios mediante membranas

Valencia-Arredondo y cols., (2015; 2017) realizaron la purificación de antocianinas a partir de capulín en el que el extracto recuperado fue sometido a un proceso escalonado de clarificación por membranas, aplicando inicialmente microfiltración ($0.05\ \mu\text{m}$) para la retención de bacterias y clarificación y una segunda etapa de ultrafiltración (5 kDa) para la obtención de dos fracciones de metabolitos. Palmeros-Parada (2007) uso membranas de 10 y 30 kDa con el propósito de concentrar metabolitos secundarios para la determinación de la actividad de estrictosidina sintasa y su correlación con la producción de alcaloides indol terpénicos en cultivos de *Uncaria tomentosa*. A nivel planta piloto existen trabajos como el de Russo (2007) en el que probó microfiltración (MF), ultrafiltración (UF) y osmosis inversa (RO), utilizando un flujo tangencial y membranas cerámicas y poliméricas, para la MF se empleó membranas cerámicas de 0.8 y $0.45\ \mu\text{m}$ y polimérica en espiral de 500 kDa y para la UF 1 kDa de cerámica y 6 kDa polimérico; lo anterior con el objetivo de separar selectivamente y recuperar hidroxitirosol, agua y compuestos orgánicos como polifenoles.

Una vez lograda la separación, la identificación total o preliminar de los compuestos presentes (metabolitos) en una mezcla compleja, permite el reconocimiento de algunos de los compuestos ya identificados con poder antifúngico. Por otro lado, es posible contrastar los resultados con lo reportado por otros autores, además, de tener la posibilidad de establecer la presencia de otros compuestos nunca aislados en el fruto o de los que no se conocía actividad antifúngica.

Cuadro 2.2 Clasificación de los procesos de separación por membranas.

Tamaño	Peso molecular g/mol	Aplicaciones	Presión	Tipo de proceso
100µm		Retención de sólidos suspendidos, procesos de clarificación y pasteurización.	0.5 - 3 bar	Microfiltración
10µm				
1µm				
1000 Å (100nm)				
100 Å	100,000	Purificación de biopolímeros, emulsiones y pasteurización.	1 - 10 bar	Ultrafiltración
10 Å	10,000			
	1000	Separación de oligopéptidos, enzimas, antibióticos, herbicidas, pesticidas e insecticidas.	5-30 bar	Nanofiltración
1 Å		Concentración de zumos, azúcares, separación de iones Na ⁺ Cl ⁻ y purificación de agua.	10 - 50 bar	Osmosis reversa

2.8.4 Identificación preliminar de metabolitos secundarios

Es importante lograr la identificación preliminar de la naturaleza de metabolitos secundarios para establecer la mejor técnica de purificación y facilitar su posterior identificación, para ello, pueden ser realizadas en los extractos crudos pruebas analíticas como son Liebermann-Burchard para la identificación de esteroides y triterpenos, Bornträger para quinonas libres, Shinoda para flavonoides, las de Dragendorff y Mayer para alcaloides, la de la gelatina para taninos, Rosenheim para leucoantocianidinas, las de la espuma para las saponinas, Baljet para lactonas y cumarinas, Kedde para cardenólidos, tricloruro férrico para fenoles y taninos, acidez titulable para ácidos orgánicos, fenoles totales para compuestos fenólicos y prueba de Molisch para determinar

la presencia de carbohidratos (Ruíz-Reyes y cols., 2010). Cuando se tiene una idea clara de qué compuestos pueden estar presentes en un muestra, se pueden aplicar, para lograr la purificación y/o identificación, técnicas más complejas y exactas como la cromatografía líquida de alta eficiencia (HPLC).

HPLC, es un método ampliamente utilizado cuyo fin es separar los componentes de una mezcla. Consiste en una fase estacionaria no polar y una fase móvil (Miranda y Martín, 2013). La muestra se transporta en la fase móvil dependiendo de sus características intrínsecas y de la columna elegida para la cromatografía, de acuerdo a las interacciones no-covalentes de los compuestos con la columna. Estas interacciones químicas, son la fuerza determinante para la separación de los contenidos en la muestra. Por último, llegan a un detector; la utilización de un determinado detector dependerá de la naturaleza de los compuestos a analizar y del objetivo de la determinación (Mikkelsen y Cortón, 2010; Morales-Chicaiza, 2014).

Ejemplos de trabajos donde se empleó este tipo de análisis es el de Ariza y Sánchez, (2012), en este trabajo realizaron una determinación de metabolitos secundarios producidos por *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium* sp. El análisis se llevó a cabo mediante HPLC y espectrometría de masas, encontrando la presencia de Iturina A, la cual presentó actividad antifúngica contra *Fusarium* sp. Otro estudio es el realizado por Andersen y cols., (2002) en el que se analizaron los metabolitos producidos por distintas especies del género *Alternaria*, encontrando un perfil de 68 metabolitos distintos. Por último, Granda y cols., (2005) utilizaron HPLC para analizar los compuestos aromáticos producto de la fermentación de residuos de plátano por el hongo *Lentinus crinitus*.

La extracción con solventes y el fraccionamiento de metabolitos secundarios incrementados al inducir el sistema de defensa del fruto de aguacate con los diferentes inductores propuestos, que por lo tanto son propios de la defensa del fruto y su posterior fraccionamiento mediante un sistema de membranas, para su posterior aplicación en el epicarpio de los frutos podría proporcionar una línea de defensa sólida para el control de *C. gloeosporioides*, sustentando una estrategia para el control de la antracnosis en el aguacate.

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

CAPÍTULO 3. JUSTIFICACIÓN

México es el principal productor de aguacate a nivel mundial, con una aportación del 45.95%, representando el 4.39% del PIB agrícola nacional. Siendo la variedad Hass la de mayor demanda comercial a nivel mundial.

Algunas de las limitantes para la comercialización del aguacate son las de carácter fitosanitario, una de las más recurrentes y dañinas es la antracnosis, enfermedad causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, la cual llega a causar pérdidas de entre el 20 y 30% de la producción. Para el control de patógenos, la estrategia más común es el uso de pesticidas, sin embargo, el uso de estos productos conlleva a riesgos para la salud humana y para el medio ambiente, por lo que se buscan alternativas para disminuir o eliminar el uso de estos compuestos.

Debido a la importancia de la comercialización del aguacate para la economía nacional, es de vital importancia la implementación de estrategias para el aseguramiento de la calidad del cultivo, sin poner en riesgo al ser humano y al medio ambiente. El uso de inductores del sistema de resistencia que promueva en el fruto la producción de metabolitos secundarios con poder antifúngico, es una forma prometedora para el control de fitopatógenos. Por otro lado, la separación de los metabolitos en fracciones, permitirá definir los de mayor poder antifúngico. Esta tesis es la base para el desarrollo de fungicidas concentrados y de amplio espectro, que potencialmente podrían ser micro encapsulados en un sistema de liberación controlada que amplíe los periodos de efecto en productos agrícolas.

Por lo anterior se plantea, estudiar el efecto de metabolitos secundarios purificados producidos por elicitación del sistema de defensa del fruto de aguacate (*Persea americana*) variedad Hass sobre la inhibición de *C. gloeosporioides*.

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

CAPÍTULO 4. HIPÓTESIS

La aplicación de elicitores en el epicarpio del aguacate Hass induce la síntesis de metabolitos secundarios con poder antifúngico, la aplicación de los extractos y fracciones específicas, permite limitar el desarrollo del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* en pruebas *in vitro* y reducir la severidad de la enfermedad en pruebas *in vivo*.

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

CAPÍTULO 5. OBJETIVOS

5.1. General

Estudiar el efecto antifúngico sobre *Colletotrichum gloeosporioides* de extractos metabólicos y fracciones, obtenidos por elicitación del sistema de defensa del aguacate Hass mediante la aplicación de distintos elicitores

5.2 Específicos

- Aplicar distintos elicitores (Qt, MaJA, AS, H₂O₂, acemananos, FAAGP e inulina) como inductores del sistema de defensa de aguacate Hass y extraer los metabolitos sintetizados.
- Evaluar *in vitro* el efecto antifúngico de los extractos sobre el hongo *C. gloeosporioides*.
- Fraccionar el extracto que presente el mayor efecto antifúngico *in vitro*.
- Evaluar el efecto antifúngico de las fracciones y el extracto completo contra el hongo *C. gloeosporioides* mediante pruebas *in vitro*.
- Cuantificar los fenoles totales presentes en las fracciones y extractos con mayor efecto *in vivo*.
- Identificar parcialmente los componentes presentes en las fracciones y extractos con mayor efecto *in vivo*.

CAPÍTULO 6. METODOLOGÍA

CAPÍTULO 6. METODOLOGÍA

El proyecto se llevará a cabo en 3 etapas (Fig.6.1):

Etapa 1. Aplicación de los diferentes elicitores en el fruto de aguacate, obtención de los extractos y evaluación del poder antifúngico *in vitro* de los mismos.

Etapa 2. Fraccionamiento del extracto con mayor efecto y evaluación *in vivo* de las diferentes fracciones obtenidas.

Etapa 3. Identificación parcial de metabolitos secundarios de la fracción con mayor efecto.

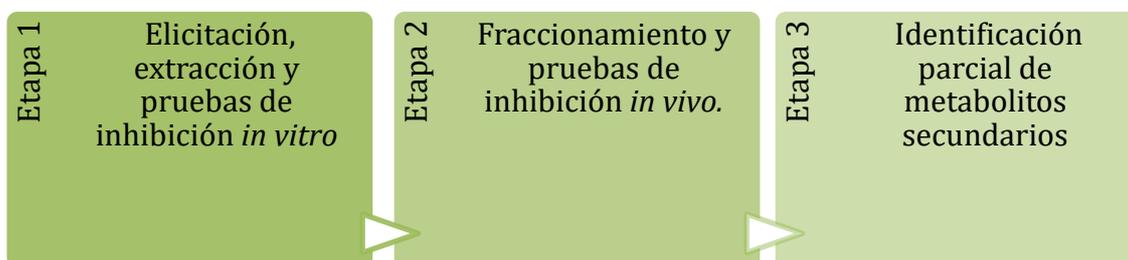


Figura 6.1 Esquematación general de las etapas del proyecto.

6.1 Etapa 1: Elicitación, extracción y pruebas de inhibición *in vitro*

6.1.1 Material vegetal

El material vegetal, es decir, aguacates variedad Hass de categoría orgánica, en estadio fisiológico, de tamaño uniforme y con peso unitario en el rango de entre 120 y 150 g, se obtuvieron de la empresa “Aguacates Echartea”, ubicada en el municipio de Xalisco, en el estado de Nayarit

6.1.2 Elicitación del sistema de defensa del fruto

Para esta etapa del estudio se siguió la metodología propuesta por Xoca-Orozco (2017). Se seleccionaron aguacates comprendidos dentro de madurez intermedia, es decir, con

una firmeza alrededor de los 54 N. La firmeza fue evaluada empleando la metodología propuesta por Villa-Rodríguez y cols., (2011) utilizando un texturómetro EXTECH modelo FHT 200 y seleccionando la punta de penetración de 8 mm.

Se prepararon soluciones de metil jasmonato (MeJA, 0.1 mM), ácido salicílico (AS, 2 mM), peróxido de hidrógeno (H₂O₂, 10 mL/L), inulina 20 g/L, acemananos 20 g/L, FAAGP 20 g/L y quitosano (Qt) 15 g/L en solución de ácido acético a una concentración de 20 mL/L.

Los frutos fueron limpiados con un escobillón, lavados con solución de hipoclorito de sodio (NaClO) a una concentración de 10 mL/L durante 1 min, enjuagados con agua corriente y dejados secar a temperatura ambiente.

Se contemplaron 6 frutos por tratamiento, los cuales fueron sumergidos durante 1 min en las soluciones de prueba, al concluir el tiempo, los frutos fueron secados a 25 °C durante 1 h, enseguida se les retiró el epicarpio, mismo que se almacenó hasta su uso en un ultracongelador a -80°C.

Se incluyó un tratamiento control que consistió en simular el procedimiento sumergiendo frutos en agua destilada.

6.1.3 Extracción y concentración de metabolitos secundarios

Para la extracción de los metabolitos secundarios se empleó la metodología propuesta por Saura-Calixto y cols., (2007) con modificaciones, se tomaron porciones del epicarpio congelado a -80°C y se procedió a macerarlo con ayuda de nitrógeno líquido. Por tratamiento, se procedió a realizar las extracciones de los metabolitos secundarios tomando 2 porciones de 1 g del epicarpio macerado, las cuales fueron introducidas individualmente en tubos falcon de 50 mL, adicionando también 40 mL de una solución metanol-agua acidificada (50:50 v/v) (8 mL/L HCl). Los tubos falcon fueron sumergidos en un baño ultrasónico Fisher Scientific modelo 15337410 a 40 KHz durante 60 min, siendo resuspendidos cada 15 min con ayuda de un vortex marca Labnet durante 15 s. Al finalizar el procedimiento, los tubos se centrifugaron a 3000 g durante 15 min, a 25°C, se decantó el contenido de cada tubo y el sobrenadante se conservó en refrigeración a 4°C, en condiciones de obscuridad, hasta su utilización. El precipitado se resuspendió en 40 mL de una solución acetona-agua (70:30 v/v) y se re-introdujo nuevamente en el baño

durante 60 min, el extracto fue centrifugado a las mismas condiciones, se decantó el sobrenadante y se almacenó a las mismas condiciones antes descritas.

Ambos sobrenadantes se combinaron y concentraron con ayuda de un rotavapor marca Vante modelo RE 100-Pro acoplado a un refrigerante de circulación marca Yamada modelo CF301 durante 45 min a 45°C y ajustando el volumen a 45 mL (22.5 mL de extracto/g de epicarpio). El concentrado se almacenó en condiciones de obscuridad a -20°C hasta su utilización. El procedimiento fue repetido para cada uno de los tratamientos, con el control y con el solvente de extracción.

6.1.4 Pruebas de inhibición *in vitro*

6.1.4.1 Re-inoculación de cepa pre aislada de *Colletotrichum gloeosporioides*

Se inocularon 50 µL de una suspensión de esporas criogenizadas pre-aisladas e identificadas de una cepa de *C. gloeosporioides*, aislada de aguacate, en placas de agar papa dextrosa (PDA) y se incubaron a 27±1 °C durante 9 días, se descartó la presencia de contaminación y se procedió a re-inocular una porción de micelio de 8 mm de diámetro en placas de PDA estériles, las mismas fueron incubadas a 27±1 °C durante 9 días (Fernández-Barbosa y Suárez-Meza, 2009).

6.1.4.2 Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial (%ICM)

Se prepararon por triplicado, placas PDA que contenían el extracto de metabolitos secundarios extraídos del epicarpio del aguacate (previamente tratado con los inductores propuestos) a las concentraciones de 50 30 y 15% (v/v), para hacer el ajuste de concentraciones se prepararon medios con déficit de agua, la cual fue sustituida por los extractos de metabolitos secundarios, mismas concentraciones a las que se les referirá en el presente documento como concentración Alta, Media y Baja, respectivamente, posteriormente se inoculó una porción de 8 mm de micelio del hongo con 9 días de crecimiento, esto con ayuda de un sacabocados. Las placas se incubaron a 27 ±1 °C hasta que el control negativo, que contenía únicamente al hongo en aguar puro, abarcó el total de la caja.

Como control positivo se utilizó azoxystrobin, preparado según recomendaciones del comerciante (100 g/150 L) y como controles negativos se empleó el solvente de extracción rotaevaporado y metabolitos secundarios extraídos del aguacate sin ningún tratamiento, ambos a las mismas concentraciones aplicadas en los tratamientos.

Una vez concluido el experimento, se evaluó el porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial (%ICM) (Eq.1) y el porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial con respecto a un control positivo (%ICMC+) (Eq.2) para cada uno de los tratamientos.

La evaluación de la capacidad de inhibición de los metabolitos secundarios se estudió mediante la variable de %ICM, cuantificando el diámetro de crecimiento con ayuda de un calibrador “Pie de rey” y restando el efecto del solvente sobre la inhibición (Suárez-Meza y cols., 2008).

$$\%ICM = \frac{\text{Diámetro colonia control} - \text{Diámetro colonia de tratamiento}}{\text{Diámetro colonia control} - \text{Diámetro del sacabocados}} \times 100 \quad (\text{Eq.1})$$

Por su parte, la Inhibición Micelial con respecto a un control positivo (ICMC+), se evaluó empleando la Ecuación 2.

$$ICMC+ = \left(\frac{ICM1 \times 100}{ICM2} \right) \quad (\text{Eq.2})$$

Donde:

ICM1: ICM del tratamiento.

ICM2: ICM del control positivo.

6.1.4.3 Prueba de esporulación

Una vez evaluados los porcentajes de ICM e ICMC+, se procedió a adicionar 5 mL de agua destilada estéril a cada una de las placas, con ayuda de la parte superior de una punta de micropipeta estéril se procedió a desprender las esporas, por último, la suspensión fue filtrada con ayuda una gasa estéril. Se tomaron 40 µL del filtrado y se colocaron en una cámara de Neubauer, el conteo se visualizó a través de un microscopio B-380 de la marca OPTIKA® utilizando el objetivo 40X. Se determinó el número de esporas/mL para cada una de las réplicas de los experimentos utilizando la siguiente ecuación Eq. 3, además, utilizando los datos de la esporulación, se determinó el porcentaje de inhibición de la esporulación (%IE) siguiendo la Eq. 4:

$$\frac{\text{esporas}}{\text{mL}} = \frac{N}{80} \cdot 4 \cdot 10^6 \quad (\text{Eq.3})$$

Donde:

N: Suma total de esporas contadas de 80 cuadrados (5x16).

80: Número de cuadrados contados en cada cámara.

$$\%IE = 100 - \frac{\frac{esp}{mL}(t) \times 100}{\frac{esp}{mL}(c)} \quad (\text{Eq.4})$$

Donde:

Esp/mL (t): Esporulación observada con el tratamiento.

Esp/mL (c): Esporulación observada con el control negativo.

6.1.4.4 Prueba de germinación (%G)

Para evaluar la variable de %G se utilizó la metodología propuesta por Xoca-Orozco (2017) con algunas modificaciones. Se realizó una suspensión de esporas a partir de una cepa de 9 días de crecimiento micelial del hongo *C. gloeosporioides*. Se prepararon tubos éppendorf con un volumen total de 1 mL de solución de esporas y metabolitos secundarios a las concentraciones antes estudiadas y ajustando la concentración de esporas a 1×10^6 esporas/mL. Los tubos se mantuvieron en agitación constante en una plancha de agitación marca IKA® a 180 rpm y 25 °C, durante 24 h. Una vez transcurrido el tiempo de incubación, se tomó una alícuota de 40 µL del resultante y con ayuda de una cámara de Neubauer se realizó el conteo de esporas germinadas y no germinadas. Se consideró a una espora germinada aquella cuyo desarrollo del tubo germinativo fue el doble de la longitud de la espora. Para calcular el %G se utilizó la Eq. 5 y a partir de dicha variable se determinó el porcentaje de inhibición de la germinación (%IG) utilizando la Eq.6:

$$\%G = \frac{\text{esporas germinadas}}{\text{esporas germinadas} + \text{esporas no germinadas}} * 100 \quad (\text{Eq. 5})$$

$$\%IG = 100 - \frac{\%G(t) \times 100}{\%G(c)}$$

Donde:

%G (t): %G observado con el tratamiento.

%G (c): %G observado con el control negativo.

6.1.4.5 Evaluación de capacidad fungicida y fungistática sobre espora y micelio

Para determinar si el efecto de los metabolitos secundarios extraídos es de tipo fungicida o fungistático, a partir de las placas empleadas en el ensayo de %ICM, se sustrajo un disco de 8 mm de diámetro del micelio, el cual fue re-inoculado en una caja de PDA sin la presencia de metabolitos. Se observó si el hongo re-inoculado se desarrollaba normalmente con respecto al control.

Para la segunda prueba, se tomaron los tubos éppendorf del ensayo de %G, los tubos se centrifugaron a 5000 g por 10 min, se retiró el sobrenadante y se le adicionó 1 mL de agua destilada estéril, repitiendo el procedimiento 3 veces para asegurar la eliminación de los metabolitos secundarios. Por último, se tomaron 50 μ L y se inocularon en cajas con medio PDA. Las placas fueron incubadas a 27 ± 1 °C. Nuevamente se observó si las esporas inoculadas se desarrollaban con normalidad respecto al control (Xoca-Orozco, 2017).

6.1.4.6 Diseño experimental y análisis estadístico de Etapa 1

Para la evaluación de %ICM, %ICMC, %IE y %IG, los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando un diseño factorial 10x3 con un análisis de varianza (ANOVA), se realizaron comparaciones de medias por una prueba de Tukey ($P < 0.05$), empleando el paquete estadístico STATISTICA 10. Teniendo como variables independientes los inductores y las concentraciones, mientras que como variables dependientes el %ICM, %ICMC, %IE y %IG. Además, se incluyó al control negativo (hongo creciendo en agar no envenenado) y al control positivo (azoxystrobin).

6.2 Etapa 2: Fraccionamiento y pruebas de inhibición *in vivo*.

6.2.1 Fraccionamiento de metabolitos secundarios

En esta etapa únicamente se prosiguió con los inductores que tuvieron mayor efectividad en las pruebas *in vitro* y los de mayor interés científico, es decir inulina, acemananos, quitosano y fructanos.

El fraccionamiento de la solución de metabolitos secundarios se realizó mediante un sistema de filtración frontal tipo tanque agitado de 500 mL a 150 rpm, 25 °C, con presión transmembrana promedio de 3 bar generada con una bomba de peristáltica modelo

WP6111560 de la marca Merck (Alemania) acoplado a una membrana de 1 kDa, obteniendo dos fracciones, una proveniente del retenido y otra del permeado de la misma.

6.2.2 Ajuste de las concentraciones mediante análisis de sólidos disueltos

Para el ajuste de la concentración de sólidos en las fracciones, se procedió a evaluar gravimétricamente los sólidos disueltos en las fracciones de metabolitos preformados. Se pusieron cápsulas de porcelana a peso constante y se les adicionó 5 g de cada solución. Las muestras fueron secadas en un horno a 110°C hasta alcanzar peso constante. Los sólidos disueltos fueron determinados utilizando la siguiente fórmula Eq 7:

$$\%Sólidos = \frac{\text{Peso residuo}}{\text{Peso muestra}} \times 100 \quad (\text{Eq.7})$$

6.2.2 Prueba *in vivo* con las fracciones de metabolitos

6.2.2.1 Preparación de suspensión de esporas

Para la prueba *in vivo*, se tomó un cultivo del patógeno de 9 días de crecimiento y se cubrió con 10 mL de agua destilada estéril. Usando una varilla de vidrio en “L” se procedió a desprender las esporas. Se recaudó la solución y se filtró utilizando una gasa estéril para retener residuos del medio de crecimiento y micelio. Se ajustó la concentración de esporas a 1×10^6 esp/mL mediante la medición en cámara de Neubauer.

6.2.2.2 Prueba *in vivo* con fracciones de metabolitos secundarios

Se utilizaron frutos de aguacate en madurez fisiológica, los cuales fueron sanitizados como se describió con anterioridad. Utilizando como referencia los resultados provenientes de las pruebas *in vitro*, se determinó una concentración del 30% (v/v), ajustando dicha concentración en función del contenido de sólidos de las fracciones. Las fracciones y el extracto metabólico completo se aplicaron por inmersión del fruto durante un minuto.

Una vez transcurridas 24 h, se procedió a inocularlos con la ayuda de un punzón realizando 3 heridas de 3 mm de profundidad y adicionando 20 μ L de la suspensión de esporas (1×10^6 esp/mL) con una micropipeta.

Como controles se utilizaron los metabolitos secundarios del aguacate sin inducción, aguacates no inoculados con esporas y el control positivo con azoxystrobin (100 g/150 L).

6.2.2.3 Porcentaje de severidad de la enfermedad

En los días pos-inoculación se midió el desarrollo del hongo en las heridas hechas e inoculadas con 20 μ L de la suspensión de esporas del patógeno. La severidad de la enfermedad se calculó midiendo el diámetro de la lesión con un vernier, reportando los resultados en mm. El experimento se detuvo una vez que la infección en los frutos control (frutos con patógeno, pero sin tratamiento) hubiera desarrollado una lesión necrotrófica cuyo diámetro aproximado fuera de 10 mm.

6.2.3 Diseño experimental y análisis estadístico de la Etapa 2

Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando un diseño factorial 7x3 con un ANOVA, se realizaron comparaciones de medias por una prueba de Tukey ($P < 0.05$), empleando el paquete estadístico STATISTICA 10. Estableciendo los inductores y la fracción como variables independientes y como variable dependiente la severidad. Se consideró como control, negativo frutos no tratados inoculados con el patógeno y como control positivo la aplicación del fungicida azoxystrobin.

6.3 Etapa 3: Cuantificación de fenoles totales e identificación parcial de los compuestos fenólicos

Uno de los efectos más observados después de un proceso de elicitación es un aumento en la concentración de fenólicos presentes en el fruto. Para esclarecer el mecanismo de acción de los extractos, se realizaron cuantificaciones en el contenido de compuestos fenólicos y la identificación parcial de los compuestos presentes en los mismos.

En la etapa 3 de la investigación se utilizaron los extractos con los mejores resultados observados en la etapa 2, es decir inulina y quitosano.

6.3.1 Cuantificación de fenoles totales

Se tomaron alícuotas de 120 μ L de cada uno de los extractos, a cada una de las alícuotas se les adicionaron 120 μ L de reactivo de Folin-Ciocalteu, ambos fueron mezclados e incubados durante 2 min a 40 °C. Una vez terminada la incubación inicial, se adicionó 960 μ L de una solución de Na₂CO₃ al 5%, se mezclaron y se dejaron incubando durante 20 min a 40 °C. Transcurrido el tiempo, se leyó la absorbancia a $\lambda = 765$ nm. Se determinó la concentración de fenoles en los extractos comparando las absorbancias con una curva patrón de ácido gálico, expresando los resultados en mg/mL de equivalentes de ácido gálico (mg GAE/g), (Miramontes, 2020).

6.3.2 Identificación de los componentes

Con el objetivo de identificar los componentes de las fracciones más efectivas o de mayor interés para el control del desarrollo del patógeno en pruebas *in vivo*, es decir, las fracciones provenientes de los extractos metabólicos obtenidos del epicarpio de aguacate Hass elicitado con quitosano e inulina, se procedió a realizar un análisis cromatográfico por HPLC-SEC. La identificación se llevó a cabo mediante la utilización de un detector de matriz de fotodiodos (PDA) a $\lambda = 280$ y estándares de compuestos de interés: epicatequina, naringenina, ácido trans-cinámico, ácido mevalónico, taxifolina y kaempferol. Para el análisis se utilizó la columna XBridge C18 (4.6x150 mm) mantenida a 35°C, un tiempo de inyección de 10 min, flujo de entrada constante de 0.8 mL/min. y un gradiente empleando dos eluyentes (Cuadro 6.1), A: metanol y B: agua acidificada (4 mL/L de ácido acético).

Cuadro 6.1. Método empleado para el análisis cromatográfico en razón a eluyente B (%).

Tiempo (min)	% B
0	95
1.9	95
2	90
4.4	90
4.5	75
9.9	75
10	50
15.9	50
16	5
30.9	5
31	95
40	95

Para la inyección de los estándares, se prepararon soluciones a 1 mg/mL de metanol y se utilizó el mismo método analítico utilizado con los extractos. Se evaluaron los tiempos de retención y se compararon con los tiempos de retención observados en los cromatogramas de los extractos.

Con el objetivo de determinar si alguno de los metabolitos estudiados estaba presente en mayor proporción con respecto al control con metabolitos preformados, es decir, que se indujo su síntesis como parte de un proceso de activación del sistema de defensa del fruto, se determinó la proporción entre el área de los picos del control de metabolitos preformados contra el de los tratamientos.

6.3.2 Diseño experimental y análisis estadístico de la Etapa 3

Para el análisis de datos de fenoles totales se utilizó como diseño experimental un diseño factorial 3^2 , siendo las variables independientes el extracto y la fracción y la dependiente los mg GAE/g. Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando un ANOVA y mediante una comparación de medias Tukey ($P < 0.05$), empleando el paquete estadístico STATISTICA 10.

Para el análisis de datos de las relaciones de áreas, se utilizó como diseño experimental un diseño factorial de una vía, siendo la variable independiente el tratamiento y la dependiente la relación de las áreas en los análisis HPLC. Los resultados fueron analizados estadísticamente utilizando un ANOVA y mediante una comparación de medias Tukey ($P < 0.05$), empleando el paquete estadístico STATISTICA 10.

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

CAPÍTULO 7. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

7.1 Etapa 1: Elicitación, extracción y pruebas de inhibición *in vitro*

7.1.1 Inhibición del crecimiento micelial (ICM)

Los resultados obtenidos del análisis de la inhibición de crecimiento micelial en pruebas *in vitro* mediante la aplicación de extractos metabólicos inducidos y preformados a distintas concentraciones se muestran en el Cuadro 7.1 y el Anexo 10.1. Los extractos metabólicos obtenidos a partir del epicarpio de frutos de aguacate bajo los diferentes tratamientos de inducción, lograron inhibir el desarrollo micelial de *Colletotrichum gloeosporioides* de manera significativa ($p < 0.05$) con respecto al control negativo (Fig.7.1 B y C). Se obtuvieron los mejores resultados utilizando los extractos a concentración media (30% v/v; 1.08 mg/mL) y empleando a la inulina como inductor, observando una ICM de $80.24 \pm 1.82\%$, pero sin observar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos con acemananos ($79.62 \pm 1.26\%$), H_2O_2 $76.41 \pm .26$ y quitosano $75.18 \pm .45$, a la misma concentración. Por su parte, al contrastar los resultados evaluando los extractos provenientes de los tratamientos de inulina, acemananos, peróxido de hidrógeno y quitosano contra el control positivo con azoxystrobin (Fig.7.1 D), lograron superar significativamente al control, empleando una concentración alta (50% v/v; 1.8 mg/mL) y media. Asimismo, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos con metabolitos preformados (presentes en el epicarpio sin inducción) en comparación con la aplicación de extractos con metabolitos inducidos con el elicitor inulina, con excepción de aquellos a concentración alta (Fig.7.1 A). Este resultado sugiere que *per se* en el epicarpio de aguacate están presentes metabolitos con capacidad antifúngica y que al inducir el sistema de defensa estos metabolitos pueden estar aumentando en concentración, ya que se obtiene una mayor inhibición del hongo, a excepción de la concentración alta.

Los resultados obtenidos mediante la aplicación de concentraciones altas en los tratamientos con metabolitos secundarios preformados e inducidos pueden ser explicados si se considera que todos los tratamientos llegaron al 100% de inhibición

bruta (antes de restar el efecto del solvente sobre el desarrollo del patógeno), si consideramos los resultados obtenidos con los metabolitos preformados a otras concentraciones, donde presentaron resultados inferiores con respecto a los inducidos, se intuye que es posible obtener inhibiciones brutas del 100% a concentraciones de extracto inferiores al 50% v/v.

Los valores representan la media \pm desviación estándar (n=3). Las diferentes letras muestran las diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a la prueba Tukey ($p < 0.05$). ICM (%)¹: Inhibición del crecimiento micelial con respecto dado en relación al control negativo.

Para la determinación del %ICM en cada uno de los tratamientos se restó el efecto del solvente, el cual obtuvo un %ICM de 21.05% a la concentración más alta, esta inhibición es atribuible a la acidificación del medio por parte del solvente. En trabajos anteriores como el de Gutierrez-Montalvan y Mastrocola-Racines (2018) se observó una inhibición máxima del $68.66 \pm 5.92\%$ en el desarrollo del patógeno aplicando 2000 ppm de ácido acético y un tratamiento térmico a 49°C, utilizando como fruto modelo a Papaya (*Carica papaya* L.), lo que indicaría que en condiciones de pH ácido se ve afectado el desarrollo de *Colletotrichum* sp.

Por su parte, las diferencias entre los tratamientos aplicados pueden ser explicados por los distintos mecanismos de inducción, tanto identificados como desconocidos, que podrían estar involucrados, recordando que los elicitores bióticos y abióticos tienen diferentes mecanismos de elicitación (Zhao y cols., 2001). También es posible que las diferencias estructurales entre tratamientos en los que se aplicaron biopolímeros que guardan similitudes estructurales con compuestos encontrados en patógenos, como es el caso de acemananos, inulina y FAAGP. Asimismo, se podría relacionar los efectos observados a la distribución y concentración de los receptores específicos en la célula vegetal.

Cuadro 7.1 Porcentaje de Inhibición del Crecimiento Micelial (%ICM), se muestran las diferencias significativas entre tratamientos.

Elicitor	Concentración	ICM (%)¹
Controles		
Control (-)	NA	0±0 a
Azoxystrobin (Control +)	Establecida	74.40±.8 f, g
Preformados	15% v/v (0.54 mg/mL)	30.61±1.56 b
Preformados	30% v/v (1.08 mg/mL)	60.01±.82 e
Preformados	50% v/v (1.8 mg/mL)	78.94±0 g, h, i
Tratamientos 15% v/v (0.54 mg/mL)		
Acemananos		33.83±1.75 b
Ácido Salicílico		34.52±3.28 b, c
Inulina		39.50±3.26 c, d
Fructanos		42.26±3.12 d
Metil Jasmonato		41.11±4.26 d
Peróxido de hidrógeno		40.35±1.05 d
Quitosano		40.88±.53 d
Tratamientos 30% v/v (1.08 mg/mL)		
Acemananos		79.62±1.26 h, i
Ácido Salicílico		71.50±1.6 f
Inulina		80.24±1.82 i
Fructanos		73.65±.8 f
Metil Jasmonato		71.96±1.14 f
Peróxido de hidrógeno		76.41±.26 f, g, h, i
Quitosano		75.18±.45 f, g, h, i
Tratamientos 50% v/v (1.8 mg/mL)		
Acemananos		78.94±0 g, h, i
Ácido Salicílico		78.94±0 g, h, i
Inulina		78.94±0 g, h, i
Fructanos		78.94±0 g, h, i
Metil Jasmonato		78.94±0 g, h, i
Peróxido de hidrógeno		78.94±0 g, h, i
Quitosano		78.94±0 g, h, i

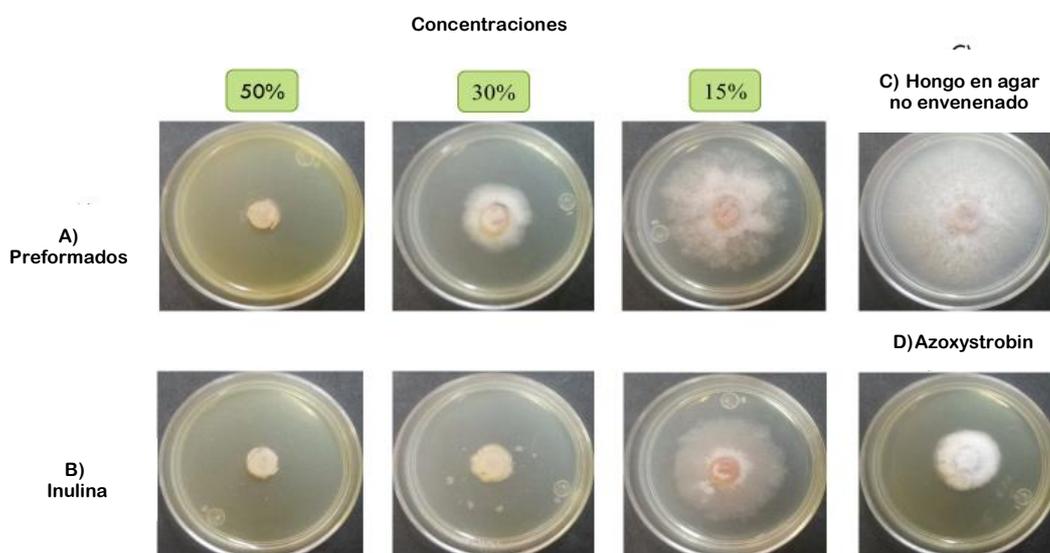


Figura 7.1 Inhibición del crecimiento micelial. A) Aplicación de metabolitos secundarios preformados a las concentraciones estudiadas. B) Aplicación de metabolitos secundarios producidos por inducción del sistema de defensa mediante la aplicación de inulina a las concentraciones estudiadas. C) *C. gloeosporioides* en agar no envenenado como control negativo. D) Aplicación de azoxystrobin como control positivo.

Los resultados obtenidos con inulina, FAAGP y acemananos como Factores Inductores de Metabolitos (FIMs), podría ser evidencia que apoye la reciente propuesta del concepto de ‘sweet immunity’ o ‘sugar-enhanced defence’, en la que se establece que “sacáridos endógenos podrían actuar como moléculas de señalización que se activan por la exposición al estrés, y por lo tanto, inician la amplificación de la señal y conducen a una activación más rápida y robusta de defensa, inmunidad y tolerancia al estrés” (Ceusters y cols., 2017).

Considerando otros enfoques, existe la posibilidad de que las similitudes estructurales con compuestos producidos por agentes patógenos jueguen un papel en el reconocimiento de dichos polímeros. En el caso de los acemananos, existe homología con los mananos, un polímero estructural encontrado en la pared celular de los hongos que ya ha mostrado capacidad inductora como FIMs (Kirakosyan y cols., 2000). Adicionalmente, se ha establecido la capacidad como inductores de diversos polisacáridos estructurales obtenidos de hongos (Yamaguchi y cols., 2000; Zhao y cols., 2005; Ramos-Solano y cols., 2008).

En el caso de los fructanos y la inulina, la diferencia entre la respuesta del fruto podría ser explicada por las variantes estructurales de las mismas, que son explicadas en la sección de antecedentes. Si bien, existe escasa información sobre el mecanismo inductor de estos compuestos en plantas, se sabe que la fructanos con enlaces β 2 \rightarrow 1 son capaces de unirse y ser identificada por las células epiteliales intestinales humanas en el receptor tipo Toll-Like 2 (TLR2) y en menor medida, TLR4, TLR5, TLR7 y TLR8 (Vogt y cols., 2014); si bien los FAAGP cuentan con este tipo de enlace, los enlaces β (2 \rightarrow 6) que también presentan (López y cols., 2003; Ortiz-Basurto, 2008; Mellado-Mojica y López-Pérez, 2013) podrían dificultar su percepción. Un ejemplo muy conocido de moléculas estructuralmente similares, pero que no comparten receptor, es el caso del quitosano y la quitina, donde la quitina tiene como receptor a uno de tipo kinasa denominado CERK1 (Quitina Elicitor Receptor Kinasa), mientras que aún se desconoce el perteneciente al quitosano (Lárez-Velásquez y cols., 2019).

El efecto de la inulina como inductor fue recientemente identificado en lechuga (*Lactuca sativa*), induciendo el sistema de defensa y disminuyendo los síntomas contra el moho gris (*Botrytis cinerea*) (Tarkowski y cols., 2019). También se han estudiado otros tipos de polímeros de fructosa como es el fructooligosacárido de Bardana (OFB), un polímero lineal de fructosa con enlaces β -2,1, el cual ha demostrado la habilidad de inducir la Resistencia Sistémica Adquirida (SAR) contra *Colletotrichum orbiculare* en plántulas de pepino (Zhang y cols., 2009) y contra el virus del mosaico del tabaco (Wang y cols., 2009), encontrando un aumento en la actividad de enzimas relacionadas con la defensa, como es el caso de la fenilalanina amoniaco liasa (PAL), la cual a su vez se relaciona activamente con la ruta de los fenilpropanoides y por ende en la síntesis de compuestos fenólicos.

La acumulación de compuestos fenólicos a partir de un proceso de inducción no es exclusiva de la inulina o de los OFB, en el Cuadro 7.2 se plasman diversos trabajos en los que se reportan los efectos que tienen diversos inductores sobre variados frutos. Entre los efectos de los inductores fue posible observar acumulación de compuestos fenólicos o el aumento de la actividad de enzimas relacionadas con el proceso de síntesis de este tipo de compuestos.

Cuadro 7.2 Inductores y sus efectos sobre los frutos.

Inductor	Fruto modelo	Efecto	Referencia
Quitosano	Frutos de aguacate (<i>Persea americana</i>) en madurez fisiológica, intermedia y de consumo	Inducción de genes involucrados en la biosíntesis de los fenilpropanoides.	(Xoca-Orozco y cols., 2018)
Bicarbonato de sodio (NaHCO ₃) con agua electrolizada (ew)	Naranja × <i>sinensis</i> (L. Obseck) cv. Navelina	Aumento de la actividad de las enzimas Quitinasa, POD, PAL y β-1,3-glucanasa	(Fallanaj y cols., 2016)
Aceite de tomillo	Durazno (<i>Prunus persica</i>)	Aumento de la actividad de PAL	(Chairin & Petcharat, 2017)
Ácido salicílico	Mango (<i>Mangifera indica</i> L. cv. Tainong)	Aumentó de las actividades de quitinasa, β-1,3-glucanasa, PAL y POD e incremento de la concentración de compuestos fenólicos totales y lignina.	(He y cols., 2017)
Ácido salicílico	‘Taaptipjaan’ manzana de cera (<i>Syzygium samarangense</i>)	Incremento la actividad de enzimas POD y CAT, mayor actividad antioxidante y aumento de la concentración de fenoles totales.	(Supapvanich y cols., 2018)
Metil jasmonato y salicilato de metilo	Aguacate Hass (<i>Persea americana</i>)	Aumento de actividad de las enzimas β -1,3-glucanasa y PAL	(Glowacz y cols., 2017)
Sequía al 50%	Chile (<i>Capsicum annuum</i>)	Aumento significativo en la concentración de fenoles.	(Vargas y cols., 2014)
Agua caliente (HWT)	Kiwi (<i>Actinidia deliciosa</i> cv. ‘Yate’)	Incremento significativo en la actividad de las enzimas CAT y POD y de la concentración de compuestos fenólicos totales.	(Chen y cols., 2015)

La acumulación de compuestos fenólicos a partir de la inducción del sistema de defensa de un fruto, es debido al papel que tienen este tipo de compuestos para la defensa contra microorganismos fitopatógenos. Debido a su pequeño tamaño, se favorece su difusividad y facilidad de atravesar estructuras de resistencia como son membranas y paredes celulares. En gran medida la capacidad antimicrobiana de los compuestos fenólicos está dada por interacciones electrostáticas de los mismos con las proteínas de membrana

presentes en la pared celular, desembocando en una mayor permeabilidad y lisis de la membrana (Avello-Lorca y cols., 2012, Upadhyaya y cols., 2014). A su vez, el daño a las membranas puede llegar a causar el colapso de los conidios e hifas resultando en una pérdida de la integridad celular y eventualmente en la muerte del microorganismo (Toyoshima y cols., 1994, Moreno y cols., 2006).

En el trabajo de Veloz-García y cols., (2010), se reporta que los compuestos fenólicos encontrados en el extracto de cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) evaluados de manera *in vitro* sobre *Colletotrichum lindemuthianum* fueron capaces de inhibir la actividad de algunas enzimas importantes para el desarrollo del hongo, como son la celulasa y la poligalacturonasa. En otro estudio, Gamble y cols., (2000), encontraron que los compuestos presentes en el extracto de lino son capaces de inhibir la actividad de celulasas y pectinasas.

Otros mecanismos de actividad antimicrobiana son: la interferencia con la producción de ATP (Yahyazadeh y cols., 2008, Avello-Lorca y cols., 2012), la liberación de moléculas atrapadas en el espacio intraliposomal y la agregación de liposomas presentes en la membrana fúngica (Ikigai y cols., 1993), asimismo, algunos compuestos fenólicos, presentes en el aguacate, como el 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosa 12, 16 dieno, están relacionados con la inhibición de la elongación del tubo germinativo de la espóra (Prusky y cols., 1991, Ardi y cols., 1998).

Los resultados obtenidos del control negativo (tejido no inducido), indican la existencia de compuestos preformados en el epicarpio del aguacate con poder antifúngico. Roy y cols., (2018) estudiaron el efecto de compuestos fenólicos extraídos de fresa (*Fragaria x ananassa*, Duch), observando un efecto antifúngico sobre *Colletotrichum* spp., por parte del ácido trans-cinámico, el ácido ferúlico y por el ácido p-cumárico, siendo los mismos identificados previamente en el fruto del aguacate por Contreras-Gutiérrez y cols., (2013). El efecto antifúngico de extractos vegetales con presencia de compuestos fenólicos es un punto de referencia para evaluar los extractos obtenidos de tejidos vegetales a los que se les ha aplicado inductores del sistema de defensa.

Urdaneta y cols., (2013), reportaron un %ICM de hasta el 86.1% sobre *Colletotrichum acutatum* empleando una concentración de 2% de un extracto etanólico de *Gliricidia*

sepium, efecto atribuible a la presencia de metabolitos secundarios como son los isoprenoides alcaloides, fenoles simples y flavonoides. Tomando en cuenta las características de la extracción y el contenido de materia seca de las hojas del trabajo de Urdaneta y cols., (2013), que varía de un 8.75 a un 13.39% según lo reportado por Cuervo-Jiménez y cols., 2013, se obtiene un equivalente en concentración del 64.88% del extracto de *G. sepium*.

En el trabajo de tesis de licenciatura de Carranza-Arévalo (2017) se estudió el efecto de diversos extractos vegetales sobre *Colletotrichum* sp., entre ellos los extractos vegetales de manzanilla (*Matricaria recutita*), chamico (*Datura ferox*), marco (*Ambrosia arborescens* Mill.), lavanda (*Lavandula officinalis*) y ortiga (*Urtica dioica*), obteniendo valores máximos de inhibición de 63.27% y mínimos de 11,87% respectivos a los extractos vegetales de lavanda y ortiga a una concentración máxima de 85% v/v.

En el trabajo de tesis de maestría de Xoca-Orozco (2017), aplicando condiciones similares de extracción e inducción (tiempo, fruto modelo e inductores) a las empleadas en el presente proyecto, se obtuvo un %ICM de entre el 49 y el 74% utilizando una concentración máxima de 16 mg/mL de metabolitos secundarios extraídos del epicarpio del aguacate. Para obtener una correcta comparación, se realizó un análisis gravimétrico de los extractos obtenidos en el presente trabajo de tesis, estableciendo una concentración de sólidos disueltos del 0.367%, tomando en cuenta que los mejores resultados fueron obtenidos a una concentración del 30%, fue posible establecer una concentración de 1.08 mg/mL para los extractos estudiados en la presente tesis, diferencia que puede ser atribuida a los procesos de concentración de ambos extractos.

7.1.2 Inhibición del crecimiento micelial con respecto a un control positivo (%ICM C+)

Con base en una comparación relativa entre los resultados obtenidos con el control positivo con azoxystrobin y los obtenidos con los tratamientos, se obtuvieron los resultados mostrados en el Cuadro 7.3, observando inhibiciones del crecimiento micelial de hasta el 107.84±2.45% utilizando una concentración del 30% v/v del extracto en el que se utilizó inulina como inductor. En cuanto a los resultados de acuerdo a la concentración, se obtuvieron %ICMC+ del 106.1±0% para todos los tratamientos a

concentración alta (50 v/v), de hasta $107.84 \pm 2.45\%$ al utilizar una concentración media (30% v/v) de metabolitos secundarios producidos al utilizar inulina como inductor y del 56.8 ± 4.19 para tratamientos a concentración baja (15% v/v; 0.54 mg/mL) con FAAGP como inductor. Igualmente se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la mayoría de los tratamientos con metabolitos preformados y aquellos con metabolitos inducidos, con excepción de aquellos en los que se utilizó la concentración alta, atribuido al mismo principio del apartado anterior.

Los resultados obtenidos se podrían explicar debido a la existencia de cepas de *C. gloeosporioides* que ya presentan resistencia al fungicida, como fue reportado por Gutiérrez-Alonso y Gutiérrez-Alonso en 2003. El azoxystrobin pertenece a la familia de las estrobilurinas, por lo tanto, tiene efecto en un sitio específico, es decir el citocromo b (cyt b), sin embargo, esta característica facilita el desarrollo de resistencia por parte del patógeno (Pérez, 2006). La resistencia que presentan algunas comunidades fúngicas a este tipo de fungicidas ha sido atribuida a una mutación puntual G143A, además de ser identificada la sobreexpresión del gen cyt b (Alfaro-Alvarado, 2019).

Los resultados que se obtienen del presente experimento indican que el uso de metabolitos secundarios obtenidos por elicitación del sistema de defensa puede rivalizar con fungicidas ampliamente utilizados como es el caso del azoxystrobin y por lo tanto podría ser una alternativa viable para el control de microorganismos fitopatógenos. Además, debido a la variedad de compuestos presentes en extractos vegetales sería más complejo el desarrollo de cepas patógenas resistentes.

Cuadro 7.3 Porcentajes de Inhibición del Crecimiento Micelial con respecto a un control positivo (%ICMC+).

Elicitor	Concentración	ICMC+ (%)¹
Controles		
Preformados	15% v/v (0.54 mg/mL)	41.15±2.1 a
Preformados	30% v/v (1.08 mg/mL)	80.65±1.11 e
Preformados	50% v/v (1.8 mg/mL)	78.94±0 g, h, i
Tratamientos 15% v/v (0.54 mg/mL)		
Acemananos		45.47±2.35 a
Ácido Salicílico		46.4±4.41 a, b
Inulina		53.09±4.38 b, c, d
Fructanos		56.8±4.19 d
Metil Jasmonato		55.26±5.73 d
Peróxido de hidrógeno		54.23±1.41 c, d
Quitosano		54.95±.71 d
Tratamientos 30% v/v (1.08 mg/mL)		
Acemananos		79.62±1.26 h, i
Ácido Salicílico		96.1±2.16 f
Inulina		107.84±2.45 h
Fructanos		98.98±1.08 f, g
Metil Jasmonato		96.72±1.54 f
Peróxido de hidrógeno		102.69±.35 f, g, h
Quitosano		101.04±.61 f, g, h
Tratamientos 50% v/v (1.8 mg/mL)		
Acemananos		106.1±0 g, h
Ácido Salicílico		106.1±0 g, h
Inulina		106.1±0 g, h
Fructanos		106.1±0 g, h
Metil Jasmonato		106.1±0 g, h
Peróxido de hidrógeno		106.1±0 g, h
Quitosano		106.1±0 g, h

Los valores representan la media ± desviación estándar (n=3). Las diferentes letras muestran las diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a la prueba Tukey (p<0.05). ICMC+ (%)¹: Inhibición del crecimiento micelial en función a los resultados obtenidos mediante la aplicación de azoxystrobin.

7.1.3 Efecto de la aplicación de los diferentes tratamientos sobre la esporulación

Los resultados obtenidos al evaluar la inhibición de la esporulación después de aplicar los extractos (Cuadro 7.4), presentan diferencias estadísticas significativas ($p < 0.05$) entre todos los tratamientos y el control negativo. Adicionalmente, se observaron diferencias ($p < 0.05$) entre el control positivo ($39.6 \pm 5.96\%$) y los extractos metabólicos inducidos. Comparando los resultados obtenidos al aplicar metabolitos preformados, no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre la mayoría de los tratamientos y el control, exceptuando los obtenidos a partir de la utilización de fructanos ($78.05 \pm 4.67\%$) y quitosano (84.55 ± 0.12) a una concentración baja de extracto, resultados que pueden ser relacionados con la reducción del crecimiento micelial reportado en este mismo estudio. La explicación se describe a continuación.

Los resultados obtenidos variaron en un rango de 94.45-61.05% de inhibición de la esporulación. En cuanto a los tratamientos con los diferentes inductores del sistema de defensa, el mejor resultado en este parámetro se obtuvo con el H_2O_2 ($93.89 \pm 0.7\%$), empleando el extracto a concentración media (30% v/v), pero sin presentar diferencias significativas positiva entre este mismo tratamiento y los obtenidos mediante la aplicación de los demás inductores tanto a concentración media como alta.

Contrariamente a lo esperado, no en todos los casos al aumentar la concentración de metabolitos secundarios tuvo un efecto positivo sobre la inhibición de la esporulación. Si bien, existió una disminución del crecimiento micelial con respecto a al aumento de la concentración de metabolitos secundarios, no se observó una disminución de la esporulación de acuerdo a la reducción micelial; tales resultados son atribuibles a la relación inversa entre tasa de crecimiento y la esporulación que ha sido reportada con anterioridad (Dahlberg y Etten, 1982). Una posible explicación para el fenómeno en relación a los compuestos fenólicos, es la capacidad de algunos para limitar la formación de ATP (Wulandari y cols., 2009, Braun y cols., 2011). Se ha establecido que las condiciones nutrimentales escasas favorecen la esporulación, teorizándose la existencia de sensores que indican el estado de los nutrientes en la célula, por lo que la limitación de ATP y los cambios en la permeabilidad de membrana podrían simular “un medio con escasas de nutrientes” (Özcan y cols., 1996, Roncal y Ugalde 2003).

Cuadro 7.4. Inhibición de la esporulación (esp/mL) bajo los diferentes tratamientos.

Elicitor	Concentración	%IE ¹
Controles		
Control (-)	NA	0±5.84 h
Azoxystrobin (Control +)	Establecida	39.6±5.96 g
Preformados	15% v/v (0.54 mg/mL)	65.02±5.73 e,f
Preformados	30% v/v (1.08 mg/mL)	86.04±1.28 a,b,c
Preformados	50% v/v (1.8 mg/mL)	86.14±0.7 a,b,c
Tratamientos 15% v/v (0.54 mg/mL)		
Acemananos		73.17±2.69 c,d,e,f
Ácido Salicílico		61.39±1.99 f
Inulina		88.68±1.05 a,b
Fructanos		78.05±4.67 b,c,d,e
Metil Jasmonato		71.62±1.17 d,e,f
Peróxido de hidrógeno		61.06±6.08 f
Quitosano		84.55±0.12 a,b,c,d
Tratamientos 30% v/v (1.08 mg/mL)		
Acemananos		89.11±0.23 a,b
Ácido Salicílico		89.44±1.17 a,b
Inulina		90.43±0.23 a,b
Fructanos		87.52±0.58 a,b
Metil Jasmonato		93.8±0.35 a
Peróxido de hidrógeno		93.89±0.7 a
Quitosano		92.74±0.23 a
Tratamientos 50% v/v (1.8 mg/mL)		
Acemananos		87.79±0.47 a,b
Ácido Salicílico		69.64±2.8 e,f
Inulina		93.07±0.93 a
Fructanos		89.17±1.99 a,b
Metil Jasmonato		90.76±0.47 a,b
Peróxido de hidrógeno		88.68±1.05 a,b
Quitosano		91.75±0.93 a,b

Los valores representan la media ± desviación estándar (n=3). Las diferentes letras muestran las diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a la prueba Tukey (p<0.05). Inhibición de esporulación (%IE)¹: Porcentaje de esporulación en relación al control negativo.

Para ofrecer una posible explicación a la limitación del proceso de conidiación en *C. gloeosporioides* por parte de compuestos del tipo fenólico, es necesario establecer que la producción de esporas en *Colletotrichum* sp. implica la diferenciación del compartimento apical en una célula reproductora especializada llamada fialida, la cual sufre sucesivas divisiones mitóticas, cada una de las cuales da como resultado una espora (Leandro y cols., 2002; Roncal & Ugalde, 2003). Entre los mecanismos antifúngicos ya mencionados que tienen los compuestos fenólicos, se tiene la interacción con componentes de membrana llevando al colapso de las hifas vegetativas que se diferenciarán en filias para la producción de los conidios (Toyoshima y cols., 1994, Moreno y cols., 2006; Ilk, Saglam, & Özgen, 2017). Tomando en cuenta lo anterior, son explicables las diferencias entre los %IE de los tratamientos con metabolitos secundarios y los obtenidos con el control positivo (que no ocasiona colapso de hifas, pero sí el estrés).

En algunos casos, la activación de los mecanismos de defensa de los seres vivos se activan hasta un punto específico de daño (Chassot y cols., 2007), escases de nutrientes o concentración de ciertos compuestos (Roncal & Ugalde, 2003). Contrastado lo anterior con los resultados obtenidos en la presente sección, encontramos que hasta cierto punto la inhibición del crecimiento micelial reduce la esporulación del patógeno, sin embargo, una alta inhibición o bien la alta presencia de compuestos antifúngicos activan los mecanismos de defensa del patógeno promoviendo la esporulación, como es observado respectivamente con los tratamientos de fructanos ($78.05 \pm 4.67\%$) y quitosano (84.55 ± 0.12) y con el control positivo del azoxystrobin (39.6 ± 5.96).

Para el control de hongos del género *Colletotrichum* se ha estudiado el efecto de extractos vegetales y los compuestos fenólicos presentes en ellos, obteniendo en trabajos como el de Urdaneta y cols., (2013) índices de esporulación de hasta el 94.69% empleando la concentración de 2% de un extracto etanólico de *G. sepium*, equivalente en términos de extracción a 64.88% v/v .

En el trabajo de tesis de licenciatura de Carranza-Arévalo en 2017 donde se estudió el efecto de diversos extractos vegetales (85% v/v) sobre *Colletotrichum* spp., obteniendo

valores máximos de inhibición de la esporulación de 65.45% y mínimos de 7.92% propios de los extractos vegetales de lavanda y ortiga respectivamente.

7.1.4 Germinación de esporas (%G) obtenidos mediante la aplicación de los tratamientos.

El análisis de los datos (Cuadro 7.5), muestra que existe diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los porcentajes de germinación en la mayoría de los tratamientos y los resultados obtenidos con el control negativo ($21.80 \pm 4.25\%$), con excepción del tratamiento con peróxido de hidrógeno a concentración alta ($18.53 \pm 3.43\%$). Además, no se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) positivas entre el control positivo ($1.23 \pm 2.13\%$) y los tratamientos, mismo caso que el control con compuestos preformados del epicarpio del aguacate. En cuanto al porcentaje de germinación, los mejores resultados se obtuvieron al usar los extractos en baja concentración, llegando a un %G de hasta el 0 ± 0 .

En cuanto al porcentaje de germinación, los mejores resultados se obtuvieron al usar los extractos en baja concentración, insinuando la presencia de compuestos que inducen la germinación en los extractos, como es el caso de las ceras epicuticulares del epicarpio, sin ser observables diferencias significativas ($p < 0.05$) contra la mayoría de los tratamientos a otras concentraciones. Es posible observar un marcado aumento de la germinación al utilizar peróxido de hidrógeno como inductor y la concentración alta de extracto, llegando a ser incluso equiparable con el control negativo, hecho que podría respaldar lo planteado en el trabajo de tesis de maestría de Xoca-Orozco (2017), en el que teoriza que el peróxido de hidrógeno induce la síntesis de distintos metabolitos secundarios a los producidos con otros inductores. Además, se conoce que la acumulación de ROS puede provocar la muerte de celular (Apel & Hirt, 2004) y la posterior liberación del material celular.

Cuadro 7. 5 Porcentajes de germinación (%) de esporas de *C. gloeosporioides* para los tratamientos.

Porcentajes de Germinación (%) de esporas de <i>C. gloeosporioides</i> para los tratamientos		
Elicitor	Concentración	%IG ¹
Control (-)	Controles	
	NA	0±19.52 g
Azoxystrobin (Control +)	Establecida	94.36±9.8 a,b
Preformados	15% v/v (0.54 mg/mL)	67.39±29.9 a,b,c,d,e
Preformados	30% v/v (1.08 mg/mL)	64.82±13.16 a,b,c,d,e
Preformados	50% v/v (1.8 mg/mL)	50.83±11.08 d,e,f
	Tratamientos 15% v/v (0.54 mg/mL)	
Acemananos		100±0 a
Ácido Salicílico		100±0 a
Inulina		97.02±5.19 a,b
Fructanos		100±0 a
Metil Jasmonato		100±0 a
Peróxido de hidrógeno		54.17±7.76 c,d,e,f
Quitosano		100±0 a
	Tratamientos 30% v/v (1.08 mg/mL)	
Acemananos		78.62±0 a,b,c,d
Ácido Salicílico		78.62±0 a, b,c,d
Inulina		74.13±7.79 a,b,c,d
Fructanos		74.4±7.35 a,b,c,d
Metil Jasmonato		78.62±0 a,b,c,d
Peróxido de hidrógeno		56.83±13.15 b,c,d,e,f
Quitosano		69.54±5.09 a,b,c,d,e
	Tratamientos 50% v/v (1.8 mg/mL)	
Acemananos		63.58±0 a,b,c,d,e
Ácido Salicílico		63.58±0 a,b,c,d,e
Inulina		63.58±0 a,b,c,d,e
Fructanos		63.58±0 a,b,c,d,e
Metil Jasmonato		63.58±0 a,b,c,d,e
Peróxido de hidrógeno		15±15.74 f,g
Quitosano		60.64±8.34 a,b,c,d,e

Los valores representan la media ±desviación estándar (n=3). Las diferentes letras muestran las diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a la prueba Tukey (p<0.05). Inhibición de la germinación (%IG)¹: Porcentaje de esporas germinadas en relación al control negativo.

Asimismo, la presencia de algunos de los componentes de la célula en el medio, sobre todo los producidos por el daño oxidativo, podrían simular para el patógeno una herida, aumentar la concentración de nutrientes o proporcionar una señal para la germinación, explicando los efectos observados a las concentraciones más altas y sobre todo con la aplicación de H₂O₂. Ejemplo de lo anterior es que se ha identificado que algunos compuestos con longitudes características de alcoholes primarios de cadena larga (C24-C32) de frutos de aguacate, estimulan la formación del apresorio en esporas de *C. gloeosporioides* (Kerstiens, 1996).

Además de posibles compuestos inductores de la germinaciones, los extractos vegetales estudiados en la presente tesis contienen compuestos del tipo fenólico que cuentan con una amplia gama de mecanismos antifúngicos, algunos de los cuales han sido mencionados con anterioridad, como son: la interferencia con la formación de ATP (Yahyazadeh y cols., 2008, Avello-Lorca y cols., 2012), la inhibición de la actividad enzimática (Gamble y cols., 2000; Veloz-García y cols., 2010) o el daño a membranas (Toyoshima y cols., 1994, Moreno y cols., 2006), sin embargo, otra posible explicación para la reducción de la germinación de las esporas del patógeno, podría ser la inhibición de la proteína CaMK (KN93), la cual afecta la formación del apresorio y es inhibida mediante la utilización de compuestos quelantes (Kim y cols., 1998), siendo esta una de las propiedades de los compuestos fenólicos (Gutiérrez-Guerrero, 2008).

El efecto de extractos vegetales ya ha sido estudiado como una alternativa al uso de pesticidas para el control de la germinación de esporas de *Colletotrichum* sp., Carranza-Arévalo (2017) reportó valores máximos de %G de 86,75 % y mínimos de 44,17%, al aplicar los extractos vegetales de ortiga y lavanda, respectivamente. Por su parte, Veloz-García y cols., (2010) evaluaron la actividad antifúngica de extractos de cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) a una concentración 350 µg/mL, sobre *Colletotrichum lindemuthianum*, observando %G superiores al 60%, es decir 40% de inhibición de la germinación. Los resultados obtenidos por Veloz-García y cols., (2010) son atribuidos a la presencia de compuestos fenólicos en el extracto.

Por último, Xoca-Orozco y cols., (2018) aplicaron extractos metabólicos provenientes del tejido de epicarpio inducido y no inducidos de frutos de aguacate Hass, en madurez

intermedia, sobre esporas de *C. gloeosporioides*, sin encontrar diferencias significativas entre los %G obtenidos por tratamientos a la concentración más similar a la estudiada en el presente trabajo de tesis (2 mg/mL), lo que respaldaría la premisa de la existencia de compuestos antifúngicos preformados en el fruto del aguacate capaces de reducir el parámetro estudiado.

Además de los compuestos fenólicos, la presencia de otros metabolitos secundarios previamente identificados en el fruto, como es el caso del 1-acetoxi-2-hidroxi-4-oxo-heneicosano 12, 16 dieno, están relacionados con la inhibición de la elongación del tubo germinativo de la espora debido a la similitud del metabolito con la estructura del ácido linoleico, pudiendo remplazarlo en la síntesis de glicéridos, siendo estos importantes señales químicas para el proceso de germinación (Prusky y cols., 1991, Ardi y cols., 1998).

7.1.5 Efecto fungicida vs fungistático de extractos de metabolitos secundarios

En las Figuras 7.2 y 7.3 se muestran los resultados de las pruebas para discernir si los tratamientos tienen un efecto fungicida o fungistático. En la Fig.7.2 se muestra el resultado del desarrollo del micelio de hongo resembrado, es decir, al recuperar una muestra de micelio crecido en presencia de metabolitos sembrado en un medio en ausencia de éstos; y en la Fig.7.3 se muestran las esporas de *C. gloeosporioides* resembradas después del estudio de germinación. Estos resultados muestran un claro efecto fungistático, que los metabolitos extraídos del epicarpio son capaces de limitar el crecimiento y desarrollo del hongo mientras están presentes, pero una vez retirados (Fig. 7.2 y 7.3 C), el hongo vuelve a desarrollarse de manera similar al control negativo tanto en micelio (Fig.7.2 B) como en espora (Fig.7.3 B), siendo poco favorable para el control del patógeno.

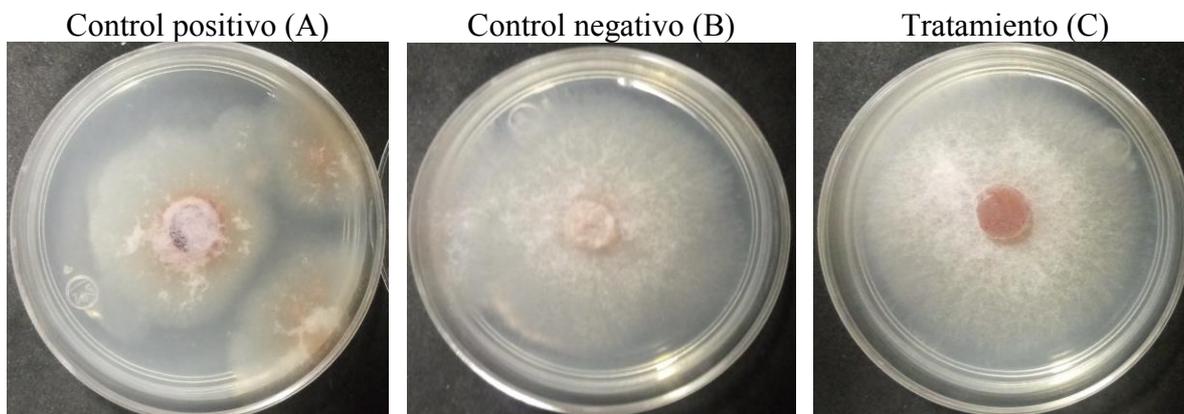


Figura 7.2 Efecto fungicida vs fungistático en el micelio. A- Control positivo de azoxystrobin, B- Micelio de hongo sin exposición al extracto, C- Fragmento de micelio extraído del tratamiento con metabolitos secundarios (30% v/v) sintetizados a partir de la utilización de inulina como inductor.

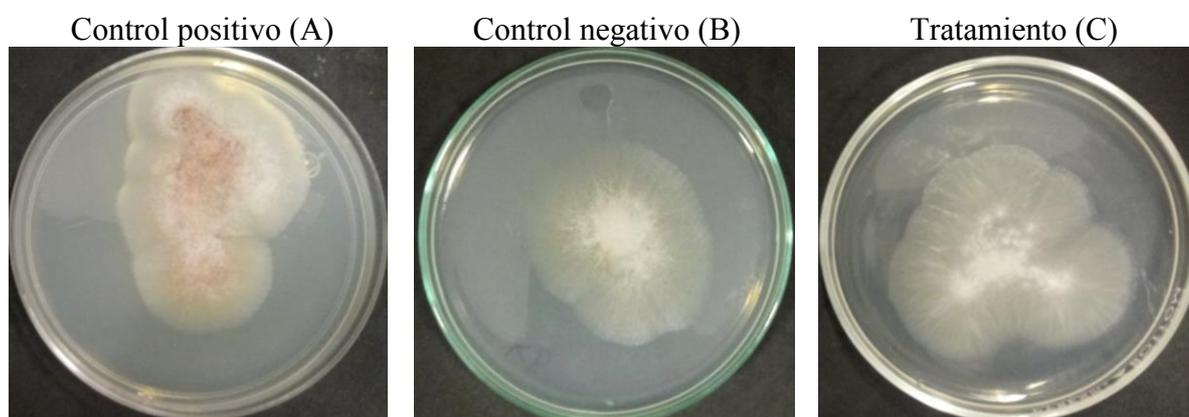


Figura 7.3 Efecto fungicida vs fungistático en esporas. A- Control positivo de azoxystrobin, B- Esporas del hongo sin exposición al extracto, C- Esporas expuestas al tratamiento con metabolitos secundarios (30% v/v) sintetizados a partir de la utilización de inulina como inductor.

Los resultados del presente experimento son respaldados por lo reportado por Vio-Michaelis y cols., (2012), los cuales estudiaron el efecto antifúngico *in vitro* de extractos metanólicos y etanólicos de las plantas *Ephedra breana*, *Fabiana imbricata* y *Nolana sedifolia* contra *Botrytis cinérea*, observado un efecto fungistático durante 14 días desde la aplicación inicial. Los resultados fueron atribuidos a la presencia de compuestos

fenólicos como son el ácido clorogénico, ácido cinámico, ácido *p*-cumárico, ácido ferúlico, vanillina, ácido vanílico, rutina, ácido cafeico, ácido 3, 4-hidroxibenzoico, ácido 3, 4-dimetoxicinámico (dimetil éster del ácido cafeico) y ácido protocatéuico, siendo algunos previamente identificados en el fruto de aguacate por Contreras-Gutiérrez y cols., (2013).

Además, el efecto fungistático otorgado por compuestos fenólicos sobre hongos fitopatógenos ha sido identificado en trabajos como los de Aquino y Santander (2009), Asmad (2015) e Iturbide-Zuñiga y cols., (2017), respaldando los resultados obtenidos en el presente trabajo.

Para el control positivo de azoxystrobin, se observó un cambio morfológico tanto en el desarrollo del fragmento del micelio (Fig.7.2 A) como en el desarrollo de las esporas (Fig.7.3 A) expuestas al mismo, aunado a la disminución del crecimiento micelial, nos indica que tal modificación puede ser atribuible al mecanismo de acción del fungicida, el cual interfiere en la transferencia de electrones en la cadena respiratoria, llevando a la consecuente disminución en la formación de ATP, causando cambios morfológicos propios de situaciones de estrés por escasas de nutrientes (Syngenta, 2020).

El cambio morfológico tanto en micelio como espora, podría deberse a un proceso de melanización, este es un proceso natural en *Colletotrichum*, sin embargo, el patógeno también produce el pigmento como mecanismo de defensa (Urán & Cano, 2008). Para explicar la falta de melanización en los tratamientos con metabolitos del epicarpio, aun teniendo como parte de sus mecanismos antifúngicos la limitación de ATP, podríamos considerar, de nuevo, como posible explicación la inhibición de la proteína CaMK (KN93), la cual, también modula la melanización y, como se mencionó con anterioridad, es inhibida mediante la utilización de compuestos quelantes (Kim y cols.,1998), siendo esta una de las propiedades de los compuestos fenólicos (Gutiérrez-Guerrero, 2008)

7.2 Efecto antifúngico *in vivo* de fracciones de metabolitos secundarios producidos por elicitación del sistema de defensa del fruto

De las pruebas de determinación de sólidos para el ajuste de las concentraciones, se determinó que la fracción permeada tendría una concentración de 75.4% v/v y la retenida 9.9 % v/v, mismas que se mantuvieron para los posteriores análisis.

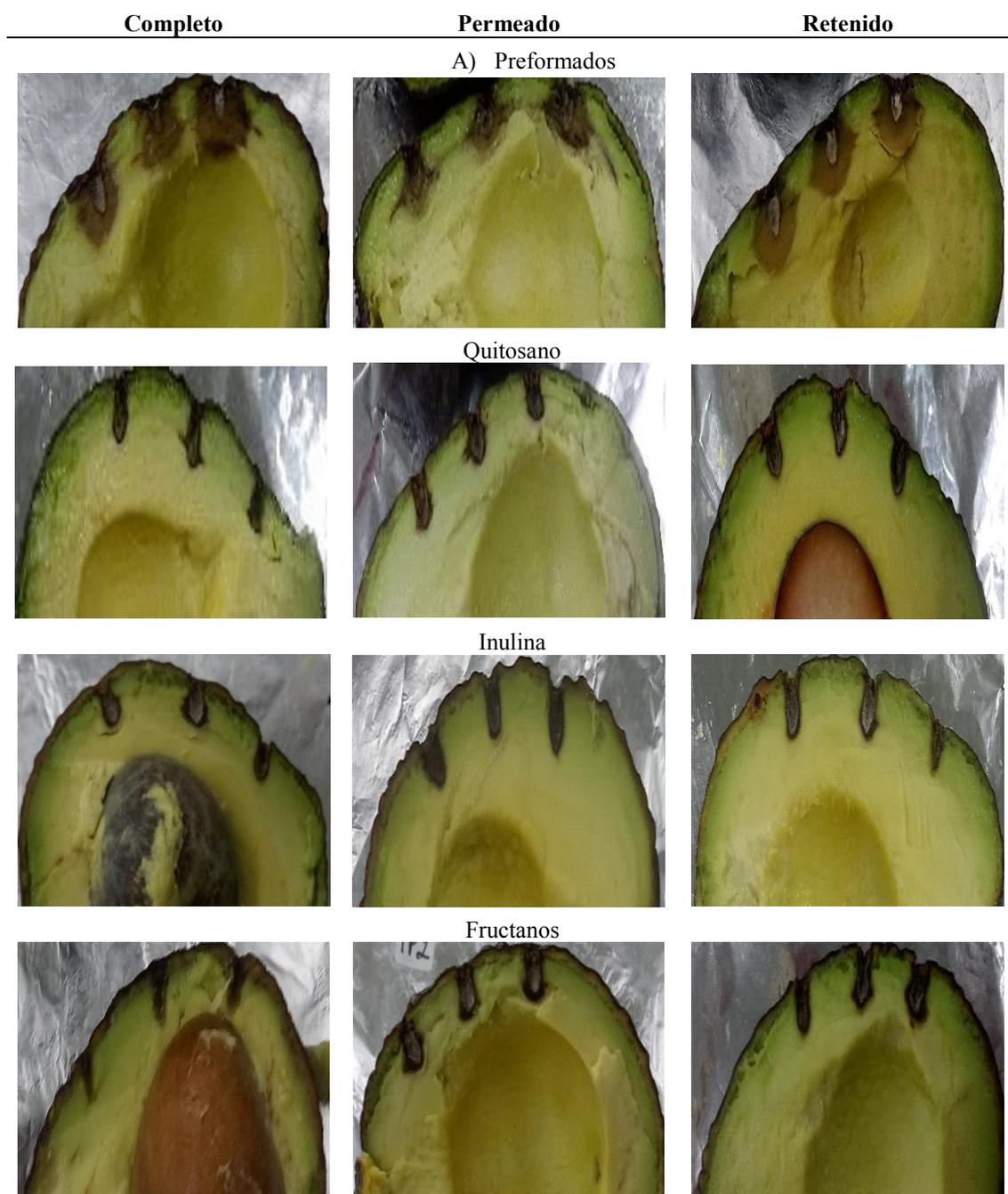
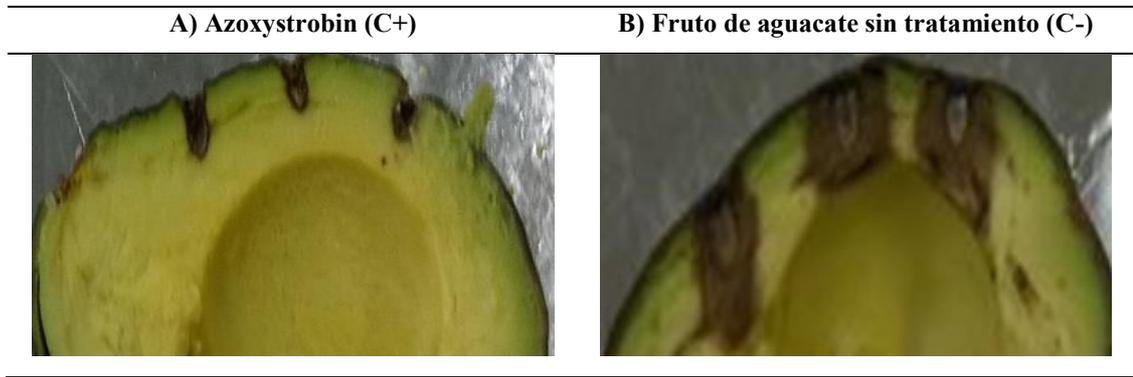
El fraccionamiento de los extractos de metabolitos secundarios se realizó con el objetivo de mejorar la actividad antifúngica de los extractos al concentrar en alguna de las fracciones aquellos con alta actividad antifúngica. Las fracciones obtenidas fueron aplicadas sobre frutos de aguacate en madurez fisiológica y posteriormente inoculados con 20 μ L de una solución de esporas del patógeno a una concentración de 1×10^6 . Los resultados correspondientes a las pruebas *in vivo*, 8 días después de la inoculación, se presentan en el Cuadro 7.6, en la Fig.7.4 y en el Anexo 10.2.

La fracción del extracto que obtuvo mayor efecto para el control de la antracnosis, fue el obtenido de los frutos al aplicar el inductor quitosano perteneciente a la fracción retenida (0.11 ± 0.16) (Fig.7.4 C). Al comparar los diámetros de las lesiones resultantes del desarrollo del patógeno, se observan diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre todos los tratamientos y el control negativo, es decir, esporas de *C. gloeosporioides* inoculadas en aguacates sin tratamiento (9.85 ± 0.61) (Fig.7.4 B). Además, fue posible observar diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los diámetros de las lesiones de los frutos tratados con fracciones de metabolitos secundarios preformados y los obtenidos al aplicar la misma fracción de metabolitos inducidos (retenida, permeada y completa) (Fig.7.4 C), con excepción de los metabolitos inducidos al aplicar FAAGP en la fracción de tipo permeado (2.51 ± 1.21), el inductor con los resultados menos favorables en la fase *in vitro* y que se incluyó por interés científico.

Cuadro 7.6 Efecto sobre la disminución de severidad de fracciones de metabolitos secundarios producidos por elicitación del sistema de defensa de fruto.

Tratamiento	Fracción	Diámetro de la lesión (mm)
Patógeno (C-)		9.85±0.61 d
Azoxystrobin (C+)		1.23±1.91 a
Preformados	C	5.63±3.49 b, c
	R	8.6±1.72 d, c, d
	P	6.04±1.22 b, c, d
Quitosano		Quitosano
	C	0.31±0.46 a
	R	0.11±0.16 a
Fructanos	P	1±0.17 a
		Fructanos
	C	0.64±0.28 a
Fructanos	R	0.85±0.62 a
	P	2.51±1.21 a, b
	Inulina	
C		0.95±1.13 a
R		0.39±0.38 a
Acemananos	P	0.61±0.17 a
		Acemananos
	C	0.4±0.08 a
Acemananos	R	1.7±0.63 a
	P	0.35±0.57 a

Los valores representan la media ±desviación estándar (n=3). Las diferentes letras muestran las diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a la prueba Tukey (p<0.05).



Continúa Figura 7.4



Figura 7.4 Efecto de fracciones de metabolitos secundarios producidos por elicitación del sistema de defensa de fruto en la severidad de antracnosis. A) Control positivo aplicando de azoxystrobin; B) Control negativo, frutos sin la aplicación de metabolitos; C). Frutos aplicando fracciones de metabolitos secundarios preformados y obtenidos mediante la aplicación de los inductores.

Por su parte, la aplicación de las diferentes fracciones de metabolitos secundarios no mostró diferencias significativas entre las fracciones obtenidas, llegando a la conclusión de que un proceso de fraccionamiento, a las condiciones estudiadas, no aumenta la capacidad antifúngica de los extractos, hecho que puede ser atribuido a la presencia de compuestos con actividad antifúngica en ambas fracciones. En el fruto del aguacate se han identificado gran variedad de compuestos del tipo fenólico y no fenólico con actividad antifúngica, desde compuestos de bajo peso molecular como el ácido p-cumárico o el ácido cafeico, hasta glucósidos de quercetina, dímeros de procianidina o rutina, los cuales son de alto peso molecular (Rosero y cols., 2019) y que también cuentan con actividad antimicrobiana (Sombra-Arguielles, 2019).

Tampoco fue posible observar diferencias estadísticamente significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos y el control positivo (azoxystrobin) (1.23 ± 1.91), los resultados demuestran que la aplicación de extractos de metabolitos secundarios, si bien, no lograron superar los resultados obtenidos mediante la aplicación de un pesticida comercial, podrían ser una posible alternativa para el control de la antracnosis.

Los resultados obtenidos con el control positivo pueden ser comparados con los obtenidos por Gutiérrez-Alonso y Gutiérrez-Alonso (2003), en los que se reporta una eficacia del 74.19% para el control del mismo patógeno en frutos de guayaba (*Psidium*

guajava L.) por parte del azoxystrobin, mientras que en el presente trabajo se observó una eficacia del 87.51% para el control de la severidad de la enfermedad causada por el mismo patógeno, las diferencias encontradas pueden ser atribuidas al tipo fruto y a la resistencia de la cepa estudiada.

El efecto de los extractos de metabolitos secundarios y sus fracciones sobre el fruto pueden ser atribuidos a un efecto inductor por parte de algunos metabolitos secundarios, como son los compuestos fenólicos, mismos efectos que son previamente observados en trabajos como el trabajo de tesis de Verde-Yáñez (2017) en que se observó que la aplicación de un extracto de *Moringa oleífera* en el medio extracelular de suspensiones celulares de *Capsicum annuum* var. *annuum* es capaz de aumentar significativamente la concentración de compuestos fenólicos en las células a partir de las 72 h de aplicación a concentraciones de 0.25 y 0.75 mg/mL. Por su parte, Malick y cols., (2016) reporta que la aplicación de vapores de aceite de tomillo a una concentración de 1% sobre frutos de aguacate (*Persea americana* Mill.) de las variedades Hass y Ryan, aumenta la actividad de enzimas PR como la β -1,3-glucanasa y la quitinasa e induce la expresión de genes que codifican para las mismas enzimas en el fruto. En este mismo trabajo se observó que el tratamiento logró disminuir la severidad de las lesiones causada por *C. gloeosporioides* de 25 a 8 mm.

Durante el presente documento se estableció el papel de la resistencia sistémica inducida y adquirida como las principales rutas de señalización para la defensa del fruto, sin embargo, existen otros mecanismos de resistencia independientes a las señales de SA, ET y JA, tal es el caso del aumento en la expresión de los genes LTP, PER y PI (Chassot y cols., 2007), los cuales están relacionados a diversos procesos como son el entrecruzamiento de ácidos fenólicos (McLusky y cols., 1999), formación de las capas de cutina y suberina (Heredia, 2003), lignificación, inhibición del crecimiento de hongos, desintoxicación de H_2O_2 y las respuestas a heridas y a patógenos (Tognolli y cols., 2002), por lo que no se debe descartar rutas de señalización alternas con efecto sinérgico.

Para comparar el efecto de un tratamiento con inductores contra la aplicación de metabolitos secundarios producidos mediante la inducción del sistema de defensa, sobre

el fruto de aguacate (*Persea Americana*), es conveniente comparar con el trabajo de tesis de Xoca-Orozco (2017), en que utilizando metil jasmonato (0.1 mM), peróxido de hidrógeno (1% v/v), ácido salicílico (2 mM) y quitosano (1.5% v/v), se consiguieron reducciones del desarrollo del patógeno superiores al 80%. Las diferencias entre ambos resultados pueden ser atribuidas al estado de madurez del fruto (intermedia y fisiológica, respectivamente) y al posible doble efecto que pueden tener los compuestos fenólicos, al intervenir directamente con el desarrollo del patógeno y a la posibilidad de que actúen como inductores del sistema de defensa por sí mismos.

La presencia de compuestos fenólicos en extractos vegetales y sus efectos sobre agentes patógenos ya ha sido establecida e incluso evaluada individualmente, teniendo como ejemplo los resultados mostrados por Xu y cols., (2018), demostrando que algunos compuestos como la naringenina, cumarina, resveratrol, ácido ferúlico, piceatannol y pterostilbeno cuentan con actividad antifúngica *in vivo*, logrando reducir las lesiones causadas por *B. cinérea* en uvas de 14 mm a 0 mm (% de reducción de la severidad del 21.43%), utilizando 1 mg/mL de cada compuesto individual, transcurridos 6 días desde la inoculación. Comparando los resultados obtenidos por los compuestos individuales previamente identificados en el aguacate variedad Hass, es decir, naringenina, cumarina y ácido ferúlico (Di Stefano y cols., 2017), con los obtenidos por el extracto completo estudiado en el presente trabajo de tesis, se demuestra que el efecto antifúngico de los extractos no es producto de un solo compuesto antifúngico.

Los extractos vegetales ya han sido estudiados como alternativa para el control *in vivo* de patógenos como el *C. gloeosporioides*. Bolívar y cols., (2009), utilizaron extractos etanólicos vegetales, a una concentración equivalente del 6.73%, sobre frutos de mango (*Mangifera indica* L.), obteniendo una reducción máxima del diámetro de la lesión del 37.1% comparando con los resultados obtenidos en el presente trabajo de tesis, es decir, en una reducción máxima de la severidad del 98.99% observamos valores superiores, atribuibles a las concentraciones, componentes de los extractos y frutos estudiados. Los efectos de los extractos fueron atribuidos la presencia metabolitos secundarios como alcaloides, aceites esenciales, polifenoles, taninos, saponinas, antraquinonas y flavonoides, que también podrían estar presentes en los extractos estudiados (Aymacaña-Albán, 2018).

Para validar un efecto antifúngico directo por parte de los compuestos fenólicos es necesario establecer que la difusión de un compuesto se da en función de ciertas propiedades como el tamaño, forma, polaridad, concentración, etc. En el caso de la difusión de sustancias como compuestos fenólicos al interior del fruto del aguacate, el cual cuenta con una cutícula que es particularmente gruesa, se tendría que considerar que no es una capa totalmente homogénea y que cuenta con accesos como fracturas y lenticelas (Schroeder, 1950). Además, existen estudios utilizando cutículas extraídas tanto de plantas como frutos que confirman que compuestos orgánicos como el ácido silícico, el ácido benzoico y el ácido 2,4-dichlorophenoxyacetico son capaces de difundir en la cutícula siguiendo la misma ruta que el agua (Niederl y cols., 1998).

Si bien, la aplicación de extractos vegetales se perfila como una alternativa para el control de patógenos en postcosecha, al ser competitivo con un fungicida comercial, los compuestos presentes en el extracto son sensibles a las condiciones ambientales, para la práctica deberían combinarse con recubrimientos, ser encapsulados, o bien, ser estabilizados en emulsiones previo a su aplicación, como se ha mostrado en trabajos como los de Yuan y cols., (2016), Escudero-Jami y cols., (2019), González-Guevara y cols., (2019) y Saltos-Mendoza y cols., (2019).

7.3 Cuantificación de fenoles totales e identificación parcial de los compuestos fenólicos

7.3.1 Cuantificación de fenoles totales

Los compuestos fenólicos como se ha comentado, presentan poder antifúngico y en algunos casos se les ha atribuido un efecto inductor, por ello en el presente trabajo se consideró evaluar la concentración de estos compuestos en cada una de las fracciones de los extractos de metabolitos secundarios.

Con el objetivo de contrastar los resultados obtenidos con estudios anteriores podemos tomar como referencia lo reportado por Wang y cols., (2010), los cuales determinaron un valor de 12.6 ± 0.3 mg GAE/g para epicarpio de frutos de aguacate en madurez de consumo, las diferencias entre ambos valores pueden ser explicadas de acuerdo a lo establecido por Villa-Rodríguez y cols., (2011), estudio en el que se relaciona el

contenido de fenoles con los estadios de maduración del fruto, encontrando un mayor contenido fenólico en las últimas etapas de maduración con respecto al estadio intermedio en el cual se realizaron las extracciones metabólicas.

Cuadro 7.7- Concentración de fenoles totales presentados por las fracciones estudiadas.

Tratamiento	Fracción	Concentración ¹ mg GAE/g
Preformados	C	8.72±0.55 d
	R	11.47±0.17 c
	P	9.01±0.25 d
Quitosano	C	19.66±0.76 a
	R	16.29±0.43 b
	P	19.65±0.13 a
Inulina	C	20.15±0.45 a
	R	15.29±0.15 b
	P	15.98±1.1 b

Los valores representan la media ±desviación estándar (n=3). Las diferentes letras muestran las diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a la prueba Tukey (p<0.05). ¹ mg GAE/g: mg equivalentes de ácido gálico (*GAE*) por g de epicarpio.

Uno de los fenómenos más observados como producto de un proceso de elicitación es el aumento del contenido de compuestos fenólicos en el fruto debido a la activación de determinadas rutas metabólicas (Fig.7.5) (Vargas y cols., 2014; Chen y cols., 2015; He y cols., 2017), por lo tanto, analizar el contenido de este tipo de compuestos es un excelente punto de partida para el estudio de un presunto proceso de inducción.

Para explicar el aumento en la concentración de compuestos fenólicos presentes en los extractos, se puede tomar como referencia el estudio presentado por Xoca-Orozco y cols., (2018), en el que se observó que la aplicación de quitosano sobre frutos de aguacate Hass, en madurez intermedia, induce la expresión de los genes *pal1*, *chs* y *4cl*, los cuales están relacionados con la ruta de los fenilpropanoides al ser traducidos en las enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), chalcona sintasa (CHS) y 4-coumarato-CoA ligasa (4CL), respectivamente. En este mismo estudio se identificó un aumento en la

expresión del gen *avfae* que codifica para una elongasa de ácidos grasos relacionada con la síntesis de persina, un metabolito secundario, no fenólico, relevante para la defensa del fruto.

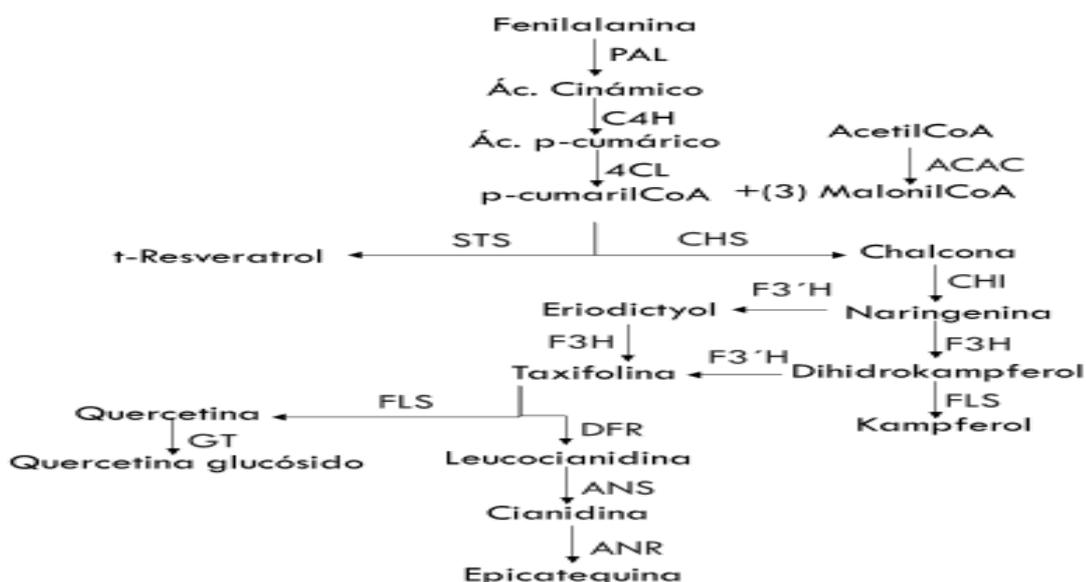


Figura 7.5 Principales rutas metabólicas relacionadas con compuestos del tipo fenólico que son activadas por procesos de inducción (Ruiz-García, 2014). ACAC: acetil-CoA carboxilasa; PAL: fenilalanina amonio liasa; C4H: cinamato 4 hidroxilasa; 4CL: 4 cumarato ligasa; STS: estibeno sintasa; CHS: chalcona sintasa; CHI: chalcona isomerasa; F3'H: flavonoide 3'-hidroxilasa; FLS: flavonol sintasa; GT: glucosil transferasa; DFR: dihidroflavonol 4-reductasa; ANS: antocianidina sintasa; ANR: antocianidina reductasa.

La síntesis de compuestos no fenólicos como parte de la respuesta a un proceso de inducción, nos permite explicar y relacionar los resultados obtenidos con los de las fases *in vitro* e *in vivo*, al establecer, el efecto conjunto de los metabolitos presentes en los extractos podría no estar únicamente dado por compuestos del tipo fenólico. Es decir, el aumento en la concentración de compuestos fenólicos explica los resultados positivos obtenidos en la fase *in vitro*, pero el efecto casi nulo de las fracciones preformados en la fase *in vivo* abre la puerta a la posibilidad de que el efecto se deba en parte a la presencia de compuestos no fenólicos, o bien, a que la presencia de metabolitos inducidos hasta

ciertas concentraciones se perciba como una advertencia de peligro y se produzca una respuesta sistemática semejante.

Al observar el efecto del quitosano como inductor en otros frutos modelos, se ha demostrado que su aplicación en pera (*Pyrus pyrifolia* L. cv. Xuehua) incrementa la actividad de las enzimas PAL, polifenol oxidasa (PPO) y peroxidasa (POD) (Meng y cols., 2010).

La aplicación de quitosano sobre distintos frutos modelos ha demostrado tener un efecto benéfico sobre el contenido de compuestos fenólicos. La utilización de recubrimientos de quitosano al 1.8% p/v sobre frutos de naranjas (*Citrus sinensis*) logró aumentar en un 7.1% el contenido de fenoles en el jugo de los frutos con respecto al control (Contreras-Oliva y cols., 2012). Por su parte, Barrientos-Carvacho y cols., (2014) reportan que la aplicación de quitosano (10 $\mu\text{mol/L}$) sobre brotes de brócoli (*Brassica oleracea* var. Italica) aumentó significativamente el contenido de fenoles (18.61 ± 1.2 mgGAE/g), correspondiente a un aumento del 52% en comparación con los brotes de control. Por último, Baque y cols., (2012) aplicaron quitosano (0.2 mg/mL) sobre cultivos de raíz de *Morinda citrifolia* (L.), observando un aumento significativo del contenido de fenoles (24.19 ± 0.023 a 48.57 ± 0.187 mgGAE/g), equivalente al 200.07%.

En caso del mecanismo de inducción por parte de la inulina, lamentablemente no existen estudios tan completos, sin embargo, compuestos similares han demostrado tener un efecto positivo sobre la actividad de la enzima PAL, la cual se encuentra ampliamente relacionada con la ruta de los fenilpropanoides (Wang y cols., 2009).

7.3.2 Identificación y relación de áreas de los componentes en los extractos de metabolitos secundarios

La identificación parcial de los compuestos fenólicos presentes en los extractos estudiados mediante HPLC, se llevó a cabo mediante el uso de estándares. Se determinaron los tiempos de retención de cada uno de los estándares empleados (Cuadro 7.8). Al comparar los tiempos de retención observados, se pudo detectar la presencia de epicatequina, naringenina, ácido trans-cinámico, ácido mevalónico, taxifolina y kaempferol, en cada uno de los extractos.

Cuadro 7.8. Tiempos de retención registrados por los estándares estudiados.

Compuesto	Masa molecular (g/mol)	Tiempo de retención (min)
Epicatequina	290.26	8.23
Taxifolina	304.25	9.06
Naringenina	272.257	13.06
Kaempferol	286.23	13.234
Ác. Trans-cinámico	148.1586	13.454
Ác. Mevalónico	148.16	18.62

La presencia de los compuestos identificados en las muestras ya había sido demostrada previamente en trabajos como el de Contreras-Gutiérrez y cols., (2013) y Di Stefano y cols., (2017). Su presencia confirma la existencia de compuestos de carácter antifúngicos en los extractos o bien de compuestos relacionados a la defensa del fruto.

En cuanto a metabolitos con actividad antimicrobiana directa, se puede considerar al kaempferol, la taxifolina, naringenina y el ácido trans-cinámico. Para ejemplificarlo, el kaempferol cuenta con actividad antimicrobiana confirmada contra *Candida parapsilosis*, *Candida orthopsilosis*, *Candida metapsilosis* y *Candida krusei*, causando una disminución de la velocidad metabólica y de la biomasa (Rocha y cols., 2019) y contra *Fusarium oxysporium*, en el cual se observó la inhibición micelial y del crecimiento por extensión de las hifas (Ilk y cols., 2017). Roy y cols., (2018) establecieron un efecto antifúngico sobre *Colletotrichum* spp. por parte del ácido trans-cinámico. Xu y cols., (2018) reportan que la naringenina cuenta con actividad antifúngica *in vivo*, logrando reducir las lesiones causadas por *B. cinérea* en uvas. Finalmente, Ahamad y cols., (2019) determinaron que la taxifolina es capaz de inhibir significativamente el desarrollo de *Streptococcus mutants* en pruebas *in vitro*.

Algunos de los metabolitos secundarios identificados en los extractos son precursores de otros compuestos con actividad antifúngica comprobada, tal es el caso de la epicatequina con la epicatequina-3-*O*- β -glucopiranosido y la epicatequina (2-(3,4-dihroxifenil)-3,4-dihidro-2H-cromeno-3,5,7-trio, y la taxifolina con el 6-(*p*-hidroxibencil) taxifolin-7-*O*- β -D-glucósido, los cuales son capaces de inhibir

significativamente el desarrollo de los hongos *Alternaria alternata* (P.) Keissler, *Aspergillus fumigatus* Fresenius, *Aspergillus niger* van Tieghem, *Macrophomina phaseolina* (Tassi) Goid y *Penicillium citrii*, a partir de una concentración de 100 ppm (Kanwal y cols., 2010).

Otros de los metabolitos identificados son peldaños iniciales de importantes rutas metabólicas como la del Shikimato, para la síntesis de aminoácidos aromáticos y de los fenilpropanoides (ácido trans-cinámico) (Kulik y cols., 2017) y la del mevalonato para la síntesis de isoprenoides (ácido mevalónico) (Tetali, 2019).

Realizando una comparación entre las áreas de los picos pertenecientes a compuestos de interés se obtuvieron los resultados del Cuadro 7.9, calculando las relaciones entre áreas se tomando a la media del control con preformados como la unidad. Se observaron escasas diferencias estadísticamente significativas entre los tratamientos, sin embargo, se observa una mayor acumulación de compuestos que se encuentran corriente abajo en las rutas metabólicas de síntesis de compuestos fenólicos, con excepción del kaempferol. La acumulación de compuestos de interés más positiva con respecto al control con preformados se observó con la epicatequina.

Para explicar la pobre presencia del kaempferol y la alta proporción de epicatequina en los extractos se puede utilizar como referencia a la Fig.7.6 y al trabajo de Xoca-Orozco y cols., (2018), en el que se observó que la aplicación de quitosano sobre frutos de aguacate Hass, en madurez intermedia, induce la expresión de los genes *pal1*, *chs* y *4cl*, que traducen en enzimas fenilalanina amonio liasa (PAL), chalcona sintasa (CHS) y 4-coumarato-CoA ligasa (4CL), respectivamente., sin embargo, en el mismo estudio no se identificó un aumento en la expresión del gen *fls* que se traduce en la enzima flavonol sintasa, la cual es indispensable para la síntesis de kaempferol, la limitada formación de este compuesto sugiere que en la ruta se favorece la síntesis de epicatequina, además, al aumentar la actividad enzimática corriente abajo pudo disminuir la concentración de ácido trans-cinámico, explicando la reducción en la concentración de dicho compuesto. Sin embargo, se necesitarían más estudios para determinar si la acumulación de epicatequina se realiza directamente a partir de la naringenina o logra llegar a dihidrokaempferol.

Cuadro 7.9. Comportamiento de la concentración de los metabolitos secundarios en relación al control.

Extracto completo		Fracción permeada		Fracción retenida	
Epicatequina					
Q	I	Q	I	Q	I
59.91±10.43 a	53.05±2.86 a	4.99±1.89 a	7.76±1.89 a	2.37±0.39 a	2.02±1.24 a
Taxifolina					
22.05±8.31 a	6.2±5.27 a	2.47±1.76 a	3.24±1.35 a	1.21±1.06 a	5.39±5.89 a
Naringenina					
3.66±0.99 a	6.95±2.25 a	0.93±0.04 a	2.03±0 b	124.42±4.37 a,b	234.94±92.93 b
Kaempferol					
0.31±0.07 a	0.33±.01 a	0.86±0.02 a,b	0.35±0.02 a	3.15±0.45 b	1.22±0.25 a
Ác. Trans-cinamico					
0.71±0.1 a	0.8±0.16 a	0.76±0.06 a	0.76±0.02 a	0.95±0.15 a	0.91±0.19 a
Ác. Mevalonico					
0.55±0 a	0.66±0.1 a	0.6±0.01 a	0.58±0.01 a	0.8±0.08 a	0.77±0.13 a

Los valores representan la media ± desviación estándar (n=2). Las diferentes letras muestran las diferencias significativas entre tratamientos de acuerdo a la prueba Tukey (p<0.05). Siendo: I (inulina) y Q (quitosano).

Con respecto a la epicatequina, se ha establecido que el aumento en la activación transcripcional de los genes involucrados en la biosíntesis de epicatequina es paralela a un aumento en la concentración del dieno, uno de los metabolitos secundarios principales en la lucha contra la antracnosis (Prusky y cols., 2000), lo anterior puede ser explicado por la alta actividad antioxidante de la epicatequina (Nabavi y cols., 2013), característica que limita la acción de las lipoxigenasas y permite la acumulación de persina, además, se ha demostrado que la aplicación de inductores como el quitosano produce un aumento en la expresión del gen *avfae* que codifica para una elongasa de ácidos grasos relacionada con la síntesis de persina, (Xoca-Orozco y cols., 2018).

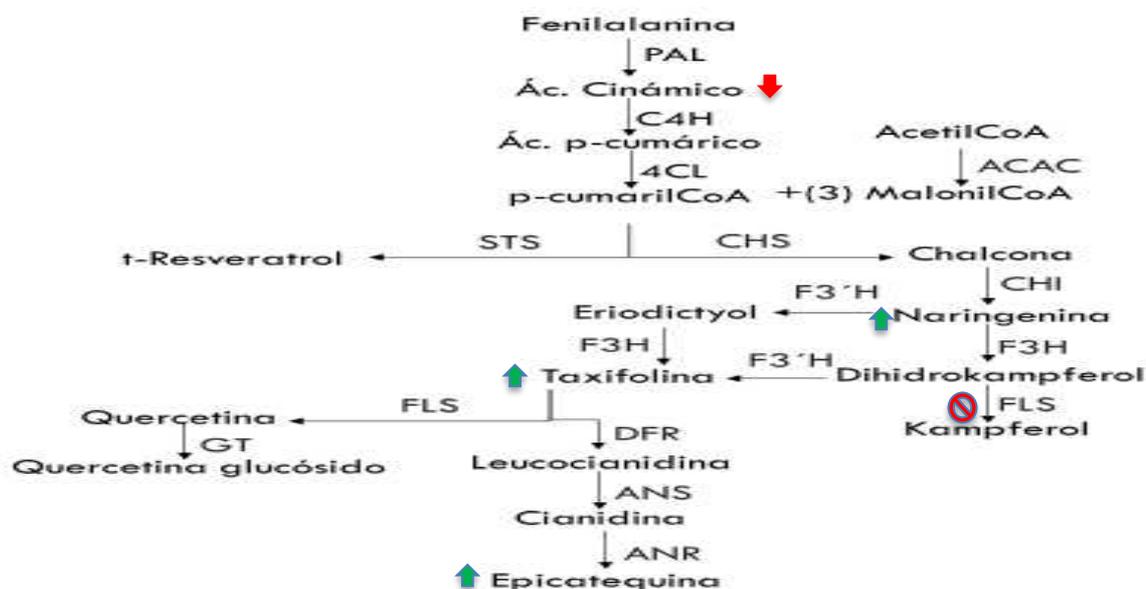


Figura 7.6 Ruta metabólica explicada para frutos inducidos en madurez intermedia de acuerdo a datos cromatográficos (Ruiz-García, 2014). ACAC: acetil-CoA carboxilasa; PAL: fenilalanina amonio liasa; C4H: cinamato 4 hidroxilasa; 4CL: 4 cumarato ligasa; STS: estibeno sintasa; CHS: chalcona sintasa; CHI: chalcona isomerasa; F3'H: flavonoide 3'-hidroxilasa; FLS: flavonol sintasa; GT: glucosil transferasa; DFR: dihidroflavonol 4-reductasa; ANS: antocianidina sintasa; ANR: antocianidinareductasa.

Del análisis de áreas quedan interrogantes muy marcadas, sobre todo las referentes a las fracciones. Hablando del extracto metabólico inducido por quitosano, se observó que la relación de áreas en el extracto completo no se reflejó en las fracciones, una posible explicación es un proceso de colmatación progresivo de la membrana que disminuyó la permeabilidad de la membrana y que pudo reducir el paso de compuestos, lamentablemente no se tomaron anotaciones sobre de la secuencia de los fraccionamientos realizados, pero los resultados sugieren que el extracto metabólico inducido por quitosano pudo ser filtrado después del inducido por inulina, explicando una mayor retención de compuestos, otra posible explicación es un mayor contenido de fibra o proteínas con las que los compuestos fenólicos pudieron asociarse (Velderrain-Rodríguez, 2013), disminuir su paso por la membrana y quedar atrapados sobre la membrana.

En cuanto a las proporciones de áreas de los compuestos estudiados, se observaron semejanzas entre los tratamientos con metabolitos inducidos, lo que indica que el mecanismo de elicitación de compuestos como la inulina, hablando exclusivamente de la ruta de los fenilpropanoides es similar a la del quitosano, sin embargo debido a los resultados obtenidos en este estudio, como perspectiva se recomienda el análisis de la actividad de la enzima chalcona hidrogenasa, debido a que un aumento en ella podría ser la causa del incremento en la concentración de la naringenina en el extracto. Aún se desconoce el papel de los metabolitos no fenólicos presentes en los extractos, por lo que sería conveniente realizar un tamiz bioquímico para identificar metabolitos de otras naturalezas en los extractos.

Si bien, la ultimación de extractos metabólicos inducidos demostró una prometedora capacidad para el control de la antracnosis en el fruto del aguacate, aún queda por investigar la mejor alternativa para la aplicación de los mismos, alternativas entre las que podríamos encontrar la utilización de emulsiones, encapsulados, pulverización con ultrasonido, etc. También queda pendiente la evaluación de otros métodos de fraccionamiento con límites de corte molecular inferiores.

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

CAPÍTULO 8. CONCLUSIONES

El uso de metabolitos secundarios preformados extraídos del epicarpio del aguacate tuvo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) sobre la inhibición micelial, esporulación y germinación del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* aislado de aguacate, con respecto al control negativo.

La aplicación de metabolitos secundarios inducidos y extraídos del epicarpio del aguacate tuvo un efecto estadísticamente significativo ($p < 0.05$) positivo sobre la inhibición micelial, esporulación y germinación del hongo *C. gloeosporioides* aislado de aguacate, con respecto al control negativo y en algunos casos con el tratamiento con metabolitos preformados.

Los inductores más efectivos para la biosíntesis de compuestos antifúngicos en pruebas *in vitro* fueron inulina (80.24 ± 1.82) y acemananos (79.62 ± 1.26), lo que indica que estos compuestos están ejerciendo una inducción en la biosíntesis de compuestos antifúngicos en el epicarpio aguacate.

En pruebas *in vivo*, se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre los tratamientos, el control negativo y el control con metabolitos preformados. Por su parte no se observaron diferencias significativas entre las fracciones estudiadas. Por lo tanto, la aplicación de fracciones específicas, siguiendo el método empleado, no permite reducir la severidad de la enfermedad causada por *C. gloeosporioides* en pruebas *in vivo*.

La fracción de metabolitos retenidos por UF, producidos mediante la aplicación de quitosano como inductor (0.11 ± 0.16), presentó el mejor efecto antifúngico *in vivo* sobre el desarrollo del patógeno.

Se observaron diferencias significativas ($p < 0.05$) entre el contenido de compuestos fenólicos totales presentes en los extractos metabólicos provenientes de frutos no-inducidos, inducidos y fraccionados. Observándose los mejores resultados en los

extractos completos de quitosano (19.66 ± 0.76) e inulina (20.15 ± 0.45) y la fracción permeada del quitosano (19.65 ± 0.13).

Se identificó la presencia de epicatequina, naringenina ácido trans-cinámico, ácido mevalónico, taxifolina y kaempferol en los extractos completos y fracciones estudiadas, confirmando la presencia de compuestos con actividad antimicrobiana o relacionados con ella en los extractos.

Se indujo la síntesis de metabolitos secundarios con poder antifúngico como resultado del proceso de inducción, siendo el caso de epicatequina, naringenina y taxifolina, validando la hipótesis de investigación “La aplicación de elicitores en el epicarpio del aguacate Hass induce la síntesis de metabolitos secundarios con poder antifúngico”.

Sobre estos resultados, se propone a los metabolitos extraídos del epicarpio del aguacate como una alternativa capaz de sustituir el uso de fungicidas comerciales como el azoxystrobin para el control de *C. gloeosporioides* en pruebas *in vitro* e *in vivo*.

El estudio de la actividad antifúngica de extractos metabólicos obtenidos del epicarpio del aguacate sentó las bases para la formulación de posibles tratamientos contra la antracnosis en aguacate.

Como recopilación de lo sugerido a lo largo del presente documento, y de las características del tipo de metabolitos estudiados, me permito recomendar la evaluación de posibles formas de aplicación y de almacenamiento de los tratamientos, especialmente la encapsulación, nano emulsión o la combinación con recubrimientos o ceras, además, debido a las condiciones necesarias para la exportación del aguacate, la ampliación de los tratamientos podría ser mediante pulverización sónica o nebulización, se requieren mayores estudios para determinar la más propicia.

Como complemento, sería interesante la evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos contra otros patógenos y aplicados en otros frutos modelos, recordando la existencia de reportes de un cierto índice de toxicidad por parte de algunos de los metabolitos identificados, por lo que se recomienda su aplicación en frutos con cascara, o de lo contrario, realizar un estudio con *Artemia salina* para identificar los efectos de dicha toxicidad a las concentraciones estudiadas.

Por último, es de gran importancia contrastar los resultados de la presente tesis con los análisis transcriptómicos que se están realizando en el grupo de trabajo una vez obtenidos los resultados.

CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

CAPÍTULO 9. REFERENCIAS

- [1]. Ahamad, S. T., Lakshmi, T. A., Rajeshkumar, S., Roy, A., Gurunadhan, D., & Geetha, R. (2019). Antibacterial activity of taxifolin isolated from *Acacia catechu* leaf extract-an *in vitro* study. *Indian Journal of Public Health Research & Development*, 10(11), 3540. <https://doi.org/10.5958/0976-5506.2019.04135.4>
- [2]. Alfaro-Alvarado, F. (2019). *Estudio genético de la resistencia a las estrobilurinas en aislamientos de Pseudocercospora fijiensis de plantaciones de banano en Costa Rica* (Tesis de maestría). Universidad de Costa Rica.
- [3]. Andersen, B., Krøger, E., & Roberts, R. G. (2002). Chemical and morphological segregation of *Alternaria arborescens*, A. Infectoria and A. Tenuissima species-groups. *Mycological Research*, 106(2), 170–182. <https://doi.org/10.1017/S0953756201005263>
- [4]. APEAM. (2014). Listado de plaguicidas recomendado para el cultivo de aguacate. <https://plaguicidas.apeamac.com/>
- [5]. Apel, K., & Hirt, H. (2004). Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annual Review of Plant Biology*, 55, 373–399. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701>
- [6]. Aquino, J. A. S., & Santander, R. G. (2009). Control alternativo de *Alternaria solani* Soraver con extractos vegetales, *in vitro*. *Investigación Agraria*, 11(1), 48–53.
- [7]. Ardi, R., Kobilier, I., Jacoby, B., Keen, N. T., & Prusky, D. (1998). Involvement of epicatechin biosynthesis in the activation of the mechanism of resistance of avocado fruits to *Colletotrichum gloeosporioides*. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 53(5–6), 269–285. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1998.0181>
- [8]. Ariza, Y., & Sánchez, L. (2012). Determinación de metabolitos secundarios a partir de *Bacillus subtilis* con efecto biocontrolador sobre *Fusarium sp.* *Nova-Publicación Científica En Ciencias Biomédicas*, 10(18), 149. <https://doi.org/10.22490/24629448.1003>
- [9]. Arora, J., Goyal, S., & Ramawat, K. G. (2010). Enhanced stilbene production in cell cultures of *Cayratia trifolia* through co-treatment with abiotic and biotic elicitors and sucrose. *In Vitro Cellular and Developmental Biology - Plant*, 46(5), 430–436. <https://doi.org/10.1007/s11627-010-9308-5>

- [10]. Avello-Lorca, M., López-Canales, C., Gatica-Valenzuela, C., Biustos-Concha, E., Brieva-Chait, A., Pastene-Navarrete, E., & Bittner-Berner, M. (2012). Antimicrobial effects of extracts from Chilean plants of *Lauraceae* and *Atherospermataceae* families. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 17(1), 73–83.
- [11]. Aymacaña-Albán, A. E. (2018). *Caracterización bromatológica de la cáscara de aguacate (Persea americana) y posterior extracción e identificación de la fracción con mayor actividad antimicrobiana y antioxidante* (Tesis de pregrado). Universidad Central del Ecuador. <https://doi.org/10.15439/2019F121>
- [12]. Baque, A., Shiragi, H. K., Lee, E. J., & Paek, K. Y. (2012). Elicitor effect of chitosan and pectin on the biosynthesis of anthraquinones, phenolics and flavonoids in adventitious root suspension cultures of *Morinda citrifolia* (L.). *Australian Journal of Crop Science*, 6(9), 1349–1355.
- [13]. Barrientos-Carvacho, H., Pérez, C., Zúñiga, G., & Mahn, A. (2014). Effect of methyl jasmonate, sodium selenate and chitosan as exogenous elicitors on the phenolic compounds profile of broccoli sprouts. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 94(12), 2555–2561. <https://doi.org/10.1002/jsfa.6596>
- [14]. Bautista-Baños, S., Hernández-López, M., Bosquez-Molina, E., & Wilson, C. L. (2003). Effects of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides*, anthracnose levels and quality of papaya fruit. *Crop Protection*, 22(9), 1087–1092. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(03\)00117-0](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(03)00117-0)
- [15]. Belhadj, A., Telef, N., Saigne, C., Cluzet, S., Barrieu, F., Hamdi, S., & Mérillon, J. M. (2008). Effect of methyl jasmonate in combination with carbohydrates on gene expression of PR proteins, stilbene and anthocyanin accumulation in grapevine cell cultures. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(4), 493–499. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2007.12.001>
- [16]. Benezzer-Benezzer, M., Castro-Mercado, E., & García-Pineda, E. (2008). Production of reactive oxygen species during the resistance expression of plants to diseases. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 26(1), 56–61.
- [17]. Beno-Moualem, D., & Prusky, D. (2000). Early events during quiescent infection development by *Colletotrichum gloeosporioides* in unripe avocado fruits. *Phytopathology*, 90(5), 553–559. <https://doi.org/10.1094/PHYTO.2000.90.5.553>
- [18]. Bertozzi, C. R., & Kiessling, L. L. (2001). Chemical Glycobiology. *Science*, 26(8), 788. <https://doi.org/10.1093/glycob/cww072>
- [19]. Bolívar, K., Sanabria, M. E., Rodríguez, D., de Camacaro, M., Ulacio, D., Cumana, L. J., & Crescente, O. (2009). Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en

- el desarrollo in vitro del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Científica UDO Agrícola*, 9(1), 175–181.
- [20]. Braun, U., Crous, P. W., Groenewald, J. Z., & Scheuer, C. (2011). Pseudovirgaria, a fungicolous hyphomycete genus. *IMA Fungus*, 2(1), 65–69. <https://doi.org/10.5598/imafungus.2011.02.01.09>
- [21]. Carranza-Arévalo, G. E. (2017). *Evaluación de la actividad antifúngica in vitro de cinco extractos vegetales (EV) contra Colletotrichum spp. aislado de tomate de árbol (Solanum betaceum)* (Tesis de pregrado). Universidad Técnica de Ambato.
- [22]. Castillo-Reyes, F., Hernández-Castillo, F. D., Gallegos-Morales, G., Flores-Olivas, A., & Rodríguez-Herrera, R. (2017). Efectividad in vitro de *Bacillus* y polifenoles de plantas nativas de México sobre *Rhizoctonia-Solani*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 6(3), 549. <https://doi.org/10.29312/remexca.v6i3.638>
- [23]. Ceusters, N., Van den Ende, W., & Ceusters, J. (2017). *Exploration of Sweet Immunity to Enhance Abiotic Stress Tolerance in Plants: Lessons from CAM. Chemistry of Heterocyclic Compounds* (Vol. 0). <https://doi.org/10.1007/124>
- [24]. Chairin, T., & Petcharat, V. (2017). Induction of defense responses in longkong fruit (*Aglaia dookkoo* Griff.) against fruit rot fungi by *Metarhizium guizhouense*. *Biological Control*, 111, 40–44. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2017.05.012>
- [25]. Chassot, C., Nawrath, C., & Métraux, J. P. (2007). Cuticular defects lead to full immunity to a major plant pathogen. *Plant Journal*, 49(6), 972–980. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.03017.x>
- [26]. Chen, H., Cheng, Z., Wisniewski, M., Liu, Y., & Liu, J. (2015). Ecofriendly hot water treatment reduces postharvest decay and elicits defense response in kiwifruit. *Environmental Science and Pollution Research*, 22(19), 15037–15045. <https://doi.org/10.1007/s11356-015-4714-1>
- [27]. Cheryan, M. (1986). *Ultrafiltration handbook*. Lancaster: Technomic Publishing Company.
- [28]. Conrath, U., Thulke, O., Katz, V., Kohler, A., & Schwindling, S. (2001). Costs of secondary parasitism in the facultative hyperparasitoid *Pachycrepoideus dubius*: Does host size matter? *European Journal of Plant Pathology*, 103(3), 239–248. <https://doi.org/10.1023/A>
- [29]. Contreras-Gutiérrez, P. K., Hurtado-Fernández, E., Gómez-Romero, M., Hormaza, J. I., Carrasco-Pancorbo, A., & Fernández-Gutiérrez, A. (2013). Determination of changes in the metabolic profile of avocado fruits (*Persea americana*) by two CE-

- MS approaches (targeted and non-targeted). *Electrophoresis*, 34(19), 2928–2942. <https://doi.org/10.1002/elps.201200676>
- [30]. Contreras-Oliva, A., Pérez-Gago, M. B., Salvador, A., Bermejo, A., & Rojas-Argudo, C. (2012). Calidad fisicoquímica, sensorial y nutricional de naranjas cv. valencia recubiertas con quitosano. *Agrociencia*, 46(5), 441–453.
- [31]. Cosio, E. G., Frey, T., Verduyn, R., van Boom, J., & Ebel, J. (1990). High-affinity binding of a synthetic heptaglucoside and fungal glucan phytoalexin elicitors to soybean membranes. *FEBS Letters*, 271(1–2), 223–226. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(90\)80411-B](https://doi.org/10.1016/0014-5793(90)80411-B)
- [32]. Cuervo-Jiménez, A., Narvalez-Solarte, W., & Hahn von-Hessberg, C. (2013). Características forrajeras de la especie *Gliricidia sepium* (Jacq.) Stend, Fabaceae. *Boletín Científico. Centro de Museos. Museo de Historia Natural*, 17(1), 33–45.
- [33]. Dahlberg, K. R., & Etten, J. L. V. (1982). Physiology and Biochemistry of Fungal Sporulation. *Annual Review of Phytopathology*, 20(1), 281–301. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.20.090182.001433>
- [34]. Di Stefano, V., Avellone, G., Bongiorno, D., Indelicato, S., Massenti, R., & Lo Bianco, R. (2017). Quantitative evaluation of the phenolic profile in fruits of six avocado (*Persea americana*) cultivars by ultra-high-performance liquid chromatography-heated electrospray-mass spectrometry. *International Journal of Food Properties*, 20(6), 1302–1312. <https://doi.org/10.1080/10942912.2016.1208225>
- [35]. Escudero-Jami, B. E., Parraga-Gonzalez, M. A., & Arias-Reyn, K. (2019). *Evaluación del poder inhibitorio de los compuestos fenólicos de en recubrimientos comestibles para la conservación del queso fresco* (Tesis de pregrado). Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.
- [36]. Espinosa, R., & Ortiz, R. (2013). Estabilidad térmica del grado de polimerización y cuantificación parcial de azúcares en fructanos de agave tequilana, obtenidos por ultrafiltración. In *Ciencias Agropecuarias Handbook* (pp. 42–50).
- [37]. Falcón, A. B., Ramírez, M. A., Márquez, R., & Hernández, M. (2002). Chitosan and its hydrolysate at tobacco-*Phytophthora parasitica* interaction. *Cultivos Tropicales*, 23(1), 61–66.
- [38]. Fallanaj, F., Ippolito, A., Ligorio, A., Garganese, F., Zavanella, C., & Sanzani, S. M. (2016). Electrolyzed sodium bicarbonate inhibits *Penicillium digitatum* and induces defence responses against green mould in citrus fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 115, 18–29. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2015.12.009>

- [39]. Férrez-Martínez, A. (2004). *Obtención de oligosacáridos de leche de diferentes especies por tecnología de membranas* (Tesis doctoral). Universidad de Granada.
- [40]. Fernández-Barbosa, R. J., & Suárez-Meza, C. L. (2009). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium oxysporum* Schlecht f. sp. *Revista Facultad Nacional de Agronomía Medellín*, 62(1), 4743–4748.
- [41]. Foyer, C. H., Lopez-Delgado, H., Dat, J. F., & Scott, I. M. (1997). Hydrogen peroxide- and glutathione-associated mechanisms of acclimatory stress tolerance and signalling. *Physiologia Plantarum*, 100(2), 241–254. <https://doi.org/10.1034/j.1399-3054.1997.1000205.x>
- [42]. Gadelha-Rocha, M. F., Sales, J. A., da Rocha, M. G., Galdino, L. M., de Aguiar, L., Pereira-Neto, W. de A., de Aguiar Cordeiro, R., Castelo-Branco, D. de S. C. M., Sidrim, J. J. C., & Brilhante, R. S. N. (2019). Antifungal effects of the flavonoids kaempferol and quercetin: a possible alternative for the control of fungal biofilms. *Biofouling*, 35(3), 320–328. <https://doi.org/10.1080/08927014.2019.1604948>
- [43]. Gamble, G. R., Snook, M. E., Henriksson, G., & Akin, D. E. (2000). Phenolic constituents in flax bast tissue and inhibition of cellulase and pectinase. *Biotechnology Letters*, 22(9), 741–746. <https://doi.org/10.1023/A:1005608304142>
- [44]. García-Peña, C., Kim-Bich, N., Bich-Thu, N., Tillan-Capo, J., Romero-Díaz, J. A., López, O. D., & Fuste-Moreno, V. (2009). Metabolitos secundarios en los extractos secos de *Passiflora incarnata* L., *Matricaria recutita* L. y *Morinda citrifolia* L. *Revista Cubana de Plantas Medicinales*, 14(2).
- [45]. Glowacz, M., Roets, N., & Sivakumar, D. (2017). Control of anthracnose disease via increased activity of defence related enzymes in ‘Hass’ avocado fruit treated with methyl jasmonate and methyl salicylate. *Food Chemistry*, 234, 163–167.
- [46]. González-Guevara, R. E., Chiralt-Boix, A., Atarés-Huerta, L. M., & Ordoñez-Lagos, R. (2019). *Films de almidón con ácidos fenólicos: Aplicación en matrices* (Tesis de maestría). Universitat Politècnica de València.
- [47]. Granda, D. M., Mejía, A. I., & Jiménez, G. A. (2005). Utilización de residuos de plátano para la producción de metabolitos secundarios por fermentación en estado sólido con el hongo *Lentinus crinitus*. *Vitae*, 12(2), 13–20.
- [48]. Gutierrez-Montalvan, D. L., & Mastrocola-Racines, N. A. (2018). *Efecto de los ácidos acético y cítrico para control de antracnosis (Colletotrichum sp .) en poscosecha de papaya (Carica papaya L .)*(Tesis de pregrado). Univerisidad central de Ecuador.

- [49]. Gutierrez-Alonso, O., Angel-Nieto, A., & Teliz, D. (2004). Manejo Integrado de la Antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc.] del Mango (*Mangifera indica* L.) durante la Postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22(3), 395–402.
- [50]. Gutiérrez-Alonso, O., & Gutiérrez-Alonso, J. G. (2003). Evaluación de resistencia a Benomil, Thiabendazol y Azoxystrobin para el control de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 21(2), 228–232.
- [51]. Gutiérrez-Guerrero, M. del C. (2008). *Estudio del efecto de las propiedades de los flavonoides sobre su capacidad antioxidante total* (Tesis de maestría). Universidad de Queretaro.
- [52]. Hammerschmidt, R. (1999). Induced disease resistance: how do induced plants stop pathogens? *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55, 77–84.
- [53]. He, J., Ren, Y., Chen, C., Liu, J., Liu, H., & Pei, Y. (2017). Defense responses of salicylic acid in mango fruit against postharvest anthracnose, caused by *Colletotrichum gloeosporioides* and its possible mechanism. *Journal of Food Safety*, 37(1), 1–10. <https://doi.org/10.1111/jfs.12294>
- [54]. Hemwimol, S., Pavasant, P., & Shotipruk, A. (2006). Ultrasound-assisted extraction of anthraquinones from roots of *Morinda citrifolia*. *Ultrasonics Sonochemistry*, 13(6), 543–548. <https://doi.org/10.1016/j.ultsonch.2005.09.009>
- [55]. Heredia, A. (2003). Biophysical and biochemical characteristics of cutin, a plant barrier biopolymer. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1620(1–3), 1–7. [https://doi.org/10.1016/S0304-4165\(02\)00510-X](https://doi.org/10.1016/S0304-4165(02)00510-X)
- [56]. Hernández-Monzón, A., & Romagosa-Ibieta, S. (2015). Desarrollo de una leche fermentada probiótica con jugo de *Aloe vera*. *Tecnología Química*, 35(1), 81–97. <https://doi.org/10.1590/2224-6185.2015.1>.
- [57]. Honée, G. (1999). Engineered resistance against fungal plant pathogens. *European Journal of Plant Pathology*, 105(4), 319–326. <https://doi.org/10.1023/A:1008715520415>
- [58]. Ikigai, H., Nakae, T., Hara, Y., & Shimamura, T. (1993). Bactericidal catechins damage the lipid bilayer. *BBA - Biomembranes*, 1147(1), 132–136. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(93\)90323-R](https://doi.org/10.1016/0005-2736(93)90323-R)
- [59]. Ilk, S., Saglam, N., & Özgen, M. (2017). Kaempferol loaded lecithin/chitosan nanoparticles: preparation, characterization, and their potential applications as a sustainable antifungal agent. *Artificial Cells, Nanomedicine and Biotechnology*,

- 45(5), 907–916. <https://doi.org/10.1080/21691401.2016.1192040>
- [60]. Intagri. (2017). Antracnosis en el Cultivo de Aguacate. <https://www.intagri.com/>
- [61]. Inui, H., Yamaguchi, Y., & Hirano, S. (1997). Elicitor actions of N-acetylchitooligosaccharides and laminarioligosaccharides for chitinase and L-phenylalanine ammonia-lyase induction in rice suspension culture. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 61(6), 975–978. <https://doi.org/10.1271/bbb.61.975>
- [62]. IRET. (2017). Oxicloruro de Cobre: Retrieved from <http://www.plaguicidasdecentroamerica.una.ac.cr/index.php/base-de-datos-menu/423-oxicloruro-de-cobre>
- [63]. Iturbide-Zuñiga, A. S., Colinas-León, M. T. B., Lozoya-Saldaña, H., Medina-Moreno, S. A., & Ayala-Arreola, J. (2017). Evaluación *in vitro* de extractos del genero *Lilium* para el control de *Fusarium oxysporum*. *Revista Mexicana de Fitopatología, Mexican Journal of Phytopathology*, 35(3), 611–622. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1609-6>
- [64]. Juarez-Asmad, E. Y. (2015). Antifungal effect of the essential oil of *Cinnamomum zeylanicum* B. “cinnamon” about growth *Rhizoctonia solani* J.G. Kuhn Eimy. *Sagasteguiana*, 3(2), 137–144.
- [65]. Kanwal, Q., Hussain, I., Latif Siddiqui, H., & Javaid, A. (2010). Antifungal activity of flavonoids isolated from mango (*Mangifera indica* L.) leaves. *Natural Product Research*, 24(20), 1907–1914. <https://doi.org/10.1080/14786419.2010.488628>
- [66]. Karabulut, O. A., & Baykal, N. (2004). Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Protection*, 23(5), 431–435. <https://doi.org/10.1016/j.cropro.2003.09.012>
- [67]. Kerstiens, G. (1996). Signalling across the divide: A wider perspective of cuticular structure-function relationships. *Trends in Plant Science*, 1(4), 125–129. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(96\)90007-2](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(96)90007-2)
- [68]. Kim, J. H. (2004). Prepurification of paclitaxel by micelle and precipitation. *Process Biochemistry*, 39(11), 1567–1571. <https://doi.org/10.1016/j.procbio.2003.06.001>
- [69]. Kim, Y. C., Blee, K. A., Robins, J., & Anderson, A. J. (2001). Oxycom™ under field and laboratory conditions increases resistance responses in plants. *European Journal of Plant Pathology*, 107(1), 129–136. <https://doi.org/10.1023/A:1008757220182>

- [70]. Kim, Y. K., Li, D., & Kolattukudy, P. E. (1998). Induction of Ca²⁺-calmodulin signaling by hard-surface contact primes *Colletotrichum gloeosporioides* conidia to germinate and form appressoria. *Journal of Bacteriology*, 180(19), 5144–5150. <https://doi.org/10.1128/jb.180.19.5144-5150.1998>
- [71]. Kirakosyan, A., Hayashi, H., Inoue, K., Charchoglyan, A., & Vardapetyan, H. (2000). Stimulation of the production of hypericins by mannan in *Hypericum perforatum* shoot cultures. *Phytochemistry*, 53(3), 345–348. [https://doi.org/10.1016/S0031-9422\(99\)00496-3](https://doi.org/10.1016/S0031-9422(99)00496-3)
- [72]. Koganezawa, H., Sato, T., & Sasaya, T. (1998). Effects of probenazole and saccharin on symptom appearance of tobacco mosaic virus in tobacco. *Japanese Journal of Phytopathology*, 64(2), 80–84. <https://doi.org/10.3186/jjphytopath.64.80>
- [73]. Kuć, J. (1995). Induced Systemic Resistance — An Overview, 169–175. https://doi.org/10.1007/978-94-015-8420-3_8
- [74]. Kulik, T., Stuper-Szablewska, K., Bilska, K., Buśko, M., Ostrowska-Kołodziejczak, A., Załuski, D., & Perkowski, J. (2017). Trans-cinnamic and chlorogenic acids affect the secondary metabolic profiles and ergosterol biosynthesis by *Fusarium culmorum* and *F. Graminearum* sensu stricto. *Toxins*, 9(7). <https://doi.org/10.3390/toxins9070198>
- [75]. Landero-Valenzuela, N., Lara-Viveros, F. M., Andrade-Hoyos, P., Aguilar-Pérez, L. A., & Aguado Rodríguez, G. J. (2017). Alternativas para el control de *Colletotrichum* spp. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*, 7(5), 1189. <https://doi.org/10.29312/remexca.v7i5.245>
- [76]. Lárez-Velásquez, C., Rojas-Pirela, M., Chirinos, A., & Rojas-Avelizapa, L. (2019). Nuevos retos en agricultura para los biopolímeros de quitina y quitosano. Parete 1: Efectos Beneficiosos Para Los Cultivos. *Rev. Iberoam. Polímeros y Materiales*, 20(3), 118–136.
- [77]. Leandro, L. F. S., Gleason, M. L., Wegulo, S. N., & Nutter, F. W. (2002). Survival and sporulation of *Colletotrichum acutatum* on symptomless strawberry leaves. *Acta Horticulturae*, 567(7), 627–629. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2002.567.135>
- [78]. Leite, B., Roncato, L. D., Pascholati, S. F., & Lambais, M. R. (1997). Reconhecimento e transdução de sinais moleculares em interações planta-fungos patogênicos. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, 5, 235–280.
- [79]. Lenis, L., Benitez, R., Peña-Salamanca, E., & Chito-Trujillo, D. (2007). Extracción, separación y elucidación estructural de dos metabolitos secundarios del

- alga marina *Bostrychia calliptera*. *Scientia et Technica*, 1(33), 97–102.
<https://doi.org/10.22517/23447214.5873>
- [80]. Leon, J., Lawton, M. A., & Raskin, I. (1995). Hydrogen peroxide stimulates salicylic acid biosynthesis in tobacco. *Plant Physiology*, 108(4), 1673–1678.
<https://doi.org/10.1104/pp.108.4.1673>
- [81]. López, M. G., Mancilla-Margalli, N. A., & Mendoza-Diaz, G. (2003). Molecular structures of fructans from *Agave tequilana* Weber var. azul. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 51(27), 7835–7840.
<https://doi.org/10.1021/jf030383v>
- [82]. Low, S. P., & Schroeder, A. T. (2001). Plant–Microbe interactions. In *Phytochemistry* (Vol. 56, pp. 785–786). New York. [https://doi.org/10.1016/s0031-9422\(00\)00437-4](https://doi.org/10.1016/s0031-9422(00)00437-4)
- [83]. Madrigal, L., & Sangronis, E. (2007). La inulina y derivados como ingredientes claves en alimentos funcionales. *Archivos Latinoamericanos de Nutricion*, 57(4), 387–396.
- [84]. Malick, B., Dharini, S., Mervyn, B., & Lise, K. (2016). Expression of pathogenesis-related (PR) genes in avocados fumigated with thyme oil vapours and control of anthracnose. *Food Chemistry*, 194, 938–943.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2015.08.105>
- [85]. McLusky, S. R., Bennett, M. H., Beale, M. H., Lewis, M. J., Gaskin, P., & Mansfield, J. W. (1999). Cell wall alterations and localized accumulation of feruloyl-3'-methoxytyramine in onion epidermis at sites of attempted penetration by *Botrytis allii* are associated with actin polarisation, peroxidase activity and suppression of flavonoid biosynthesis. *Plant Journal*, 17(5), 523–534.
<https://doi.org/10.1046/j.1365-313X.1999.00403.x>
- [86]. Mellado-Mojica, E., & López-Pérez, M. G. (2013). Comparative analysis between blue Agave syrup (*Agave tequilana* weber var. azul) and other natural syrups. *Agrociencia*, 47(3), 233–244.
- [87]. Meng, X., Yang, L., Kennedy, J. F., & Tian, S. (2010). Effects of chitosan and oligochitosan on growth of two fungal pathogens and physiological properties in pear fruit. *Carbohydrate Polymers*, 81(1), 70–75.
<https://doi.org/10.1016/j.carbpol.2010.01.057>
- [88]. Mikkelsen, S. R., & Cortón, E. (2010). Cromatografía de biomoléculas. In *Química bioanalítica: Métodos y teoría analítica para el laboratorio de biología molecular, farmacia y bioquímica*. (pp. 331–359). Eudeba.

- [89]. Miranda, A., & Martín, O. (2013). Cromatografía líquida (HPLC). Retrieved from <http://www.ucm.es/data/cont/docs/650-2013-12-02-aaaagases líquidos.pdf>
- [90]. Molina, A., Hunt, M. D., & Ryals, J. A. (1998). Impaired fungicide activity in plants blocked in disease resistance signal transduction. *The Plant Cell*, *10*(11), 1903–1914. <https://doi.org/10.1105/tpc.10.11.1903>
- [91]. Montañez-Soto, J., Venegas-González, J., Vivar-Vera, M., & Ramos-Ramírez, E. (2011). Los fructanos contenidos en la cabeza y hojas del *Agave tequilana* Weber azul. *Bioagro*, *23*(3), 199–206.
- [92]. Morales-Chicaiza, L. E. (2014). *Desarrollo, elaboración y optimización bromatológica de una bebida de té negro fermentada a base de Manchurian fungus (Kombucha) y evaluación de su actividad como potencial alimento funcional* (Tesis de grado). Escuela Superior Politécnica de Chimborazo.
- [93]. Morales, M. G. (1998). Mecanismos da resistência sistêmica adquirida em plantas. *Revisão Anual de Patologia de Plantas*, *6*, 261–284.
- [94]. Moreno, S., Scheyer, T., Romano, C. S., & Vojnov, A. A. (2006). Antioxidant and antimicrobial activities of rosemary extracts linked to their polyphenol composition. *Free Radical Research*, *40*(2), 223–231. <https://doi.org/10.1080/10715760500473834>
- [95]. Nabavi, S. F., Nabavi, S. M., N. Setzer, W., Nabavi, S. A., Nabavi, S. A., & Ebrahimzadeh, M. A. (2013). Antioxidant and antihemolytic activity of lipid-soluble bioactive substances in avocado fruits. *Fruits*, *68*(3), 185–193. <https://doi.org/10.1051/fruits/2013066>
- [96]. Nelson, S. (2008). Anthracnose of Avocado. Retrieved from <http://www.ctahr.hawaii.edu/freepubs>
- [97]. Niederl, S., Kirsch, T., Riederer, M., & Schreiber, L. (1998). Co-permeability of ³H-labeled water and ¹⁴C-labeled organic acids across isolated plant cuticles: Investigating cuticular paths of diffusion and predicting cuticular transpiration. *Plant Physiology*, *116*(1), 117–123. <https://doi.org/10.1104/pp.116.1.117>
- [98]. Ortiz-Basurto, R. I. (2008). *Caracterización de l'aguamiel et fractionnement des fructanes de jus d'agave par technologie membranaire* (Tesis doctoral). Université Montpellier ii.
- [99]. Özcan, S., Dover, J., Rosenwald, A. G., Wölfl, S., & Johnston, M. (1996). Two glucose transporters in *Saccharomyces cerevisiae* are glucose sensors that generate a signal for induction of gene expression. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *93*(22), 12428–12432.

<https://doi.org/10.1073/pnas.93.22.12428>

- [100]. Palmeros-Parada, M. del M. (2007). *Determinación de la actividad de estriostosidina sintasa y su correlación con la producción de alcaloides indolterpénicos en cultivos de Uncaria tomentosa* (Tesis de pregrado). Instituto Politécnico Nacional.
- [101]. Peñuelas-Rubio, O., Arellano-Gil, M., Vargas-Arispuro, I. C., Lares-Villa, F., Cantú-Soto, E. U., Hernández-Rodríguez, S. E., Gutiérrez-Coronado, C. Mungarro-Ibarra., M. A., & Mungarro-Ibarra, C. (2015). Bioactividad *in vitro* de extractos de gobernadora (*Larrea tridentata*) sobre la inhibición de hongos poscosecha: *Alternaria tenuissima*, *Aspergillus niger*, *Penicillium polonicum* y *Rhizopus oryzae*. *Polibotánica*, (40), 183–198. <https://doi.org/10.18387/polibotanica.40.12>
- [102]. Pérez, A. F., Aristizábal, I. D., & Restrepo, J. I. (2016). Conservación de mango tommy atkins mínimamente procesado mediante la aplicación del recubrimiento de aloe vera (*Aloe barbadensis miller*). *Vitae*, 23(1), 65–77.
- [103]. Pérez, L. V. (2006). Manejo convencional y alternativo de la sigatoka negra en bananos: estado actual y perspectivas. *Fitosanidad*, 10(1), 55–72.
- [104]. Pospieszny, H. (1999). Potential use of chitosan in plant protection. *Polish-Russian Monograph*, 115–130.
- [105]. Prusky, D., Freeman, S., & Dickman, M. (2000). *Colletotrichum. Host Specificity, Pathology, and Host: Pathogen Interaction*.
- [106]. Prusky, D., Plumbley, R. A., & Kobilier, I. (1991). The relationship between antifungal diene levels and fungal inhibition during quiescent infection of unripe avocado fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology*, 40, 45–52. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3059.1991.tb02291.x>
- [107]. Radman, R., Saez, T., Bucke, C., & Keshavarz, T. (2003). Elicitation of plants and microbial cell systems. *Biotechnology and Applied Biochemistry*, 37(1), 91. <https://doi.org/10.1042/ba20020118>
- [108]. Ragazzo-Sánchez, J. A., Coria-Tellez, Ramírez de León, J. A., Ortiz-Basurto, R. I., Cabanillas-Beltrán, H., y Calderon-Santoyo, M. (2015). Control of antracnose in mango (*Mangifera indica* L.) var. ataulfo by high hydrostatic pressure combined with moderated temperature and the biocontrol agent *Candidat famata*. *Sylwan*, 159, 448–460.
- [109]. Ramírez, J. G., Jaraba, A. B., & Buriticá, P. E. (2014). Manejo de la pudrición acuosa del pseudo-tallo (*Dickeya sp.*) en banano (*Musa sp.*) bajo condiciones de

- invernadero. *Agronomía Costarricense*, 38(2), 83–92.
- [110]. Ramos-Solano, B., Barriuso-Maicas, J., Pereyra De La Iglesia, M. T., Domenech, J., & Gutiérrez-Mañero, F. J. (2008). Systemic disease protection elicited by plant growth promoting rhizobacteria strains: Relationship between metabolic responses, systemic disease protection, and biotic elicitors. *Phytopathology*, 98(4), 451–457. <https://doi.org/10.1094/PHTO-98-4-0451>
- [111]. Ritsema, T., & Smeekens, S. (2003). Fructans: Beneficial for plants and humans. *Current Opinion in Plant Biology*, 6(3), 223–230. [https://doi.org/10.1016/S1369-5266\(03\)00034-7](https://doi.org/10.1016/S1369-5266(03)00034-7)
- [112]. Roat, C., & Ramawat, K. G. (2009). Elicitor-induced accumulation of stilbenes in cell suspension cultures of *Cayratia trifolia* (L.) Domin. *Plant Biotechnology Reports*, 3(2), 135–138. <https://doi.org/10.1007/s11816-009-0082-y>
- [113]. Robayo-Medina, A. T. (2016). *Caracterización fisicoquímica de diferentes variedades de aguacate, Persea americana Mill. (Lauraceae) e implementación de un método de extracción del aceite de aguacate como alternativa de industrialización* (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia. Retrieved from <http://www.bdigital.unal.edu.co/56953/>
- [114]. Rodríguez-López, E., González-Prieto, J., & Mayek-Pérez, N. (2009). La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. en Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 27(1), 53–63.
- [115]. Rodríguez, A. T., Rodríguez, M. A., Falcón, A. B., Guridi, F., & Cristo, E. (2004). Estimulación de algunas enzimas relacionadas con la defensa en plantas de arroz (*Oryza sativa*, L.) obtenidas de semillas tratadas con quitosana. *Cultivos Tropicales*, 25(3), 111–115.
- [116]. Roncal, T., & Ugalde, U. (2003). Conidiation induction in *Penicillium*. *Research in Microbiology*, 154(8), 539–546. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00168-2](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00168-2)
- [117]. Rosero, J. C., Cruz, S., Osorio, C., & Hurtado, N. (2019). Analysis of phenolic composition of byproducts (Seeds and Peels) of Avocado (*Persea americana* Mill.) Cultivated in Colombia. *Molecules*, 24(17). <https://doi.org/10.3390/molecules24173209>
- [118]. Roy, S., Nuckles, E., & Archbold, D. D. (2018). Effects of phenolic compounds on growth of *Colletotrichum spp. in vitro*. *Current Microbiology*, 75(5), 550–556. <https://doi.org/10.1007/s00284-017-1415-7>

- [119]. Ruiz-García, Y. (2014). *Elicidores: una herramienta para incrementar el color y el aroma de uvas y vinos*. All rights reserved. IJES (Tesis doctoral). Universidad de Murcia. Retrieved from <http://nadir.uc3m.es/alejandro/phd/thesisFinal.pdf%5Cnhttp://scholar.google.com/scholar?hl=en&btnG=Search&q=intitle:Universidad+de+murcia#0>
- [120]. Ruíz-Reyes, S. G., Venegas-Casanova, E. A., Chávez-Gaona, M. H., & Eustaquio-Saldarriaga, C. L. (2010). Preliminary identification of secondary metabolites from aqueous and ethanolic extracts of the fruit and leaves of *Morinda citrifolia* L. “noni” and spectrophotometric quantification of total flavonoids. *Scientia*, 2(2), 11–22.
- [121]. Russo, C. (2007). A new membrane process for the selective fractionation and total recovery of polyphenols, water and organic substances from vegetation waters (VW). *Journal of Membrane Science*, 288(1–2), 239–246. <https://doi.org/10.1016/j.memsci.2006.11.020>
- [122]. Safescience. (2001). Elexa. Retrieved from <http://www.safescience.com/agriculture/elexasmart.html>
- [123]. SAGARPA. (2000). Protocolo de requerimientos fitosanitarios para la exportación de aguacate de México a China. Retrieved from https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/167145/Protocolo_de_Aguacate_para_China.pdf
- [124]. SAGARPA. (2018). Planeación agrícola nacional. Retrieved from <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257067/Potencial-Aguacate.pdf>
- [125]. Saltos-Mendoza, C. K., Véliz-Quimís, L. L., & Reyna-Arias, K. S. (2019). *Extracción de compuestos fenólicos de cáscara, pulpa y semilla de guanábana (Annona muricata) aplicadas en un recubrimiento para conservar banano mínimamente procesado* (Tesis de pregrado). Universidad Laica Eloy Alfaro de Manabí.
- [126]. Samaniego-Gámez, B., Reyes-Ramírez, A., Moreno-Valenzuela, O., & Tun-Suárez, J. (2017). Resistencia sistémica inducida contra virus fitopatógenos mediada por la inoculación con la rizobacteria *Bacillus spp.* *Revista de Protección Vegetal*, 32(1), 10–22.
- [127]. Sathiyabama, M., & Balasubramanian, R. (1998). Chitosan induces resistance components in *Arachis hypogaea* against leaf rust caused by *Puccinia arachidis* Speg. *Crop Protection*, 17(4), 307–313. [https://doi.org/10.1016/S0261-2194\(98\)00017-9](https://doi.org/10.1016/S0261-2194(98)00017-9)
- [128]. Saura-Calixto, F., Serrano, J., & Goñi, I. (2007). Intake and bioaccessibility of

- total polyphenols in a whole diet. *Food Chemistry*, 101(2), 492–501. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2006.02.006>
- [129]. Schaffrath, U., Scheinpflug, H., & Reissener, H. J. (1995). An elicitor from *Pyricularia oryzae* induces resistance responses in rice: isolation, characterization and physiological properties. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 46, 293–307.
- [130]. Schroeder, C. A. (1950). The structure of the skin or rind of the avocado. *Avocado Yearbook*, 34, 169–176.
- [131]. Schweizer, P., Kmecl, A., Carpita, N., & Dudler, R. (2000). A soluble carbohydrate elicitor from *Blumeria graminis* f. sp. tritici is recognized by a broad range of cereals. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 56(4), 157–167. <https://doi.org/10.1006/pmpp.2000.0259>
- [132]. SENASICA. (2017). Plagas reglamentadas del aguacatero. Retrieved from <https://www.gob.mx/senasica/documentos/plagas-reglamentadas-del-aguacatero-110847>
- [133]. Shilpa, K., Varun, K., & Lakshmi, B. S. (2010). An alternate method of natural drug production: Eliciting secondary metabolite production using plant cell culture. *Journal of Plant Sciences*, 5, 222–247.
- [134]. Shiraishi, T., Yamada, T., Ichinose, Y., Kiba, A., Toyoda, K., Kato, T., & Seki, H. (1997). Suppressor as a factor determining plant-pathogen specificity. In *Plant-microbe interactions* (4th ed., pp. 121–161). New York: Chapman y Hall.
- [135]. Slováková, L., Lišková, D., Capek, P., Kubačková, M., Kákoniová, D., & Karácsonyi, Š. (2000). Defence responses against TNV infection induced by galactoglucomannan-derived oligosaccharides in cucumber cells. *European Journal of Plant Pathology*, 106(6), 543–553. <https://doi.org/10.1023/A:1008722318178>
- [136]. Sombra-Arguielles, V. I. (2019). *Actividad Antifúngica de “Pseudognaphalium luteoalbum” (L.) Hilliard & B.L. Burt* (Tesis de maestría). Colegio de postgraduados. <https://doi.org/10.13140/RG.2.2.25911.98722>
- [137]. Soria, A. C., & Villamiel, M. (2010). Effect of ultrasound on the technological properties and bioactivity of food: A review. *Trends in Food Science and Technology*, 21(7), 323–331. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2010.04.003>
- [138]. Spadaro, D., & Gullino, M. L. (2004). State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*, 91(2), 185–194. [https://doi.org/10.1016/S0168-1605\(03\)00380-5](https://doi.org/10.1016/S0168-1605(03)00380-5)

- [139]. Stashenko, E. E., Jaramillo, B. E., & Martínez, J. R. (2003). Comparación de la composición química y de la actividad antioxidante *in vitro* de los metabolitos secundarios volátiles de plantas de la familia *verbenaceae*. *Rev. Acad. Colomb. Cienc.*, 27(105), 579–597.
- [140]. Suárez-Meza, C. L., Fernández-Barbosa, R. J., Valero, N. O., Gámez-Carrillo, R. M., & Páez-Redondo, A. R. (2008). Antagonismo *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai sobre *Fusarium solani* (Mart.) Sacc., asociado a la marchitez en maracuyá. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 10(2), 35–43.
- [141]. Supapvanich, S., Mitsang, P., Youryon, P., Techavuthiporn, C., Boonyariththongchai, P., & Tepsorn, R. (2018). Postharvest quality maintenance and bioactive compounds enhancement in ‘Taaptimjaan’ wax apple during short-term storage by salicylic acid immersion. *Horticulture Environment and Biotechnology*, 59(3), 373–381. <https://doi.org/10.1007/s13580-018-0044-9>
- [142]. Svalheim, Ø., & Robertsen, B. (1993). Elicitation of H₂O₂ production in cucumber hypocotyl segments by oligo-1,4- α -D-galacturonides and an oligo- β -glucan preparation from cell walls of *Phytophthora megasperma* f. sp. glycinea. *Physiologia Plantarum*, 88(4), 675–681. <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1993.tb01388.x>
- [143]. Syngenta. (2020). *Ficha técnica: Amistar*. Retrieved from <https://www.syngenta.com.ar/product/crop-protection/fungicida/amistar>
- [144]. Tarkowski, Ł. P., Van de Poel, B., Höfte, M., & Van den Ende, W. (2019). Sweet immunity: Inulin boosts resistance of lettuce (*Lactuca sativa*) against grey mold (*Botrytis cinerea*) in an ethylene-dependent manner. *International Journal of Molecular Sciences*, 20(5). <https://doi.org/10.3390/ijms20051052>
- [145]. Téliz, D., & Mora, A. (2007). *El aguacate y su manejo integrado* (2nd ed.). Grupo Mundi-Prensa.
- [146]. Tetali, S. D. (2019). Terpenes and isoprenoids: a wealth of compounds for global use. *Planta*, 249(1). <https://doi.org/10.1007/s00425-018-3056-x>
- [147]. Tognolli, M., Penel, C., Greppin, H., & Simon, P. (2002). Analysis and expression of the class III peroxidase large gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Gene*, 288(1–2), 129–138. [https://doi.org/10.1016/S0378-1119\(02\)00465-1](https://doi.org/10.1016/S0378-1119(02)00465-1)
- [148]. Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R., Higuera-Ciapara, I., & Perez-Brito, D. (2013). Morphological, pathological and genetic diversity of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose in papaya (*Carica papaya* L). *European Journal of Plant Pathology*, 135(1), 67–79. <https://doi.org/10.1007/s10658-012-0065-7>

- [149]. Toyoshima, Y., Okubo, S., Toda, M., Hara, Y., & Shimamura, T. (1994). Effect of catechin on the ultrastructure of *Trichophyton mentagrophytes*. *Kansenshogaku Zasshi*, 68, 295–303.
- [150]. Treybal, R. (1998). *Operaciones de transferencia de masa* (2nd ed.). McGraw-Hill.
- [151]. Upadhyaya, N. M., Mago, R., Staskawicz, B. J., Ayliffe, M. A., Ellis, J. G., & Dodds, P. N. (2014). A bacterial type III secretion assay for delivery of fungal effector proteins into wheat. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(3), 255–264. <https://doi.org/10.1094/MPMI-07-13-0187-FI>
- [152]. Urán, M. E., & Cano, L. E. (2008). Melanina: implicaciones en la patogénesis de algunas enfermedades y su capacidad de evadir la respuesta inmune del hospedero. *Asociación Colombiana de Infectología*, 12(2), 128–148.
- [153]. Urano, D., & Jones, A. M. (2013). “Round up the usual suspects”: A comment on nonexistent plant G protein-coupled receptors. *Plant Physiology*, 161(3), 1097–1102. <https://doi.org/10.1104/pp.112.212324>
- [154]. Urdaneta, L., Sanabria, M. E., Rodríguez, D., & De Camacaro, M. P. (2013). Grupos de metabolitos secundarios del extracto etanólico de *Gliricidia sepium* y su potencial antifúngico sobre *Colletotrichum acutatum*. *Interciencia*, 38(6), 449–454.
- [155]. Valencia-Arredondo, J. A. (2015). *Diseño de un sistema electroforético en flujo libre para purificar antocianinas de col morada (Brassica oleracea)* (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional.
- [156]. Valencia-Arredondo, Serrano-Aragó, J., Díaz-Montes, M., Yañez, E., & Yañez, J. (2017). Evaluación del proceso de adsorción para la purificación de antocianinas a partir de capulín. In *IV Encuentro Internacional sobre Biotecnología*.
- [157]. Van-Loon, L. C., & Van-Strien, E. A. (1999). The families of pathogenesis-related proteins, their activities, and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 55(2), 85–97. <https://doi.org/10.1006/pmpp.1999.0213>
- [158]. Vargas-Hernández, M. (2014). *Actividad antimicrobiana de extractos de Chile (Capsicum annum L.) cultivado en invernadero empleando factores inductores de metabolitos (FIMs)* (Tesis de maestría). Universidad Autónoma de Querétaro.
- [159]. Velderrain-Rodríguez, G. R. (2013). *Efecto de la fibra dietaria en la capacidad antioxidante de compuestos fenólicos de frutos tropicales durante un modelo de digestión in vitro* (Tesis de maestría). Centro de Investigación en alimentación y

- Desarrollo. Retrieved from
<http://ciad.repositorioinstitucional.mx/jspui/handle/1006/290>
- [160]. Veloz-García, R., Marín-Martínez, R., Veloz-Rodríguez, R., Rodríguez-Guerra, R., Torres-Pacheco, I., González-Chavira, M. M., Anaya-López, J. L., Guevara-Olvera, L., Feregrino-Pérez, A. A., Loarca-Piña, G., & Guevara-González, R. G. (2010). Antimicrobial activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Industrial Crops and Products*, 31(1), 134–138. <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2009.09.013>
- [161]. Verde-Yáñez, L., Bernal-Pita da Veiga, Á., & Almargo-Romero, L. (2017). *Ensayo de elicitación de suspensiones celulares utilizando como elicitor un extracto de hojas de Moringa oleifera* (Tesis de pregrado). Universidade da Coruña.
- [162]. Vidales-Fernández, J. A., Coria-Avalos, V. M., Contreras, J. A., & Alcanar-Rocillo, J. J. (2005). Antracnosis en el Cultivo de Aguacate.
- [163]. Villa-Rodríguez, J. A., Molina-Corral, F. J., Ayala-Zavala, J. F., Olivas, G. I., & González-Aguilar, G. A. (2011). Effect of maturity stage on the content of fatty acids and antioxidant activity of “Hass” avocado. *Food Research International*, 44(5), 1231–1237. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2010.11.012>
- [164]. Vio-Michaelis, S., Apablaza-Hidalgo, G., Gómez, M., Peña-Vera, R., & Montenegro, G. (2012). Antifungal activity of three Chilean plants extracts on *Botrytis cinerea*. *Botanical Science*, 90(2), 179–183. <https://doi.org/10.1126/science.139.3555.637-b>
- [165]. Vogt, L. M., Meyer, D., Pullens, G., Faas, M. M., Venema, K., Ramasamy, U., Schols, H. A., & de Vos, P. (2014). Toll-like receptor 2 activation by β 2 \rightarrow 1-fructans protects barrier function of t84 human intestinal epithelial cells in a chain length-dependent manner. *Journal of Nutrition*, 144(7), 1002–1008. <https://doi.org/10.3945/jn.114.191643>
- [166]. Vongsangnak, W., Gua, J., Chauvatcharin, S., & Zhong, J. J. (2004). Towards efficient extraction of *Notoginseng saponins* from cultured cells of *Panax notoginseng*. *Biochemical Engineering Journal*, 18(2), 115–120. [https://doi.org/10.1016/S1369-703X\(03\)00197-9](https://doi.org/10.1016/S1369-703X(03)00197-9)
- [167]. Vos, C. M., Yang, Y., De Coninck, B., & Cammue, B. P. A. (2014). Fungal (-like) biocontrol organisms in tomato disease control. *Biological Control*, 74, 65–81. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2014.04.004>
- [168]. Wang, F., Feng, G., & Chen, K. (2009). Burdock fructooligosaccharide induces

- resistance to tobacco mosaic virus in tobacco seedlings. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 74(1), 34–40. <https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2009.08.002>
- [169]. Wang, W., Bostic, T. R., & Gu, L. (2010). Antioxidant capacities, procyanidins and pigments in avocados of different strains and cultivars. *Food Chemistry*, 122(4), 1193–1198. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.03.114>
- [170]. Wink, M. (2008). Bioprospecting: The search for bioactive lead structures from nature. In *Medicinal Plant Biotechnology: From Basic Research to Industrial Applications* (pp. 97–116). <https://doi.org/10.1002/9783527619771.ch6>
- [171]. Wolfenstetter, S., Chakravorty, D., Kula, R., Urano, D., Trusov, Y., Sheahan, M. B., McCurdy, D. W., Assmann, S. M., Jones, A. M., & Botella, J. R. (2015). Evidence for an unusual transmembrane configuration of AGG3, a class C Gγ subunit of *Arabidopsis*. *Plant Journal*, 81(3), 388–398. <https://doi.org/10.1111/tpj.12732>
- [172]. Wulandari, N. F., To-anun, C., Hyde, K. D., Duong, L. M., De Gruyter, J., Meffert, J. P., Groenewald, J. Z., & Crous, P. W. (2009). *Phyllosticta citriasiana* sp. nov., the cause of Citrus tan spot of *Citrus maxima* in Asia. *Fungal Diversity*, 34, 23–39.
- [173]. Wulff, N. A., & Pascholati, S. F. (1999). Partial characterization of sorghum phytoalexin elicitors isolated from *Saccharomyces cerevisiae*. *Fitopatologia Brasileira*, 23(3), 428–435.
- [174]. Xoca-Orozco, L. Á. (2017). *Modo de acción de elicitores del mecanismo de defensa y su relación con las biosíntesis de compuestos antifúngicos de aguacate (Persea americana Mill.) cv. Hass* (Tesis doctoral). Tecnológico Nacional de México Instituto Tecnológico de Tepic.
- [175]. Xoca-Orozco, L. Á., Aguilera-Aguirre, S., Vega-Arreguín, J., Acevedo-Hernández, G., Tovar-Pérez, E., Stoll, A., Herrera-Estrella, L., & Chacón-López, A. (2018). Activation of the phenylpropanoid biosynthesis pathway reveals a novel action mechanism of the elicitor effect of chitosan on avocado fruit epicarp. *Food Research International*, 121, 586–592. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.12.023>
- [177]. Xu, D., Deng, Y., Han, T., Jiang, L., Xi, P., Wang, Q., Jiang, Z., & Gao, L. (2018). *In vitro* and *in vivo* effectiveness of phenolic compounds for the control of postharvest gray mold of table grapes. *Postharvest Biology and Technology*, 139, 106–114. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2017.08.019>
- [178]. Yahyazadeh, M., Omidbaigi, R., Zare, R., & Taheri, H. (2008). Effect of some

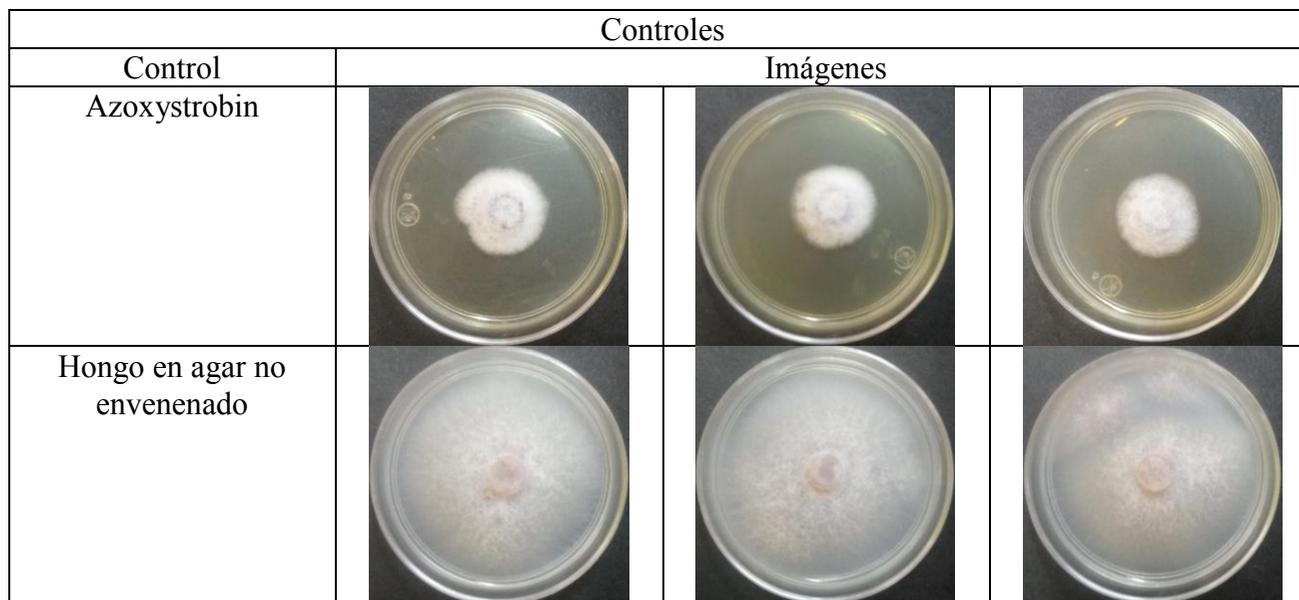
- essential oils on mycelial growth of *Penicillium digitatum* Sacc. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(8), 1445–1450. <https://doi.org/10.1007/s11274-007-9636-8>
- [179]. Yamaguchi, T., Ito, Y., & Shibuya, N. (2000). Oligosaccharide elicitors and their receptors trends for plant defense responses. *Trends in Glycoscience and Glycotechnology*, 12(64), 113–120.
- [180]. Yuan, G., Zhang, X., Tang, W., & Sun, H. (2016). Effect of chitosan coating combined with green tea extract on the melanosis and quality of Pacific white shrimp during storage in ice. *CYTA - Journal of Food*, 14(1), 35–40. <https://doi.org/10.1080/19476337.2015.1040459>
- [181]. Zamora-Magdaleno, T., Cárdenas-Soriano, E., & Cajuste-Bontemps, J. F. (2001). Anatomía del daño por rozamiento y por *Colletotrichum gloeosporioides* penz. en fruto de aguacate “Hass.” *Agrocencia*, 35(2), 237–244.
- [182]. Zhang, P. Y., Wang, J. C., Liu, S. H., & Chen, K. S. (2009). A novel burdock fructooligosaccharide induces changes in the production of calicylates, activates defence enzymes and induces systemic acquired resistance to *Colletotrichum orbiculare* in cucumber seedlings. *Journal of Phytopathology*, 157(4), 201–207. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.2008.01465.x>
- [183]. Zhao, J., Davis, L. C., & Verpoorte, R. (2005). Elicitor signal transduction leading to production of plant secondary metabolites. *Biotechnology Advances*, 23(4), 283–333. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2005.01.003>
- [184]. Zhao, J., Zhu, W. H., & Hu, Q. (2001). Enhanced catharanthine production in *Catharanthus roseus* cell cultures by combined elicitor treatment in shake flasks and bioreactors. *Enzyme and Microbial Technology*, 28(7–8), 673–681. [https://doi.org/10.1016/S0141-0229\(01\)00306-4](https://doi.org/10.1016/S0141-0229(01)00306-4)

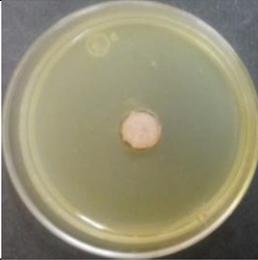


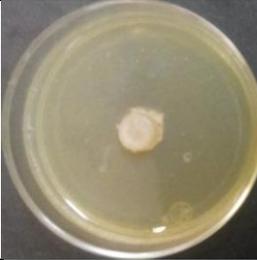
CAPÍTULO 10. ANEXOS

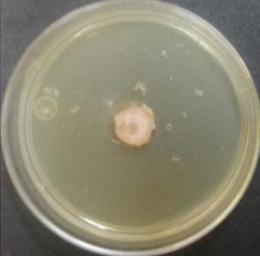
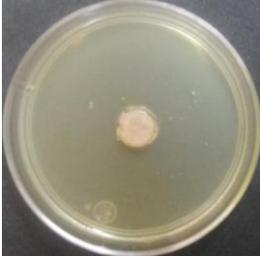
CAPITULO 10. ANEXOS10.1 Evidencia fotográfica de la prueba *in vitro*.

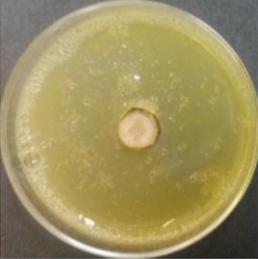
Se muestra el efecto *in vitro* de extractos metabólicos producidos por elicitación del sistema de defensa del fruto, específicamente las pertenecientes a la fase uno de la investigación “Inhibición del crecimiento micelial” por inductor y por concentración estudiada.

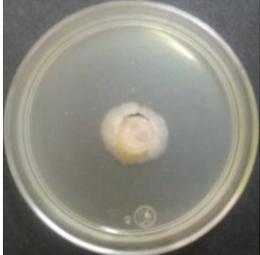


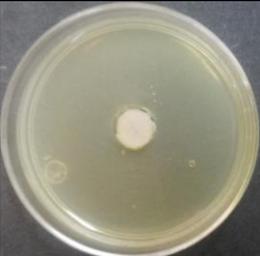
Quitosano			
Concentración	Imágenes		
50%			
30%			
15%			

Á. Salicílico			
Concentración	Imágenes		
50%			
30%			
15%			

Peróxido de hidrógeno			
Concentración	Imágenes		
50%			
30%			
15%			

Acemananos			
Concentración	Imágenes		
50%			
30%			
15%			

Fructanos			
Concentración	Imágenes		
50%			
30%			
15%			

Inulina			
Concentración	Imágenes		
50%			
30%			
15%			

Metil Jasmonato			
Concentración	Imágenes		
50%			
30%			
15%			

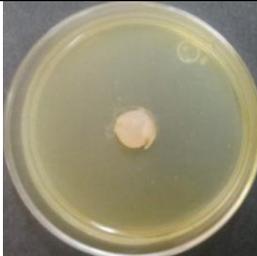
Preformados			
Concentración	Imágenes		
50%			
30%			
15%			

Figura 10.1 Evidencia fotográfica de la prueba *in vitro*: Inhibición del crecimiento micelial.

10.2 Evidencia fotográfica de la prueba *in vivo*.

Se muestran las imágenes obtenidas de la fase dos de la investigación, donde se muestra la reducción de la severidad en pruebas *in vivo* por inductor y por fracción estudiada.

Controles			
Control	Imágenes		
Azoxystrobin			
Aguacate con patógeno			

Inulina

Fracción	Imágenes		
Retenidos			
Permeados			
Completos			

Quitosano

Fracción	Imágenes		
Retenidos			
Permeados			
Completos			

Fructanos

Fracción	Imágenes		
Retenidos			
Permeados			
Completos			

Acemananos

Fracción	Imágenes		
Retenidos			
Permeados			
Completos			

Preformados

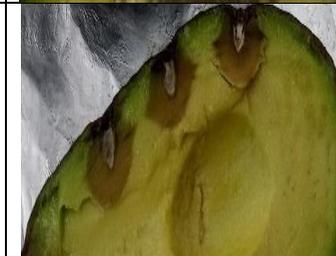
Fracción	Imágenes		
Retenidos			
Permeados			
Completo			

Figura 10.2 Evidencia fotográfica de la prueba *in vivo*: Severidad de la enfermedad.

