



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE AGUASCALIENTES

CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

**MAESTRÍA EN CIENCIAS CON OPCIÓN A: AGRONÓMICAS O
VETERINARIAS**

TESIS

**USO DE EXTRACTO DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*) Y
QUITOSANO PARA EL CONTROL DE *Botrytis cinerea***

QUE PRESENTA

I.B.Q. CARMEN NATALIA TREJO CORONA

**PARA OPTAR POR EL GRADO DE
MAESTRA EN CIENCIAS AGRONÓMICAS**

COTUTORES

Dr. Alberto Margarito García Munguía

Dr. Carlos Alberto García Munguía

INTEGRANTE DEL COMITÉ TUTORAL

Dra. Laura Eugenia Pérez Cabrera

AGUASCALIENTES, AGS., 23 DE JUNIO DE 2022.



DICTAMEN DE LIBERACIÓN ACADÉMICA PARA INICIAR LOS TRÁMITES DEL EXAMEN DE GRADO



Fecha de dictaminación dd/mm/aaaa: 18/05/2022

NOMBRE: Carmen Natalia Trejo Corona ID 115824

PROGRAMA: Maestría en Ciencias con opción a: Agronómicas o Veterinarias LGAC (del posgrado): Producción e inocuidad agroalimentaria

TIPO DE TRABAJO: ☒ Tesis ☐ Trabajo Práctico

TÍTULO: USO DE EXTRACTO DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*) Y QUITOSANO PARA EL CONTROL DE *Botrytis cinerea*

IMPACTO SOCIAL (señalar el impacto logrado): El trabajo aporta información útil sobre el uso de productos naturales para el combate de algunas enfermedades en plantas cultivadas, representa una opción para sustituir el uso de agroquímicos y tener alimentos más sanos para el consumo humano

INDICAR	SI	NO	N.A.	(NO APLICA)	SEGÚN	CORRESPONDA:
<i>Elementos para la revisión académica del trabajo de tesis o trabajo práctico:</i>						
SI						El trabajo es congruente con las LGAC del programa de posgrado
SI						La problemática fue abordada desde un enfoque multidisciplinario
SI						Existe coherencia, continuidad y orden lógico del tema central con cada apartado
SI						Los resultados del trabajo dan respuesta a las preguntas de investigación o a la problemática que aborda
SI						Los resultados presentados en el trabajo son de gran relevancia científica, tecnológica o profesional según el área
SI						El trabajo demuestra más de una aportación original al conocimiento de su área
SI						Las aportaciones responden a los problemas prioritarios del país
N.A.						Generó transferencia de conocimiento o tecnológica
SI						Cumple con la ética para la investigación (propósito de la herramienta antiolegio)
<i>El egresado cumple con lo siguiente:</i>						
SI						Cumple con lo señalado por el Reglamento General de Docencia
SI						Cumple con los requisitos señalados en el plan de estudios (créditos curriculares, optativos, actividades complementarias, estancia, predoctoral, etc.)
SI						Cuenta con los votos aprobatorios del comité tutorial. En caso de los programas profesionales si tiene solo tutor podrá liberar solo al tutor
N.A.						Cuenta con la carta de satisfacción del Usuario
SI						Coincide con el título y objetivo registrado
SI						Tiene congruencia con cuerpos académicos
SI						Tiene el CVU del Conacyt actualizado
SI						Tiene el artículo aceptado o publicado y cumple con los requisitos institucionales (en caso que proceda)
<i>En caso de tesis por artículos científicos publicados</i>						
N.A.						Aceptación o Publicación de los artículos según el nivel del programa
N.A.						El estudiante es el primer autor
N.A.						El autor de correspondencia es el Tutor del Núcleo Académico Básico
N.A.						En los artículos se ven reflejados los objetivos de la tesis, ya que son producto de este trabajo de investigación
N.A.						Los artículos integran los capítulos de la tesis y se presentan en el idioma en que fueron publicados
N.A.						La aceptación o publicación de los artículos en revistas indexadas de alto impacto

Con base a estos criterios, se autoriza se continúen con los trámites de titulación y programación del examen de grado:

SI SI
No

Elaboró:

+ NOMBRE Y FIRMA DEL CONSEJERO SEGÚN LA LGAC DE ADSCRIPCIÓN:

FIRMAS

DR. JOAQUÍN SOSA RAMÍREZ

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO TÉCNICO:

DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ

* En caso de conflicto de intereses, firmar con el nombre del NAB de la LGAC correspondiente (directa al tutor o asesor del comité tutorial, según sea el caso)

Revisó:

NOMBRE Y FIRMA DEL SECRETARIO DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO:

DR. ANTONIO DE JESÚS MERAZ JIMÉNEZ

Autorizó:

NOMBRE Y FIRMA DEL DECANO:

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ

Nota: procede el trámite para el Depto. de Apoyo al Posgrado

Se cumplimenta con el Art. 105C del Reglamento General de Docencia con la firma de la entre las fundaciones del Consejo Académico, el tutor o asesora titular del programa de posgrado y el Art. 105F las fundaciones del Secretario Técnico, llevar el seguimiento de los avances.

CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como co-tutor designado del estudiante **CARMEN NATALIA TREJO CORONA** con ID 115824 quien realizó la tesis titulada: **USO DE EXTRACTO DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*) Y QUITOSANO PARA EL CONTROL DE *Botrytis cinerea***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a jueves 23 de junio de 2022.


Dr. Alberto Margarito García Munguía
Co-tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19



CARTA DE VOTO APROBATORIO
INDIVIDUAL

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS
P R E S E N T E

Por medio del presente como asesora designada de la estudiante **CARMEN NATALIA TREJO CORONA** con ID 115824 quien realizó la tesis titulada: **USO DE EXTRACTO DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*) Y QUITOSANO PARA EL CONTROL DE *Botrytis cinerea***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

A T E N T A M E N T E
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a 27 de junio de 2022.


DRA. LAURA EUGENIA PÉREZ CABRERA
Integrante del comité tutorial

c.c.p.- Interesada
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19

DR. RAÚL ORTIZ MARTÍNEZ
DECANO DEL CENTRO DE CIENCIAS AGROPECUARIAS

P R E S E N T E

Por medio del presente como co-tutor designado del estudiante **CARMEN NATALIA TREJO CORONA** con ID 115824 quien realizó la tesis titulada: **USO DE EXTRACTO DE JENGIBRE (*Zingiber officinale*) Y QUITOSANO PARA EL CONTROL DE *Botrytis cinerea***, un trabajo propio, innovador, relevante e inédito y con fundamento en el Artículo 175, Apartado II del Reglamento General de Docencia doy mi consentimiento de que la versión final del documento ha sido revisada y las correcciones se han incorporado apropiadamente, por lo que me permito emitir el **VOTO APROBATORIO**, para que ella pueda proceder a imprimirla así como continuar con el procedimiento administrativo para la obtención del grado.

Pongo lo anterior a su digna consideración y sin otro particular por el momento, me permito enviarle un cordial saludo.

ATENTAMENTE
"Se Lumen Proferre"
Aguascalientes, Ags., a jueves 23 de junio de 2022.

Dr. Carlos Alberto García Munguía
Co-tutor de tesis

c.c.p.- Interesado
c.c.p.- Secretaría Técnica del Programa de Posgrado

Elaborado por: Depto. Apoyo al Posgrado.
Revisado por: Depto. Control Escolar/Depto. Gestión de Calidad.
Aprobado por: Depto. Control Escolar/ Depto. Apoyo al Posgrado.

Código: DO-SEE-FO-07
Actualización: 01
Emisión: 17/05/19

AGRADECIMIENTOS

A mi *alma mater*, la Universidad Autónoma de Aguascalientes, por ofrecer este programa de posgrado. A mi tutor el Dr. Margarito García y a los integrantes de mi comité: la Dra. Laura Pérez y el Dr. Carlos García, por su tiempo y aportaciones, al igual que agradezco al asesor externo, el Dr. Catarino Perales.

Al CONACYT por las becas sin las cuáles no sería posible que muchos estudiantes de posgrado podamos realizarlo.

Gracias al siguiente personal del Centro de Ciencias Básicas y del Centro de Ciencias Agropecuarias por su tiempo, orientación, amabilidad, asistencia técnica y préstamo de equipo de laboratorio en diferentes etapas del proyecto experimental: I.Q. Rosa Ramírez, Vero, la Dra. Mariana Beltrán y el Dr. Jauregui.

A mis compañeros y compañeras de clase, a los docentes de las materias cursadas y al personal de la Secretaría Técnica de posgrado.

Y por último y más importante, a Dios por todo, y a mi madre y mi padre por su apoyo y por hacerme saber, en palabra y ejemplo, que soy capaz de hacer lo que quiera.

Dedicatoria

A mi familia.

Don't quit

*When things go wrong, as they sometimes will,
When the road you're trudging seems all uphill,
When the funds are low and the debts are high
And you want to smile but you have to sigh.
When all is pressing you down a bit-
Rest if you must, but don't quit.
Success is failure turned inside out;
The silver tint on the clouds of doubt.
And you can never tell how close you are,
It may be near when it seems far,
So stick to the fight when you're hardest hit-
It's when things go wrong that you must not quit.*

John Greenleaf Whittier

ÍNDICE GENERAL

ÍNDICE DE CUADROS	4
ÍNDICE DE FIGURAS	5
RESUMEN	6
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN GENERAL	8
OBJETIVOS	10
HIPÓTESIS	10
CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO	11
1.1 <i>Botrytis cinerea</i>	11
1.1.1 Características	11
1.1.2 Enfermedad del moho gris	12
1.1.2.1 Cultivos afectados por la enfermedad del moho gris	12
1.1.2.2 Síntomatología	13
1.1.2.3 Mecanismos de patogenicidad	14
1.1.2.4 Ciclo de infección	15
1.1.2.5 Temperatura	17
1.1.2.6 Afectaciones económicas	18
1.1.3 Métodos de control de <i>Botrytis cinerea</i>	19
1.1.3.1 Métodos tradicionales: fungicidas químicos	19
1.1.3.2 Métodos alternativos	21
1.1.3.2.1 Agentes de control biológico	22
1.1.3.2.2 Compuestos de origen natural y compuestos generalmente reconocidos como seguros	22
1.1.3.2.3 Métodos físicos	23
1.1.4 <i>Botrytis cinerea</i> en el cultivo de fresa (<i>Fragaria x ananassa</i>)	25
1.1.4.1. Generalidades de la fresa	25
1.1.4.2 Importancia económica	25
1.1.4.3 Enfermedad en fresa	27

1.2 ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS VEGETALES USADOS CONTRA FITOPATÓGENOS.....	29
1.2.1 Efectividad de los aceites esenciales y extractos vegetales usados contra <i>Botrytis cinerea</i>	31
1.3 EL JENGIBRE (<i>Zingiber officinale</i>)	34
1.3.1 Composición química del jengibre.....	35
1.3.2 Composición química de los extractos, aceites y oleorresinas de jengibre	36
1.3.3 Extracción de aceites, extractos y oleorresinas de jengibre.....	37
1.3.4 Uso de productos del jengibre contra hongos fitopatógenos	39
1.3.5 Uso de aceites esenciales y extractos de jengibre contra <i>Botrytis cinerea</i>	40
1.4 QUITOSANO.....	42
1.4.1 Fuentes y método de extracción	42
1.4.2 Uso del quitosano como fungicida.....	43
1.4.3 Mecanismos de inducción de la defensa de las plantas por quitosano	46
1.5 COMBINACIONES DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD FUNGICIDA..	48
CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE <i>Botrytis cinerea</i> USANDO EXTRACTO DE <i>Zingiber officinale</i>.....	51
2.1 RESUMEN.....	51
2.2 INTRODUCCIÓN.....	52
2.3 OBJETIVOS	53
2.4 HIPÓTESIS	53
2.5 MATERIALES Y MÉTODOS.....	54
2.5.1 Ubicación del trabajo	54
2.5.2 Aislamiento y purificación de <i>Botrytis cinerea</i>	54

2.5.3	Obtención y concentración del extracto de jengibre.....	54
2.5.4	Evaluación de la inhibición de crecimiento micelial	56
2.5.5	Análisis estadístico	59
2.6	RESULTADOS.....	60
2.6.1	Aislamiento y purificación de <i>Botrytis cinerea</i>	60
2.6.2	Obtención y concentración del extracto de jengibre.....	61
2.6.3	Evaluación de la inhibición de crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> usando extractos de jengibre.....	63
2.7	DISCUSIÓN.....	69
2.8	CONCLUSIONES.....	71
CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE <i>Botrytis cinerea</i> USANDO EXTRACTO DE JENGIBRE CON QUITOSANO.....		72
3.1	RESUMEN.....	72
3.2	INTRODUCCIÓN.....	73
3.3	OBJETIVO	74
3.4	HIPÓTESIS	74
3.5	MATERIALES Y MÉTODOS.....	75
3.5.1	Ubicación del trabajo	75
3.5.2	Evaluación de la inhibición de crecimiento micelial.....	75
3.5.3	Análisis estadístico	77
3.6	RESULTADOS.....	78
3.7	DISCUSIÓN.....	89
3.8	CONCLUSIONES.....	93
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES		94
CAPÍTULO V. REFERENCIAS.....		95

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Taxonomía de <i>Botrytis cinerea</i>	11
Cuadro 2. Abreviaciones de los tratamientos del Capítulo 2.	58
Cuadro 3. Crecimiento diario de <i>B. cinerea in vitro</i> con tratamientos de extracto etanólico de jengibre fresco y seco.	63
Cuadro 4. Porcentajes diarios de inhibición de crecimiento de <i>B. cinerea in vitro</i> con tratamientos de extracto etanólico de jengibre seco y fresco.	65
Cuadro 5. Velocidad de crecimiento micelial según el tratamiento.	65
Cuadro 6. Concentración inhibitoria media (CI50) del extracto de jengibre seco.	66
Cuadro 7. Porcentajes diarios de crecimiento de <i>B. cinerea</i> con tratamientos de extracto etanólico de jengibre fresco a 6, 8 y 14%.	66
Cuadro 8. Porcentajes de inhibición micelial de <i>B. cinerea</i> con tratamientos de extracto etanólico de jengibre fresco a 6, 8 y 14%.	67
Cuadro 9. Concentración inhibitoria media del extracto de jengibre fresco.	67
Cuadro 10. Comparación de los crecimientos radiales del micelio de <i>B. cinerea</i> con tratamientos de EJS y EJS en el día 7.	68
Cuadro 11. Abreviaciones y concentraciones de los tratamientos del Capítulo 3.	76
Cuadro 12. Crecimiento micelial diario de <i>Botrytis cinerea in vitro</i> con tratamientos simples de extracto etanólico de jengibre seco y quitosano.	78
Cuadro 13. Crecimiento micelial diario de <i>Botrytis cinerea in vitro</i> con tratamientos de combinaciones de EJS y quitosano.	81
Cuadro 14. Porcentajes de inhibición diarios de <i>Botrytis cinerea</i> con tratamientos simples de extracto etanólico de jengibre seco y quitosano.	82
Cuadro 15. Porcentajes de inhibición de crecimiento micelial diario de <i>Botrytis cinerea</i> con tratamientos combinados de extracto etanólico de jengibre seco y quitosano.	83
Cuadro 16. Concentración inhibitoria media (CI50) del quitosano.	84
Cuadro 17. Comparación de los porcentajes de ICM diario de <i>Botrytis cinerea</i> de las combinaciones de EJS-quitosano y los tratamientos simples de EJS.	87
Cuadro 18. Índice de sinergia de los tratamientos combinados.	88

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Síntomas de infección por <i>Botrytis cinerea</i> en el cultivo de fresa.	28
Figura 2. Rizoma de jengibre.....	34
Figura 3. Jengibre fresco partido y jengibre seco molido.	55
Figura 4. Equipo Soxhlet en funcionamiento.	55
Figura 5. Rotavapor.	56
Figura 6. Siembra del hongo en las cajas de Petri.	57
Figura 7. Cepas de <i>Botrytis cinerea</i> empleadas en el presente trabajo.	57
Figura 8. Medición de los diámetros de crecimiento micelial con un vernier digital.	58
Figura 9. Conidióforos de <i>Botrytis cinerea</i>	60
Figura 10. Conidióforos y conidios de <i>Botrytis cinerea</i> (Pei et al., 2018).	60
Figura 11. <i>Botrytis cinerea</i> esporulado.	61
Figura 12. Extracto etanólico de jengibre fresco y de jengibre seco.	62
Figura 13. Crecimiento diario de <i>B. cinerea in vitro</i> con las diferentes concentraciones de los tratamientos de extracto de jengibre fresco.	64
Figura 14. Crecimiento diario de <i>B. cinerea</i> con las diferentes concentraciones de los tratamientos de extracto de jengibre seco.	64
Figura 15. Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> diario para cada concentración de los tratamientos de extracto de jengibre fresco: 6%, 8% y 14%.	67
Figura 16. Crecimiento diario de <i>B. cinerea in vitro</i> con las diferentes concentraciones de quitosano.	79
Figura 17. Crecimiento diario de <i>Botrytis cinerea in vitro</i> con tratamientos de EJS al 1 y 2%.	79
Figura 18. Crecimiento diario de <i>B. cinerea</i> para los tratamientos de EJS comparados con sus respectivas combinaciones con quitosano.	80
Figura 19. Comparación de porcentajes de inhibición de tratamientos simples de quitosano y de los extractos de jengibre.....	83
Figura 20. Comparación de porcentajes de inhibición de crecimiento micelial diario de <i>B. cinerea</i> con tratamientos combinados de extracto de jengibre seco y quitosano.	84
Figura 21. Porcentajes de inhibición de crecimiento de <i>B. cinerea</i> con las combinaciones de EJS-quitsano y los tratamientos simples de EJS.....	86
Figura 22. Comparación de los porcentajes de inhibición de <i>B. cinerea</i> de los tratamientos de quitosano simples con las combinaciones que los contienen.....	87

RESUMEN

Botrytis cinerea es un fitopatógeno de importancia para muchos cultivos comestibles. El moho gris es la principal enfermedad en fresa después de la cosecha, provocando pérdidas económicas significativas. El uso desmedido de fungicidas ha ocasionado que algunos hongos, incluido *B. cinerea* desarrollen resistencia y sea cada vez más difícil el control de la enfermedad. Además existen razones de salud humana y ambientales para la búsqueda de alternativas a los fungicidas sintéticos. En este trabajo se evaluó extracto de jengibre fresco y seco, quitosano y, combinaciones de quitosano con extracto de jengibre seco con el objetivo de determinar la inhibición del crecimiento de *B. cinerea in vitro*. La cepa de *B. cinerea* utilizada se obtuvo a partir de fresas infectadas. Se hizo una extracción Soxhlet a partir de rizomas frescos y secos de jengibre, empleando etanol al 96%, y se concentró en un rotavapor. Los extractos de jengibre inhibieron el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea in vitro*, siendo el de jengibre seco más efectivo que el de fresco. Las concentraciones inhibitorias medias fueron 1.03% para el extracto de seco, y 10.15% para el de fresco. Los porcentajes de inhibición finales del extracto de jengibre seco al 2 y 4% fueron 65.07% y 92.52%. Las cuatro concentraciones de quitosano (1.5, 3, 6 y 9 mg/ml) evaluadas tuvieron capacidad inhibitoria. La concentración inhibitoria media del quitosano fue 8.82 mg/ml. Las inhibiciones producidas por los extractos de jengibre seco al 1 y 2% fueron significativamente diferentes. De los tratamientos combinados, los mejores fueron J1Q4, J2Q2, J2Q3 y J2Q4. La mayor inhibición alcanzada por J2Q4 fue de 80.4%, aunque su porcentaje de inhibición final fue de 61%. Los tratamientos J1Q4 y J2Q4 tuvieron efecto sinérgico según la fórmula Abbot.

PALABRAS CLAVE *Botrytis cinerea*, extracto vegetal, extracto de jengibre, actividad antifúngica, quitosano

ABSTRACT

Botrytis cinerea is an important plant pathogen for many food crops. Gray mold disease is the most important post-harvest infection for strawberry. The excessive use of fungicides has caused fungi resistance, including *B. cinerea*, therefore the disease control is increasingly difficult, causing substantial economic losses. In addition, there are environmental and human health reasons for seeking alternatives to synthetic fungicides. In this work, fresh and dry ginger extract, chitosan, and chitosan-dry ginger extract combinations were evaluated against *B. cinerea in vitro* to determine mycelial growth inhibition. *B. cinerea* strain was obtained from infected strawberries. Fresh and dried ginger extracts were obtained by Soxhlet extraction with 96% ethanol followed by a concentration process in a rotary evaporator. Ginger extracts inhibited mycelial growth of *Botrytis cinerea in vitro*, being dry ginger more effective than fresh. The average inhibitory concentrations were 1.03% for the dry extract, and 10.15% for the fresh one. The final of dry ginger extract at 2 and 4% were 65.07% and 92.52%. All evaluated concentrations of chitosan (1.5, 3, 6, 9 mg/ml) had inhibitory capacity. Mean inhibitory concentration of chitosan was 8.82 mg/ml. Inhibition percentages of dry ginger extracts at 1 and 2% were significantly different. J1Q4, J2Q2, J2Q3 and J2Q4 were the best of the combined treatments. The highest inhibition achieved by J2Q4 was 80.4%, although its final inhibition percentage was 61%. The J1Q4 and J2Q4 treatments had a synergistic effect according to the synergy factor determined with the Abbot formula.

KEY WORDS *Botrytis cinerea*, plant extract, ginger extract, antifungal activity, chitosan

INTRODUCCIÓN GENERAL

Existe una gran variedad de hongos que afectan cultivos de frutas y hortalizas. Estos provocan pérdidas económicas importantes para los productores, los distribuidores y los comerciantes. *Botrytis cinerea* es uno de ellos, puesto que es un hongo versátil que daña más de 1000 especies de plantas, ocasionando marchitamiento en flores y hojas, pudrición de frutos, semillas y tallos, entre otros síntomas. Bajo condiciones húmedas produce una capa de moho gris en los tejidos afectados, por lo que se le conoce como la enfermedad del moho gris en muchos de los cultivos que ataca.

La fresa, cuyo fruto es producto de éxito internacional ampliamente consumido, es uno de los cultivos susceptibles a este patógeno, siendo *B. cinerea* su principal hongo postcosecha. El control de la enfermedad es difícil debido a sus varios modos de ataque y a que tiene diversos tejidos huéspedes. La infección puede aparecer incluso en frutos provenientes de plantas de apariencia sana; las fresas maduras son especialmente vulnerables si sufren daño físico. Estas manifestaciones poscosecha representan mermas económicas significativas.

Regularmente la enfermedad del moho gris se controla con fungicidas sintéticos en combinación con la remoción de hojas, flores y partes infectadas de la planta para prevenir la propagación, además de buenas prácticas agrícolas y tratamientos poscosecha. Existen algunas desventajas del uso desmedido de fungicidas. Con el paso del tiempo la cantidad necesaria de éstos para controlar *Botrytis cinerea* ha ido aumentando, debido al desarrollo de resistencia del patógeno en cuestión, haciendo cada vez más difícil el control de la enfermedad. Además, el uso de agroquímicos en los agroecosistemas conlleva riesgos para la salud humana y contamina el agua por la filtración a los mantos acuíferos a través de la tierra.

Por lo tanto, se requiere una alternativa a los fungicidas sintéticos que sea más amigable con el ambiente y que no dañe la salud humana. Existe una tendencia hacia investigar las propiedades antifúngicas de diversos extractos vegetales, ya que algunas plantas pueden ser aprovechadas con este fin gracias a que sus funciones químicas de defensa les proveen de compuestos aprovechables.

En este sentido se han explorado con éxito, algunas opciones *in vitro* para el control de *B. cinerea*, que involucran tratamientos utilizando extractos vegetales con efectos prometedores. El extracto de jengibre ha sido estudiado como tratamiento *in vitro* contra algunos hongos fitopatógenos y bacterias. Se han obtenido buenos resultados, por lo que podría ser una opción viable para utilizarse contra *B. cinerea*.

El quitosano es un biopolímero utilizado en varios sectores, incluyendo la agricultura como regulador del crecimiento. La presencia de grupos amino en la estructura química del quitosano le confieren propiedades útiles para la conservación y seguridad de los alimentos, por lo que además ha sido investigado para alargar la vida de anaquel de varios frutos gracias a su actividad antimicrobiana contra diferentes patógenos, entre ellos *B. cinerea*.

Por lo tanto, el tema de la presente tesis es el uso del quitosano y del extracto de jengibre para el control de *Botrytis cinerea* en condiciones *in vitro*, utilizando ambas sustancias solas y por separado.

En el primer capítulo se presenta el marco teórico, que contiene información relevante sobre el patógeno *B. cinerea*, así como de la actividad fungicida del jengibre, sus extractos y aceites, y del quitosano. En el segundo y tercer capítulo se muestra el trabajo experimental, cada uno con sus resultados, discusiones y conclusiones. El cuarto capítulo son las conclusiones generales de la tesis, y en el quinto capítulo se encuentran las referencias bibliográficas.

La obtención y concentración del extracto de jengibre a partir de jengibre fresco y polvo de jengibre seco, así como su utilización en la evaluación de la inhibición de crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* se describen en el segundo capítulo. En el tercer capítulo se evaluó el porcentaje de inhibición de diferentes concentraciones de extracto de jengibre seco, quitosano y combinaciones de ambos.

OBJETIVOS

Objetivo general:

Evaluar la efectividad del extracto de jengibre y del quitosano como inhibidores de *Botrytis cinerea*.

Objetivos particulares:

1. Obtener el extracto etanólico de jengibre y concentrarlo.
2. Evaluar la efectividad del extracto de jengibre como inhibidor de *Botrytis cinerea in vitro*.
3. Evaluar la efectividad de combinaciones de quitosano con extracto de jengibre, para la inhibición de *Botrytis cinerea in vitro*.

HIPÓTESIS

- El extracto de jengibre inhibe el crecimiento de *Botrytis cinerea in vitro*.
- La combinación de extracto de jengibre (*Zingiber officinale*) con quitosano tiene un efecto sinérgico o aditivo en la inhibición del crecimiento de *Botrytis cinerea in vitro*.

CAPÍTULO I. MARCO TEÓRICO

1.1 *Botrytis cinerea*

1.1.1 Características

Botrytis cinerea es un hongo patógeno de plantas que afecta a más de mil especies, entre las que se encuentran frutas frescas, flores y verduras de hoja (Elad *et al.*, 2015). Las enfermedades producidas por el género *Botrytis* están distribuidas en cultivos económicamente importantes, pero la mayoría de las especies de este género solo infectan a unas cuantas especies de plantas, es decir, son patógenos especializados en un rango pequeño de hospederos, o incluso en una sola especie (De Miccolis *et al.*, 2015). Sin embargo, la especie *Botrytis cinerea* tiene una amplia variedad de hospederos, por lo que es considerado un hongo polífago (Jarvis, 1977). Está considerado entre los diez hongos patógenos más importantes en fitopatología debido a su relevancia científica y económica (Dean *et al.*, 2012).

Cuadro 1. Taxonomía de *Botrytis cinerea*.

Reino	Fungi
División	<i>Ascomycota</i>
Clase	<i>Leotiomycota</i>
Orden	<i>Helotiales</i>
Familia	<i>Sclerotiniaceae</i>
Género	<i>Botrytis</i>
Especie	<i>Botrytis cinerea</i>

Fuente: Whetzel, 1945

Botrytis cinerea es el estadio asexual (anamorfo) de *Botryotinia fuckeliana* (teleomorfo o sexual). *B. cinerea* se manifiesta generalmente con abundante micelio septado del que se originan largos conidióforos ramificados, con células

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

apicales que guardan racimos de conidios (esporas asexuales) ovoides o redondos, unicelulares, de color desde blanquecino hasta gris oscuro (Agrios, 2005). También tiene estructuras de supervivencia, los esclerocios, que están hechos a partir de micelio ramificado que se congglomera en una masa globular. El esclerocio puede ser hialino al principio y después volverse café o gris oscuro. La capa exterior pigmentada del esclerocio protege al interior de desecación y radiación ultravioleta por periodos largos de tiempo (Williamson *et al.*, 2007).

B. cinerea es un hongo necrótrofo, al igual que todo el género *Botrytis* (Amselem *et al.*, 2011). Tiende a crecer y reproducirse en tejido dañado, muerto o senescente, pero también puede infectar tejidos no senescentes causando eventualmente su muerte. Cuando infecta tejidos sanos generalmente permanecen asintomáticos un tiempo, pero los presentan después (Jarvis, 1962).

1.1.2 Enfermedad del moho gris

1.1.2.1 Cultivos afectados por la enfermedad del moho gris

La enfermedad causada por el hongo *Botrytis cinerea* es generalmente conocida como moho gris, debido al micelio gris visible en una de las etapas del desarrollo del hongo. Es una de las infecciones más importantes, tanto en poscosecha como en precosecha (ya sea de forma latente o activa), de los siguientes cultivos comestibles: fresa, zarzamora, uva de mesa, vid, frambuesa, mora o arándano azul y kiwi. Además, la enfermedad también es de las más significativas en poscosecha para el jitomate, chicharo, frijol, apio, pimienta morrón, alcachofa, manzana, pera, berenjena, lechuga y zanahoria (Antunes & Cavaco, 2010).

Otras frutas y hortalizas que son susceptibles a infección por *B. cinerea* poscosecha son: granada, espárrago, albahaca, betabel, brócoli, col, col de bruselas, coliflor, rábano, kale o col rizada, cebolla, cebollín, puerro, pepino, grosella, persimonia o caqui, kiwi, escarola, calabaza de Castilla, lenteja, papa, camote, ciruela, escarola, limón, cacahuete, durazno y calabaza (Romanazzi & Feliziani, 2014). Las pérdidas ocasionadas por este hongo a frutas, vegetales y

plantas de ornato dependen del manejo que se le dé a los cultivos y de los cuidados después de la cosecha (Droby & Lichter, 2007).

1.1.2.2 Síntomatología

B. cinerea se manifiesta de forma distinta dependiendo de la planta hospedera y según las fases de crecimiento de los diferentes cultivos y la parte de la planta que ataca, pero generalmente las plantas jóvenes no son muy susceptibles a infección con síntomas, mientras que las plantas que son más viejas sí presentan (Dik et al., 2007).

Los síntomas pueden incluir decoloración de café a gris, lesiones empapadas de agua, y en las superficies el moho vellosa color blanquecino, gris o café, que es el micelio y los conidios del hongo (Droby & Lichter, 2007). La infección generalmente empieza a partir de aberturas naturales o heridas mecánicas (Romanazzi & Feliziani, 2014), por lo que cualquier factor que cause daño a los tejidos, de la planta o del fruto, facilitará la propagación de *B. cinerea* (Elmer et al., 2007). Antes de abordar los síntomas en la planta de fresa, se mencionarán síntomas en otros cultivos importantes para resaltar la importancia que tiene este hongo en la agricultura. El primer síntoma en uva durante el almacenamiento es el fácil desprendimiento de la piel de la uva al tacto, acompañado de una decoloración marrón-rojiza, desintegración interna, pérdida de volumen y la aparición de micelio gris y esporulación. (Droby & Lichter, 2007).

En el caso del jitomate, durante la floración de la planta de jitomate es cuando se presentan las infecciones latentes, pero que después pueden producir pudrición del extremo del tallo. Además, en los pedúnculos de las flores y en el fruto inmaduro se forman lesiones húmedas con micelio. Al igual que la fresa, los frutos que se cosechan sin signos de enfermedad pueden infectarse durante el almacenamiento, o comenzar a mostrar síntomas post-cosecha, aunque es menos común que la enfermedad en campo. En el caso del kiwi, los principales síntomas son hojas necrosadas, la pudrición del pedúnculo con presencia de moho blanco, el ablandamiento de la fruta, la “marca de marea” bien delimitada en el exterior de la fruta y con el pericarpio de apariencia vítrea en el interior. En

las rosas, las lesiones en los pétalos comienzan bien definidas, después crecen volviéndose necróticos los pétalos rápidamente (Droby & Lichter, 2007).

Síntomas en fresa

Los síntomas de infección por *Botrytis cinerea* en la planta de fresa son distintos según la parte de la planta en que se manifiestan. La lesión comienza como puntos oscuros, más suaves que el resto del tejido, que rápidamente crecen en tamaño (Droby & Lichter, 2007) y después crece micelio de color hialino o gris en el sitio de infección y sus alrededores, que más adelante presenta esporulación desde blanca hasta gris oscura (Romanazzi & Feliziani, 2014). Las hojas nuevas de la planta de fresa se quedan en estado de latencia un tiempo, pero cuando este pasa ocurre la necrosis de la hoja (Elmer *et al.*, 2007).

Las flores y frutas enfermas se vuelven fuentes secundarias de inóculo en los sistemas de producción que tienen varios ciclos de cultivo por año (Droby & Lichter, 2007).

1.1.2.3 Mecanismos de patogenicidad

B. cinerea puede hacer uso de distintos mecanismos para infectar a la planta hospedera. Estos mecanismos son resultado de la acción simultánea de distintos factores de patogenicidad, que son cualquier sustancia que contribuya a la penetración, invasión, colonización y maceración del tejido vegetal. (Benito *et al.*, 2000; Petrasch *et al.*, 2019). Dichos mecanismos han sido estudiados en modelos hospedero-patógeno utilizando fresa, jitomate, ciruela, uva, zanahoria, vid y las especies del género de las cucurbitáceas.

B. cinerea aumenta la susceptibilidad de la planta hospedera utilizando factores de patogenicidad, o virulencia, que reprimen la respuesta inmune de las células vegetales. Uno de estos factores es el ácido oxálico, que actúa disminuyendo el pH y debilitando las paredes celulares (Petrasch *et al.*, 2019). Otras sustancias que produce el hongo como parte del ciclo de infección son enzimas. Para la penetración a través de la cutícula utiliza la cutinasa; para la degradación de la

pared vegetal emplea endo-poli-galaturonasas y exo-poli-galacturonasas, que son hidrolíticas extracelulares, además de proteasas, pectin-metil-esterasas, pectin-liasas (Benito *et al.*, 2000), celulasas y hemicelulasas (Boddy, 2016).

A la par, la planta hospedera también comienza a producir fitoalexinas como parte de su mecanismo de defensa. En consecuencia, *B. cinerea* crea enzimas responsables de la desintoxicación de esos compuestos producidos por la planta (Benito *et al.*, 2000). Una de estas enzimas, que funciona como factor de patogenicidad de *B. cinerea*, es la enzima lacasa (Prusky & Lichter, 2007), que es del grupo de las oxidasas.

1.1.2.4 Ciclo de infección

El ciclo de infección de *B. cinerea* comienza con la primera fase, **1) adhesión y germinación de esporas**, que se da cuando las esporas (conidios) llegan a la superficie de la planta, ya sea por contacto directo con tejidos ya infectados o por corrientes de aire que transportaron el inóculo (Benito *et al.*, 2000). Enseguida las esporas forman el tubo germinativo del que sale el apresorio (Boddy, 2016). La segunda fase es **2) la penetración** de las esporas en el tejido vegetal, lo cual puede ser a través de aberturas naturales, o de heridas causadas por agentes bióticos o abióticos, o por la ruptura directa de la cutícula de las células hospederas utilizando la clavija de infección que sale del apresorio (Prusky & Lichter, 2007; Boddy, 2016). Además de las cutinasas y lipasas que se secretan para poder romper la cutícula, la clavija de penetración o de infección produce peróxido de hidrógeno.

La tercera parte consiste en **3) el establecimiento del patógeno** para ocasionar la muerte de las células adyacentes al punto de penetración, lo cuál se logra mediante la producción de sustancias que forman una lesión primaria en el tejido. Entre estas sustancias está el ácido oxálico, el botrydial y otras toxinas hospedero-específicas. Durante la penetración de la cutícula y la formación de lesiones primarias, el patógeno ocasiona que en la planta se desencadene una explosión oxidativa como respuesta de defensa ante el ataque del hongo, lo que

hace que se acumulen especies reactivas de oxígeno, y eventualmente necrosis del tejido infectado. La explosión oxidativa otorga resistencia frente a patógenos biótrofos, pero en el caso de necrótrofos como *B. cinerea*, resulta beneficioso para el hongo ya que se alimenta de las células muertas (Boddy, 2016).

La cuarta fase, que no se presenta en todos los casos, es **4) la quiescencia** o latencia, en la cual no hay síntomas visibles (Benito *et al.*, 2000). La quiescencia de *Botrytis cinerea* involucra la acumulación de compuestos fenólicos en el hospedero y otros factores de patogenicidad. La activación de la fase de quiescencia se puede dividir en dos pasos. El primero implica que el hongo venza las respuestas de defensa de la planta, ya sea quitándole lo tóxico a los compuestos antifúngicos o superando los mecanismos de represión de los factores de patogenicidad. El segundo consiste en la acidificación de los tejidos hospederos utilizando ácido oxálico, que además de modificar el pH, quela el calcio debilitando las paredes celulares (Prusky & Lichter, 2007).

Cuando el patógeno vence las barreras defensivas de la planta, comienza **5) la diseminación** en el tejido vegetal circundante a las lesiones primarias. Entonces, la **colonización y maceración** del tejido vegetal infectado ocurre de manera rápida (Benito *et al.*, 2000).

Después, una nueva **6) generación** de esporas (**esporulación**) de *B. cinerea* se produce, siendo esta la última fase del ciclo de infección antes de comenzar uno nuevo cuando los conidios se adhieren a las superficies de plantas y/o frutos aledaños (Benito *et al.*, 2000). Los conidios son liberados en climas húmedos y son transportados por corrientes de aire (Agrios, 2005).

Se ha propuesto que la fase de latencia de *B. cinerea* en las frutas inmaduras está relacionada con la falta de azúcares y la presencia de compuestos antifúngicos preformados, aunado a un ambiente inadecuado para la expresión de los factores de virulencia (Prusky & Lichter, 2007). La exposición de hospederos inmaduros a patógenos inicia cascadas de transducción de señales defensivas que limitan el crecimiento y desarrollo del hongo, pero al mismo tiempo *B. cinerea* utiliza en ese periodo sus mecanismos para suprimir el sistema inmune del hospedero (Prusky *et al.*, 2013).

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Después de la cosecha, durante la maduración y el almacenamiento, el mecanismo que las protege a las frutas del ataque fúngico se vuelve no funcional (Prusky & Lichter, 2007), lo que aumenta su vulnerabilidad.

1.1.2.5 Temperatura

Botrytis cinerea puede desarrollarse en rangos de temperaturas desde 0°C hasta 30°C (Romanazzi & Feliziani, 2014). Las temperaturas óptimas para las diferentes fases de desarrollo del hongo varían de 12 a 30°C (Dik & Wubben, 2007). Ciliberti y colaboradores (2016) mencionan que el rango óptimo para la esporulación es de 15 a 20°C, y una humedad relativa mayor a 65%. La temperatura a la que *B. cinerea* crece mejor depende del hospedero.

El patógeno es capaz de desarrollarse en temperaturas de almacenamiento en frío (0 a 5°C) debido a que la resistencia de los hospederos se ve disminuida a esas temperaturas (Romanazzi & Feliziani, 2014). *Botrytis cinerea* puede sobrevivir fácilmente temperaturas de invierno en fresas y frambuesas (Jarvis, 1962).

La temperatura y humedad relativa tienen un efecto directo en las epidemias de *B. cinerea*. En los invernaderos, el efecto del clima es el efecto combinado de esos dos factores. El espacio entre las plantas influye el microclima del cultivo y disminuye el contacto directo entre plantas (Dik *et al.*, 2007). Para reducir la incidencia del moho gris, es necesario garantizar la aireación alrededor de las plantas, lo cual se puede conseguir con el sistema de cultivo de una sola fila (Elmer *et al.*, 2007).

1.1.2.6 Afectaciones económicas

La enfermedad del moho gris afecta a la fruta en el campo, transporte, almacenamiento y en los puntos de venta. Incluso en cultivos que tengan apariencia sana puede producirse un daño grande, debido a la fase quiescente de la enfermedad que no presenta síntomas visuales.

Botrytis cinerea se puede desarrollar a partir de fruta infectada cercana a fruta sana, causando descomposición de la mercancía y algunas veces arruinando lotes enteros (Romanazzi & Feliziani, 2014). La fruta madura es especialmente susceptible a las infecciones de *B. cinerea* después de sufrir algún daño físico (Williamson *et al.*, 2007), lo cual permite que el patógeno colonice rápidamente el tejido dañado y que se propague por toda la fruta.

Aunque las pérdidas económicas causadas por hongos, durante la poscosecha, son variables y no están bien documentadas, se cree que alcanzan entre 30 y 50 %, pero incluso en algunas ocasiones la pudrición puede conducir a la pérdida total del producto (Alvarado *et al.*, 2011).

El control de moho gris representa un gasto global estimado de \$20 mil millones de pesos al año, distribuido entre prácticas culturales, uso de botrycidas y de fungicidas de amplio espectro, y técnicas de biocontrol. A pesar del control de enfermedades, la pérdida de producto es considerable, así como la pérdida de calidad durante la cadena de suministro; probablemente el impacto económico de esto es aún mayor, aunque incontabilizado (Dean *et al.*, 2012).

1.1.3 Métodos de control de *Botrytis cinerea*

Existen diversas formas para controlar o inhibir la infección por *Botrytis cinerea* en los cultivos. Las buenas prácticas agrícolas tienen un papel importante: en el campo se debe remover el material vegetal infectado y necrótico de las plantas y del suelo para evitar la propagación (Boddy, 2016), así como evitar el contacto de la fruta con el suelo en el momento de la cosecha, ya que la mayor parte del inóculo está presente ahí y la humedad del suelo promueve la germinación de conidios (Petrasch *et al.*, 2019). Además, la regulación de la humedad es una medida de control necesaria para que no aumente la probabilidad de infección, tanto en los invernaderos como en los sitios de almacenamiento de producto (Boddy, 2016).

Los principales métodos utilizados para el control del moho gris, son químicos. *B. cinerea* puede ser parcialmente controlado en campo utilizando fungicidas (Boddy, 2016). La selección y aplicación oportuna de fungicidas es muy importante para el control de este hongo (Mertely *et al.*, 2002). Resulta difícil controlarlo debido a que tiene una variedad de modos de ataque y diversos huéspedes como fuentes de inóculo (Williamson *et al.*, 2007).

1.1.3.1 Métodos tradicionales: fungicidas químicos

La utilización de fungicidas es el método tradicional de control de *Botrytis cinerea* en los cultivos a los que ataca. Se aplican durante el ciclo de crecimiento del cultivo sin que haya síntomas, es decir, se trata de aplicaciones preventivas (Romanazzi & Feliziani, 2014).

Los fungicidas químicos utilizados para el control de *B. cinerea* en diversas especies vegetales se pueden clasificar según su modo de acción. A continuación se muestran ejemplos de algunos de los grupos:

a) *Los que afectan la respiración fúngica:*

Un ejemplo es la boscalida, que forma parte del grupo de las piridina-carboxamidas. Esta sustancia es una inhibidora de la enzima succinato-deshidrogenasa, por lo que previene la producción de energía interrumpiendo

varias etapas como la germinación de conidios, la elongación del tubo germinativo, el crecimiento del micelio y la esporulación. Piraclostrobina, de la misma familia química, inhibe la respiración mitocondrial. Fluopiram es otro fungicida inhibidor de la succinato-deshidrogenasa, pero este forma parte del grupo de las piridinil-etil-benzamidas. El fluozinam, de las 2,6-dinitroanilinas, funciona inhibiendo la síntesis de ATP.

b) Los que afectan la función del microtúbulo

c) Los que afectan la osmorregulación:

La iprodiona, del grupo de las dicarboximidas, impide la germinación de esporas y el crecimiento de micelio, además de afectar la síntesis de RNA y DNA en la división celular. El fluodioxonil, un fenil-pirrol, interfiere con el transporte de azúcares y aminoácidos en la membrana plasmática fúngica (Romanazzi & Feliziani, 2014).

d) Los que afectan la biosíntesis de metionina:

Ciprodinil, mepanipirim y pirimetanil son ingredientes activos de la familia de las anilino-pirimidinas, que aparte de inhibir la síntesis de metionina, impide la secreción de enzimas hidrolíticas.

e) Los que afectan la biosíntesis del estero:

Dentro de las hidroxi-anilidas, está la fenhexamida y la fenirazamina, que además previenen la elongación del tubo terminal y la elongación del micelio. Otros inhibidores de la síntesis de estero son: los imidazoles, triazoles y la morfolina (Romanazzi & Feliziani, 2014).

En la planta de fresa, los fungicidas se administran en la etapa de floración y hay aplicaciones posteriores varias veces durante el resto del desarrollo hasta antes de la cosecha; la cantidad de aplicaciones depende del intervalo de precosecha, del clima y de las formulaciones utilizadas. En cuanto a la uva de mesa, generalmente se administran cuatro dosis de fungicidas a planta: al final de la floración, durante el cerramiento de racimo, en el envero y 3 semanas antes de la cosecha.

En el caso del kiwi, frutos y planta rara vez muestran síntomas de enfermedad en el huerto, sino que es más común que se presente pudrición peduncular en

el kiwi poscosecha en la etapa de almacenamiento. Se suministra el fluodioxonil en campo, generalmente en la floración, y poscosecha hasta 30 días antes del consumo.

La utilización de los métodos de control químico tiene algunas desventajas, como la reducción de la eficiencia, el alto costo y el impacto negativo que los fungicidas de síntesis química tienen sobre el ambiente (Hooker, 1980). El Comité de Acción contra la Resistencia a Fungicidas (FRAC por sus siglas en inglés) sugiere la disminución del uso de fungicidas a una cantidad limitada por año debido a la resistencia que las cepas de *Botrytis cinerea* comúnmente desarrollan a los fungicidas (cita). El cultivo de fresa no es la excepción: aislados de *B. cinerea* de fresas de Michoacán, evaluados en condiciones *in vitro*, mostraron resistencia a los fungicidas iprodiona y metil-tiofanato (Álvarez-Medina *et al.*, 2017). El benzimidazol ha sido prohibido en muchos países como estrategia contra la resistencia a fungicidas (Romanazzi & Feliziani, 2014).

La frigoconservación y los tratamientos con atmósferas controladas son complementos usados para controlar, en poscosecha, el crecimiento de *B. cinerea* en fresa (Franco-Gaytán *et al.*, 2018), lo que reduce la pérdida de producto en el transporte, almacenamiento y puntos de venta.

1.1.3.2 Métodos alternativos

El uso excesivo de fungicidas sintéticos ha generado diversas problemáticas que involucran la generación de resistencia a los compuestos utilizados y el impacto ambiental que tiene el modelo actual de control de enfermedades en los cultivos. Las siguientes herramientas de control pueden ser utilizadas como complementos de los métodos tradicionales usados contra *B. cinerea*, para incluirlos como parte del manejo integrado de la enfermedad y así disminuir la cantidad de fungicidas utilizados.

1.1.3.2.1 Agentes de control biológico

Se trata principalmente de bacterias y levaduras que actúan como antagonistas del patógeno. Pueden actuar a través de cinco mecanismos: competencia por nutrientes y espacio, antibiosis, parasitismo, inducción de resistencia en el tejido hospedero, o producción de metabolitos volátiles. Existen biofungicidas comercialmente disponibles a base de microorganismos para el control de *B. cinerea*. Algunos de los microorganismos son: *Pseudomonas syringae*, *Cryptococcus albidus*, *Bacillus subtilis*, *Candida sake*, *Pantoea agglomerans*, *Aureobasidium pullulans*, *Candida oleophila*, *Bacillus amyloliquefaciens*, *Metschnikowia fructicola* (Romanazzi & Feliziani, 2014) y *Trichoderma* spp (Agrios, 2005).

1.1.3.2.2 Compuestos de origen natural y compuestos generalmente reconocidos como seguros

Estos grupos incluyen sustancias que no son perjudiciales para el ambiente ni para la salud humana, y que se utilizan por sus propiedades antimicrobianas o por su capacidad de inducir los mecanismos de defensa de la planta.

Entre los compuestos naturales, se encuentran los extractos de plantas y los aceites esenciales de las mismas; ambos han servido para controlar *B. cinerea* poscosecha, y para prolongar la vida de almacenamiento de los frutos y su calidad general, siendo aplicados precosecha y poscosecha (Antunes & Cavaco, 2010). Otros compuestos de origen natural que pueden ser utilizados para el control del moho gris son el quitosano y los benzotiadiazoles, que actúan como inductores de resistencia y han sido reportados por su utilidad para activar la resistencia sistémica contra *B. cinerea* en diferentes hospederos (Romanazzi & Feliziani, 2014).

Las sales inorgánicas son activos agentes antimicrobianos contra una amplia gama de hongos fitopatógenos. Entre ellos están el sodio, el carbonato de potasio, bicarbonato de potasio, cloruro de calcio y propionato de calcio. Su costo es relativamente bajo, tienen alta solubilidad y, utilizados a concentraciones

efectivas no son tóxicos. En la industria alimenticia, ya son usados comúnmente como conservadores en quesos y salsas (Romanazzi & Feliziani, 2014). El bicarbonato de potasio es empleado en la agricultura orgánica, aunque su uso solo está permitido en campo y no en el producto. Esta sustancia ha resultado efectiva para controlar el moho verde y azul en cítricos, y el moho gris (*B. cinerea*) en uvas, pues siendo aplicado antes de la cosecha logra reducir la incidencia de infección poscosecha (Sanzani *et al.*, 2009). El cloruro de calcio ha mostrado resultados que indican la inhibición de crecimiento de moho gris *in vitro*, y también *in vivo*, en fresas y naranjas cosechadas (El-Mougy *et al.*, 2008).

El ácido acético, el agua electrolizada oxidativa y el etanol son sustancias desinfectantes reconocidas como seguras que han sido aplicadas en investigación para el control de *B. cinerea in vivo*. El ácido acético se utilizó como vapor en uvas de mesa ya cosechadas; el agua electrolizada oxidativa (pH de 6.3 a 6.5) ha sido empleada para sumergir duraznos y uvas; y el etanol ha sido aplicado precosecha y poscosecha en uvas. Las tres sustancias anteriores han obteniendo resultados favorables en el combate de *B. cinerea*, lo que sirve para extender el tiempo de almacenamiento de los frutos estudiados (Romanazzi *et al.*, 2012).

1.1.3.2.3 Métodos físicos

Los métodos físicos, por su naturaleza, son aplicados al producto ya cosechado, así que no contribuyen al control de *B. cinerea* en campo, pero sí a extender el tiempo de almacenamiento del producto y a reducir o prevenir pérdidas. Estos métodos pueden ser tratamientos de radiación UV-C, esterilización hiperbárica en frío, tratamientos hipobáricos y exposición a atmósferas controladas (Romanazzi & Feliziani, 2014).

Se ha encontrado que los tratamientos hipobáricos son efectivos para contener la pudrición poscosecha, causada por *B. cinerea*, de fresas, cerezas y uvas de mesa cuando se aplican en combinación con quitosano (Sanzani *et al.*, 2009). El suministro de dosis bajas de ozono a las atmósferas de los lugares de almacenamiento de uvas de mesa ha sido utilizado en California, EUA para la disminución de la propagación del moho gris, sin embargo, según Romanazzi y

colaboradores (2012) aún se necesita investigación respecto a las dosis y aplicada a otros productos agrícolas. Respecto a la esterilización hiperbárica en frío, que consiste en someter las frutas a presiones mayores a la atmosférica, las investigaciones realizadas muestran resultados prometedores en cuanto al control de *Botrytis cinerea* en cereza y uva de mesa, pero estos autores consideran que se debe realizar más investigación acerca de las características organolépticas de las frutas después del proceso.



1.1.4 *Botrytis cinerea* en el cultivo de fresa (*Fragaria x ananassa*)

1.1.4.1. Generalidades de la fresa

La planta de fresa es de tipo herbáceo y perenne, con un sistema radicular fasciculado, y mide máximo 50 cm de altura. Sus flores son blancas, organizadas en cimas; tiene numerosas hojas que se originan en una corona o rizoma muy corto y son la base de crecimiento de la planta. Las altas temperaturas y los días con más de doce horas de luz provocan crecimiento vegetativo excesivo; las bajas temperaturas y los días cortos inducen la floración (SIAP, 2016). La temperatura óptima de crecimiento es entre 15 y 20°C. El fruto se cosecha manualmente, pues es muy sensible y debe tener un adecuado manejo poscosecha.

En un sentido botánico, lo que se conoce normalmente como el fruto de la fresa es en realidad el eterio desarrollado por los receptáculos; el eterio contiene en su superficie a los verdaderos frutos (aquenios). Sin embargo, gastronómica y económicamente, la fresa es considerada un fruto. Pertenece a la categoría de frutos no climatéricos, lo que significa que no pueden ser cosechados antes de alcanzar su madurez.

En el contexto productivo, el 89.78% de las hectáreas sembradas en 2016 (11,092 ha) se encuentran mecanizadas, 65.63% cuentan con tecnología aplicada a la sanidad vegetal y el 87.14% del territorio sembrado cuenta con asistencia técnica. El 56.96% de la producción es de temporal, 0.74% por goteo, 3.54% se realiza con riego por aspersión, 2.98% es por modalidad de gravedad y 0.01% por bombeo. La zona apta para producción de fresa se ubica entre 1300 y 2000 metros sobre el nivel del mar (SAGARPA, 2017).

1.1.4.2 Importancia económica

La fresa tiene gran importancia tanto nutricional como económicamente. Es un producto con un gran éxito en el ámbito internacional. Los requerimientos nacionales de este fruto se satisfacen con la producción interna (SAGARPA, 2017). Además de ser consumida fresca, la fresa se utiliza para diferentes

actividades agroindustriales, tales como fabricación de bases para derivados lácteos, elaboración de mermeladas y ates, procesamiento para venta de congelados, deshidratación para hacer productos gourmet y elaboración de productos de panificación (Zamora, 2018).

En la última década han aumentado las exportaciones mexicanas, principalmente a Estados Unidos: el 52.21% de la producción nacional se destina al mercado externo (253,660 toneladas en 2016). México es el segundo proveedor de fresa fresca en el mercado internacional, con 14.83% del valor de las exportaciones mundiales. En el 2030, se estima un aumento de la demanda mundial de 1,739,120 a 2,388,030 toneladas (34.44%), mientras que la producción nacional de fresa tiene la capacidad de incrementarse de 468,250 a 592,030 toneladas, lo cual representa un crecimiento acumulado de 26.44%. El 87.79% de las importaciones que hizo Estados Unidos de este producto en 2016, provinieron de México, equivalentes a \$650.86 millones de dólares (SAGARPA, 2017)

Los meses con mayor flujo al extranjero son febrero, marzo y abril, aunque los meses con mayor producción son mayo, junio y julio. La planta tiene dos años de producción de frutas de calidad (SAGARPA, 2017). Es importante que se cumplan los requisitos de mantenimiento y mejoramiento de sanidad vegetal de esta fruta, no solo para el consumo interno, sino también para la realización de las exportaciones.

La planta de fresa puede verse afectada por enfermedades causadas por virus, bacterias, hongos y nemátodos. Debido a que los hongos pueden infectar todas las partes de la planta, causando daños severos e incluso la muerte de diferentes tejidos, representan pérdidas económicas importantes, precosecha, durante el transporte y almacenamiento del fruto.

1.1.4.3 Enfermedad en fresa

Botrytis cinerea causa la enfermedad llamada moho gris o podredumbre de la fresa, que es la enfermedad más importante causada por un hongo que ataca a la fresa. A nivel mundial ocasiona pérdidas precosecha y poscosecha. La infección se inicia en el campo durante la floración y permanece quiescente hasta que la fruta madura. Después de la cosecha, la enfermedad es el principal factor limitante en la comercialización de fresa.

Este hongo crece en la planta de fresa en ambientes húmedos y frescos. Puede afectar la fruta, hojas, flores, tallos, raíces, parénquima, tejidos dañados, senescentes y muertos (Petrasch *et al.*, 2019 & Williamson *et al.*, 2007). Una vez cosechada la fresa, la enfermedad se puede manifestar con una capa de micelio gris, o en algunos casos anterior a ese síntoma se produce una mancha color café claro o amarillenta cerca del cáliz.

En los sistemas de producción que tienen varios ciclos de cultivo por año, las flores y frutas de fresa infectadas son importantes fuentes de inóculo de *B. cinerea* para la propagación subsecuente a frutas lesionadas o maduras y hojas lesionada o necróticas (Droby & Lichter, 2007). Al comienzo de la primavera, en las regiones templadas, hay suficiente cantidad de inóculo en el ambiente para la infección (Elmer *et al.*, 2007).

Una clasificación divide los procesos por los cuáles entra en la planta en infecciones primarias y secundarias. Una infección primaria afecta órganos florales durante o después de florecer, permitiendo a las hifas crecer en el receptáculo. Las fuentes del inóculo pueden ser conidios o esclerocios de plantas vecinas infectadas, pétalos, estambres y cálices senescentes infectados. También puede darse en el receptáculo inmaduro de la fruta, cuando esto sucede sigue una fase sin síntomas en que la infección se encuentra aparentemente inactiva (Petrasch *et al.*, 2019).



Figura 1. Síntomas de infección por Botrytis cinerea en el cultivo de fresa.
*Fuente: Petrasch et al., 2019.

Las infecciones secundarias también tienen diferentes fuentes de inóculo, como hojas senescentes y conidios de flores y frutos ya infectados en plantas vecinas que se esparcen e infectan directamente al fruto. En un estado de madurez, las fresas son altamente susceptibles y su deterioro es más rápido. Las infecciones secundarias ocurren sin la presencia de una fase inactiva, es decir, la fase necrotrófica empieza enseguida (Petrasch *et al.*, 2019). Las partes florales senescentes, como los pétalos o estambre, tienden a adherirse a las fresas para retener agua, como resultado de este contacto, surgen más del 64% de las infecciones en fruto. Si sucede esto, basta con ocho horas de adhesión para que los conidios empiecen a germinar (Jarvis, 1962).

1.2 ACEITES ESENCIALES Y EXTRACTOS VEGETALES USADOS CONTRA FITOPATÓGENOS

Existe evidencia de que las plantas tienen funciones biológicas y químicas de defensa, gracias a sus metabolitos secundarios. Algunos de estos metabolitos son compuestos que han sido extraídos y estudiados para poner a prueba su actividad antibacteriana y antifúngica.

Los extractos de plantas, al igual que los aceites esenciales, contienen mezclas de metabolitos secundarios que son biológicamente activos, y tienen propiedades antimicrobianas, alelopáticas, antioxidantes y biorreguladoras. Además, son considerados compuestos no tóxicos a bajas concentraciones, y potencialmente efectivos como plaguicidas para la protección, tanto de cultivos como del producto cosechado (Antunes & Cavaco, 2010). Hay una tendencia creciente hacia encontrar, evaluar, y posteriormente utilizar o sugerir alternativas a los métodos de control químico tradicionales, y es por eso que los extractos vegetales sido investigados como una forma de control fúngico.

Los compuestos con actividad antifúngica generalmente se concentran en las capas celulares externas de las plantas, y pueden ser constitutivos o inducibles, es decir, pueden ser producidos como resultado de estrés biótico o abiótico (Sanzani *et al.*, 2009). El ataque de patógenos entra en la categoría de estrés biótico: por lo que la consecuencia es que las plantas exudan compuestos, a través de la superficie de sus raíces y de sus demás órganos aéreos, lo cuáles tienen una función inhibitoria. Por ejemplo, los exudados fungitóxicos de las hojas de la plantas de jitomate jóvenes se encuentran en una concentración suficiente para inhibir la germinación de esporas de *Botrytis cinerea* (Agrios, 2005).

Un factor que determina la resistencia de los tejidos jóvenes es la existencia de compuestos fenólicos y taninos en altas concentraciones, antes de que haya exposición al patógeno. Muchos de estos compuestos son potentes inhibidores de muchas enzimas hidrolíticas, incluyendo las pectolíticas, que son las enzimas encargadas maceración de la membrana de los fitopatógenos. Además, los tejidos vegetales tienen naturalmente varias proteínas inhibidoras de las enzimas

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

hidrolíticas de patógenos y tienen sus propias glucanasas y quitinasas para degradar las paredes celulares de los patógenos (Agrios, 2005).

Los principales compuestos, contenidos en extractos vegetales y aceites esenciales, que han sido investigados incluyen fenoles, flavonoides, quinonas, terpenos, taninos, alcaloides, lectinas, polipéptidos, saponinas y esteroides. Estas sustancias pueden tener actividad antifúngica o fungistática sobre fitopatógenos, o crear condiciones desfavorables para el establecimiento y multiplicación de estos en los hospederos (Zaker, 2016).

A continuación se mencionan algunos ejemplos de los compuestos derivados de plantas que han sido estudiados como fungicidas. El salicilato de metilo y el benzaldehído, que son naturalmente producidos por el durazno en su etapa de maduración, tienen actividad antifúngica contra *B. cinerea* y *Monolinia fructicola* (Wilson *et al.*, 1997). Se ha demostrado que los jasmonatos, hormonas producidas por las plantas, tienen la capacidad de proteger a la papa y al jitomate de infecciones cuando son aplicados como tratamiento, y reducir el deterioro y la incidencia de pudrición fúngica en cosechas como fresa, rosas, uvas y pimiento morrón. Esto se logra debido a que los jasmonatos modifican los mecanismos de respuestas defensivas de las plantas al activar genes de defensa (El-Ghaouth *et al.*, 2002). Los isotiocianatos son un grupo de sustancias antifúngicas, con más de 130 compuestos diferentes, que muestran perspectivas interesantes para su aplicación poscosecha. Este grupo de compuestos se encuentran principalmente en la especie de la familia de las crucíferas (Sanzani *et al.*, 2009).

La volatilidad de algunas de las moléculas presentes tanto en extractos vegetales como en aceites esenciales hace que sean considerados para aplicarse a frutas y verduras como tratamientos de vapor antes del almacenamiento mediante un proceso llamado biofumigación. Sin embargo, los compuestos volátiles normalmente tienen un olor fuerte y es posible que sean absorbidos por la fruta fresca alterando su sabor y olor. Entonces, la evaluación de las características organolépticas de los frutos que sean sometidos a tratamiento debe ser parte fundamental para identificar una estrategia de control que sea aplicable a nivel práctico. (Sanzani *et al.*, 2009). Por ello es importante que las series de

investigaciones encuentren dosis que no solo sirvan para el control fúngico pero que no interfieran con la experiencia del consumidor, no sean fitotóxicas y sean seguras para el consumo humano.

1.2.1 Efectividad de los aceites esenciales y extractos vegetales usados contra *Botrytis cinerea*

Se ha demostrado que algunos extractos de plantas son capaces de inhibir el crecimiento del patógeno *Botrytis cinerea*. Ha sido reportado que se puede disminuir la pudrición en fresas y la descomposición en general, si son tratadas con acetaldehído, benzaldehído y otros 15 compuestos volátiles propios de la fresa madura. Estos tratamientos también funcionaron para otros hongos que atacan la cereza, la manzana y cítricos (El-Ghaouth *et al.*, 2002).

Aunque la actividad antifúngica de muchos extractos vegetales está documentada, la relación dosis-respuesta del efecto inhibitorio varía ampliamente, pues depende de si se trabaja con un aceite esencial o con un extracto, así como de la técnica de extracción y de la metodología del ensayo antifúngico (Rattanapitigorn *et al.*, 2006). La parte de la planta de la cual se hace la extracción también afecta la composición del extracto: en general, los extractos de tallos suelen ser más eficaces que los de hojas y flores (Sanzani *et al.*, 2009). Sin embargo, esto puede variar según la especie, por ejemplo, los extractos florales de *Lantana camara*, *Hibiscus rosa-sinensis* y *Malvaviscus arboreus* mostraron ser más efectivos contra *B. cinerea* que los extractos a partir de hojas o tallos, debido a la diferencia en los componentes volátiles presentes (Boughalleb *et al.*, 2005). Esta alta variabilidad en la composición y concentración de las sustancias activas tiene que ser tomada en cuenta en el proceso de estandarización cuando se busque la formulación de productos a partir de extractos vegetales.

Otra sustancia que ha mostrado actividad antifúngica contra *B. cinerea*, y que se encuentra en muchos productos vegetales, es el trans-2-hexenal, un compuesto aromático cuya producción aumenta rápidamente cuando los tejidos vegetales son lesionados (Sanzani *et al.*, 2009).

En un ensayo que evaluó la actividad antifúngica de 345 extractos vegetales y 49 aceites esenciales contra *B. cinerea in vitro*, los resultados arrojaron que los aceites que tuvieron la mayor inhibición de germinación de esporas fueron: palmarosa (*Cymbopogon martini*), tomillo salsero (*Thymus zizis*), clavo (*Eugenia caryophyllata*) y hoja de canela (*Cinnamomum zeylanicum*). Los siguientes extractos de plantas, que incluyen en su mayoría especies del género *Capsicum* y *Allium*, mostraron una alta actividad antifúngica contra *B. cinerea*: ajo sachá (*Adenocalymma alliaceum*), tulba (*Tulbaghia violacea*), chile habanero (*Capsicum chinense*), chile Tabasco (*C. frutescens*), 6 variedades de *C. annum*, ajo (*Allium sativum*), ajo de montaña (*A. ramosum*), y ajo elefante (*A. ampeloprasum*) (Wilson *et al.*, 1997).

Bouchra y colaboradores (2003) concluyeron que los aceites esenciales de *Thymus glandulosus* (tomillo de invierno) y *Origanum compactum* (orégano de Marruecos) mostraron la mayor inhibición de crecimiento micelial *in vitro* cuando fueron comparados con los aceites de otras cinco plantas (calaminta, cantahueso, poleo, romero y conservilla). También determinaron que el aceite de *Thymus glandulosus* está constituido principalmente de timol (43.2%) mientras que el aceite de *Origanum compactum*, de carvacrol (58.1%), que es un isómero del timol. Ambos aceites tuvieron como segundo constituyente el p-cimeno, con un porcentaje de 35.7% y 11.4%, respectivamente.

B. cinerea, aislado de jitomate, mostró una inhibición completa del crecimiento *in vitro* cuando se expuso a los compuestos volátiles de los aceites esenciales de *Origanum vulgare* L. (orégano), *Thymus vulgaris* L. (tomillo), *Coriandrum sativum* L. (cilantro) y *Cymbopogon citratus* L. (zacate de limón). Cuando el tratamiento consistió en la incorporación del aceite esencial al medio de cultivo, el aceite de cilantro no tuvo actividad fungicida. Solo los aceites de tomillo y orégano lograron inhibición de la enfermedad en jitomates inoculados, aplicando el tratamiento de inmersión; mientras que en el tratamiento de vapor *in vivo* ningún aceite tuvo actividad fungicida (Plotto *et al.*, 2003).

La producción de esporas *in vitro* de *B. cinerea* se redujo notablemente con aceite esencial de zacate limón o té de limón (*Cymbopogon citratus* L.) (Tzortzakis *et al.*, 2007). El aceite esencial de las partes florales de *Silene*

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

armenia L. (papamoscas) tuvo un efecto antifúngico de moderado a alto contra *B. cinerea* *in vitro*. Los principales componentes de este aceite esencial son 1-buteno, 2-buteno, metilciclopropano y óxido de cariofileno. Asimismo, también fueron evaluados los extractos de hojas secas de la misma especie, utilizando metanol, cloroformo, hexano y acetato de etilo como solventes. El extracto metanólico de *S. armenia* L. fue el que tuvo una mayor inhibición de crecimiento micelial de *B. cinerea* (Bajpai *et al.*, 2008).

Los aceites esenciales de hojas fresas de *Chenopodium ambrosioides*, *Eucalyptus citriodora*, *Eupatorium cannabinum*, *Lawsonia inermis*, *Ocimum canum*, *O. gratissimum*, *O. sanctum*, *Prunus persica*, *Zingiber cassumunar* y rizomas de *Z. officinale* tuvieron 100% de inhibición de *B. cinerea* *in vitro*. Los aceites con la más baja concentración mínima inhibitoria fueron *O. sanctum*, *P. persica* y *Z. officinale*, además de retrasar la pudrición y alargar la vida de almacenamiento de uvas inoculadas con moho gris (Tripathi *et al.*, 2007).

Fielding y colaboradores (2015) evaluaron 8 extractos de plantas medicinales sudafricanas contra *B. cinerea*; los extractos metanólicos de bulbos de *Hypoxis hemerocallidea* (pasto estrella africano) y hojas secas de *Galenia africana* evaluados *in vitro* fueron los que mostraron los mejores datos de inhibición del crecimiento del hongo, tanto en los tratamientos con los extractos solos como en las combinaciones con el fungicida comercial metil-kresoxim. El efecto que tuvo la combinación fue aditivo en el caso de *G. africana* y sinérgico para *H. hemerocallide*. En cuanto a los tratamiento aplicados a manzanas inoculadas, únicamente el extracto de *G. africana* obtuvo alta inhibición en el ensayo solitario y en combinación, mientras *E. rhinocerotis*, *H. hemerocallidea*, *S. frutescens*, *T. alliacea* y *T. violacea* lograron una buena inhibición en combinación con metil-kresoxim, por el efecto sinérgico.

1.3 EL JENGIBRE (*Zingiber officinale*)

El jengibre pertenece a la familia *Zingiberaceae*, es una especie originaria del sureste asiático. Es una planta perenne monocotiledónea que se forma de un rizoma subterráneo del que parten vástagos aéreos en posición oblícua. La planta puede alcanza hasta un metro de altura, su follaje es de color verde pálido, el peciolo es corto, la lámina es puntiaguda al ápice, tiene hojas alternas, que están bien espaciadas, y una vaina envolvente que termina en una lígula pequeña (León, 2000; Pandey *et al.*, 1993).

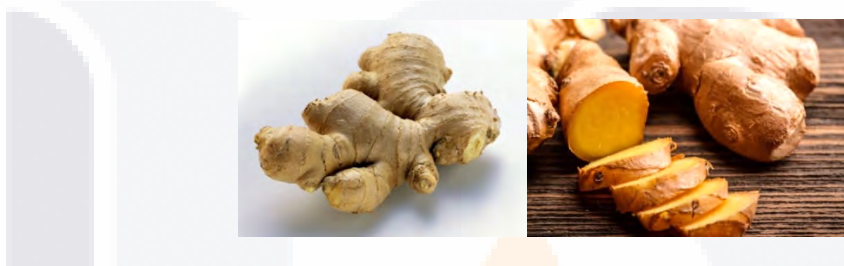


Figura 2. Rizoma de jengibre.

Fuente: Secretaría de Agricultura y Desarrollo Rural.

Los rizomas del jengibre tienen forma irregular y miden alrededor de 10 cm de largo, pero puede ser más grandes (Pandey *et al.*, 1993). Tiene tallos monopodiales con nudos prominentes, que son las bases de las hojas escamiformes. La planta de jengibre se conforma de tres partes esenciales: las capas de corcho; la región cortical, que contiene oleoresinas; y el cilindro central, rico en almidón, oleoresinas, hierro, fósforo, tiamina, riboflavina, niacina y ácido ascórbico. Las capas de corcho forman de 4 a 8 estratos de células de parénquima alargadas, que se renuevan constantemente y dan el aspecto seco característico de la parte superficial del jengibre. La región cortical se constituye por un tejido básico de parénquima, oscuro y grisáceo, que contrasta con el cilindro central de color amarillento (León, 2000).

Tanto en el sector médico como en el alimenticio, el jengibre ha sido ampliamente estudiado. Se utiliza en la gastronomía como condimento, ya sea en polvo o fresco para platillos, y en bebidas calientes como infusión de jengibre. Su consumo se relaciona con propiedades antiespasmódicas y antidiarreicas (OMS, 1999), así como capacidad antioxidante (Stoilova *et al.*, 2007; Yeh *et al.*, 2014). El extracto de jengibre tiene actividad antimicrobiana, actividad protectora

del hígado y riñones, es larvícida, puede funcionar como analgésico, antiinflamatorio e inmunomodulador (Kumar *et al.*, 2011). Tiene actividad antibacteriana moderada contra bacterias gram-positivas, como *Bacillus licheniformis*, *Bacillus spizizenii* y *Staphylococcus aureus*, y gram-negativas, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas stutzeri* (Sivasothy *et al.*, 2011), y *Pseudomonas aeruginosa* (Mao *et al.*, 2019). Pero sus beneficios no se limitan a la salud humana sino que tiene ciertas propiedades útiles sobre especies vegetales.

Los aceites esenciales, oleorresinas y extractos vegetales de jengibre han demostrado tener propiedades antifúngicas. La actividad antimicrobiana del producto es dependiente de la composición química del jengibre, del tratamiento previo que se le aplique y de la metodología de extracción, así como del microorganismo en cuestión (Beristain-Bauza *et al.*, 2019)

1.3.1 Composición química del jengibre

La composición química del jengibre depende de diferentes factores como la variedad, las condiciones de almacenamiento, y el manejo agronómico, pero por lo general tiene 90% de agua, el 12.3% son carbohidratos, 2.4% es fibra, 2.3% de proteínas, 1.2% de minerales, entre ellos potasio, calcio, fósforo, sodio y hierro, y 0.9% de lípidos (Beristain-Bauza *et al.*, 2019).

Existen más de 100 compuestos detectados en el extracto de jengibre, entre ellos monoterpenos, sesquiterpenos, ácidos carboxílicos (Nobrega *et al.*, 1997), cetonas, aldehídos, alcoholes y ésteres (Beristain-Bauza *et al.*, 2019). Los principales ácidos carboxílicos presentes son ácido oxálico y ácido tartárico, y algunos de los sesquiterpenos son zingibereno, α -curcumina y farneseno (Yeh *et al.*, 2014). También contiene compuestos fenólicos como 6-gingerol (Stoilova *et al.*, 2007), 8-gingerol, 10-gingerol y 8-paradol (Mao *et al.*, 2019).

Los gingeroles son el grupo de moléculas responsables de la característica pungencia del jengibre, y se pueden convertir en shogaoles y en zingerona cuando el jengibre es expuesto a calor o es secado, por lo que se pierde la pungencia, y su aroma se vuelve dulce aunque con cierto picor (Beristain-Bauza

et al., 2019). El jengibre seco tiene mayor capacidad antioxidante que el fresco, debido a un mayor número de compuestos fenólicos (Mao *et al.*, 2019).

1.3.2 Composición química de los extractos, aceites y oleorresinas de jengibre

Los compuestos fenólicos como eugenol, shogaoles, zingerona, gingerdiones y gingeroles, y su relación sinérgica con otros compuestos como beta-sesquifelandreno, cis-cariofileno, zingibereno, farneseno, α y β -bisaboleno, son los principales responsables de la acción antimicrobiana que los extractos vegetales, aceites esenciales y oleorresinas de jengibre tienen contra diferentes microorganismos. La mayoría de los compuestos anteriores no son solubles en agua, por lo que extractos acuosos tienden a ser menos efectivos (Beristain-Bauza *et al.*, 2019).

Existen varias formas en que estos diferentes productos manifiestan su actividad fungicida, dependiendo de las moléculas presentes. Se ha atribuido la actividad antimicrobiana del extracto de jengibre a la presencia de sesquiterpenoides, zingibereno, β -sesquifelandreno, β -bisaboleno y α -farneseno. En oleorresinas se han reportado como componentes principales eugenol, zingerona y tras-6-gingerol (Beristain-Bauza *et al.*, 2019).

El eugenol está presente tanto en los extractos vegetales, como en las oleorresinas y aceites esenciales, pero la concentración es distinta. El aceite esencial de jengibre y las oleorresinas tienden a tener una alta concentración de eugenol (Beristain-Bauza *et al.*, 2019). Este compuesto y algunos de sus derivados han sido estudiados por su actividad fungicida contra *B. cinerea*. La actividad antifúngica del eugenol se atribuye a la alteración de la membrana fúngica de dos maneras: la acumulación de eugenol en la bicapa fosfolipídica que modifica la fluidez y aumenta la permeabilidad, y además el eugenol afecta la función de enzimas y proteínas de la membrana (Olea *et al.*, 2019).

Un estudio que comparó el aceite esencial obtenido de jengibre fresco con el de jengibre seco mostró que el componente principal de ambos fue zingibereno. El aceite de jengibre fresco tiene una concentración más alta de compuestos

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

oxigenados (29.2%), tales como geranial, 1, 8-cineol, geranial, borneol y α -terpineol, en comparación con el aceite extraído de jengibre seco, que además tiene porcentajes de compuestos oxigenados más bajos (14.4%) (Sasidharan *et al.*, 2010). Los compuestos oxigenados son los fenoles, cetonas, aldehídos, ácidos carboxílicos, alcoholes y ésteres. Estas moléculas pueden provocar fugas de sustancias críticas e inhiben la respiración y el transporte de iones (Beristain-Bauza *et al.*, 2019). Sin embargo, el jengibre fresco tiene mayor cantidad de compuestos fenólicos, por lo que tiene una mayor actividad antioxidante que el fresco (Mao *et al.*, 2019).

Los compuestos hidrófobos del aceite esencial de jengibre (extraído de jengibre fresco o jengibre seco) interactúan con la parte lipofílica de la membrana y mitocondrias aisladas, alterando su integridad y funciones (Beristain-Bauza *et al.*, 2019).

1.3.3 Extracción de aceites, extractos y oleorresinas de jengibre

Existen varios métodos de obtención de extractos vegetales, aceites esenciales y oleorresinas de jengibre, dependiendo del solvente utilizado, la temperatura, el tiempo de extracción y el equipo. Los solventes pueden ser, entre otros, etanol, agua, metanol, cloroformo, isopropanol, hexano, acetona, etil acetato o mezclas hidroalcohólicas. El proceso puede ser a temperatura ambiente o con calentamiento.

Los métodos extractivos para obtener extractos vegetales más empleados son: maceración y extracción Soxhlet.

- Extracción por maceración. Este es un método de extracción sólido-líquido del tipo discontinuo. El material vegetal, ya sea fresco, seco, en trozos o en polvo, se coloca en recipientes adecuados y se añade el solvente seleccionado según su polaridad o el tipo de compuestos que se necesiten extraer. Se deja reposar, con o sin agitación, ya sea a temperatura ambiente o con alguna fuente de calor, por un tiempo determinado. Después se filtra y las sustancias de interés quedan disueltas en el disolvente (Rivas-Morales *et al.*, 2016).

- TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS
- Extracción por Soxhlet. Método de extracción sólido-líquido, es un proceso continuo de reflujo automático. El material vegetal, que se puede utilizar fresco, seco, en trozos o en polvo, se coloca dentro de un dedal de papel filtro grueso (cartucho) que se carga en la cámara principal del extractor Soxhlet. El equipo Soxhlet se compone, arriba abajo, de un matraz, una cámara de extracción y un refrigerante. El solvente se coloca en el matraz, que se calienta a su temperatura de ebullición, sube por el tubo de ascenso de vapores que está en la parte lateral de la cámara de extracción y llega al refrigerante o condensador. En el condensador los vapores de solvente vuelven a su fase líquida y caen, gota a gota, dentro del cartucho con el material vegetal, donde los compuestos de interés se van disolviendo en el solvente, y esta mezcla se va acumulando en la cámara de extracción hasta que llega a cierto nivel que causa que el líquido se vaya por el sifón de regreso al matraz continuar otro ciclo o flujo. Al final se recupera el líquido del matraz y ese es el extracto vegetal sin concentrar (Rivas-Morales et al., 2016; Zhang et al., 2018). Es un método que tiene una alta eficiencia de extracción y que requiere menos tiempo y consumo de solvente que la maceración, aunque incrementa las posibilidades de degradación de compuestos según la temperatura y tiempo de extracción (Zhang et al., 2018).

La extracción por arrastre con vapor de agua se emplea principalmente para extraer aceites esenciales. Es un tipo de destilación que permite la separación de sustancias insolubles en agua y ligeramente volátiles, de otras sustancias no volátiles, utilizando vapor saturado a presión atmosférica. Se usa un aparato de destilación al vapor que se compone por tres matraces y un refrigerante, o bien una versión que es un sistema cerrado, como el aparato Clevenger para hidrodestilación (Rivas-Morales *et al.*, 2016).

La extracción por fluidos supercríticos es un método que utiliza fluidos supercríticos como solvente. El dióxido de carbono supercrítico es ampliamente utilizado debido a su baja temperatura crítica (31°C) y su capacidad para extraer compuestos termolábiles (Rivas-Morales *et al.*, 2016). Mediante la extracción de compuestos del jengibre con CO₂ supercrítico se obtienen principalmente

aldehydos y alcoholes terpénicos, tales como: citronelal, citral, linalol, borneol, alfa-terpineol, nerol, linalol, alfa-bisabolol y longipinocarveol (Reyes-Nájjar *et al.*, 2011).

La oleorresina de jengibre se puede obtener por medio de extracción por fluidos supercríticos y por algunos tipos de maceración con solventes orgánicos. Tal es el caso de las oleorresinas extraídas por Nobrega y colaboradores (1997) que emplearon tres diferentes métodos para obtener oleorresinas: utilizando CO₂ líquido; maceración con agitación y aplicación de calor empleando etanol e isopropanol.

La actividad antifúngica que tenga el aceite esencial, el extracto vegetal y la oleorresina depende de varios factores: la composición química del jengibre, si antes es sometido a algún proceso como secado o salado, la metodología de extracción, y el solvente o la mezcla de solventes involucrados. Según esas condiciones y procesos tendrán composiciones diferentes, pues esos factores tienen un papel importante en la síntesis, degradación y extracción de compuestos bioactivos (Beristain-Bauza *et al.*, 2019).

1.3.4 Uso de productos del jengibre contra hongos fitopatógenos

Los aceites esenciales y los compuestos hidrosolubles que se extraen de los rizomas del jengibre pueden combinarse con otros métodos con la finalidad de controlar pudriciones poscosecha de frutas y hortalizas. Diversas investigaciones se han realizado al respecto.

Los compuestos en el aceite esencial de jengibre tienen propiedades lipofílicas que vuelven la pared celular y la membrana de los hongos más permeable, afectando la integridad de estos y alterando funciones celulares (Beristain-Bauza *et al.*, 2019 & Mao *et al.*, 2019). Los compuestos oxigenados pueden conducir a fugas de moléculas críticas para el metabolismo de hongos y bacterias, pero los hongos son más sensibles a los compuestos de jengibre que las bacterias, según la revisión de Beristain-Bauza y colaboradores (2019).

1.3.5 Uso de aceites esenciales y extractos de jengibre contra *Botrytis cinerea*

Está reportado que los aceites esenciales de jengibre, en condiciones *in vitro*, sirven como inhibidores de *Botrytis cinerea* (Alvarado *et al.*, 2011; Hussein, K. & Joo, J., 2018), *Monilinia fructicola* (Alvarado *et al.*, 2011), *Fusarium oxysporum*, *Sclerotinia sclerotum* (Hussein, K. & Joo, J., 2018) y *Aspergillus flavus* (Moon *et al.*, 2018).

Singh *et al.* (2008) demostraron que el extracto de jengibre, obtenido de dos formas distintas, por hidrodestilación y método Soxhlet, inhibió *Fusarium moniliforme*, gracias al geranial, eugenol y zingerona presentes. Este patógeno que afecta el maíz, también es conocido como *Fusarium verticillioides*. En otra investigación sobre este último hongo, se encontró que α -zingiberena y geranial fueron los principales componentes en el aceite esencial utilizado contra este hongo. La reducción en la síntesis del ergosterol se relaciona con el efecto antifúngico de dos maneras: los monoterpenoides conducen a la síntesis de ergosterol pues inducen la peroxidación en la membrana del hongo, pero a altas concentraciones de este compuesto se interrumpe la biosíntesis. Estos compuestos redujeron la síntesis de ergosterol, lo que debilitó la membrana fúngica y alteró la función de algunas de las proteínas que ahí se encuentran (Yamamoto-Ribeiro *et al.*, 2013).

En un estudio para controlar *Aspergillus flavus*, se determinó que el aceite esencial de jengibre funcionó como inhibidor y redujo la síntesis de aflatoxinas, gracias a los compuestos isoborneol, terpineno y citral (Moon *et al.*, 2018). Extractos de jengibre obtenidos por hidrodestilación mostraron efectos controladores *in vitro* del crecimiento de *Moniliophthora roreri*, que afecta importantemente el cultivo de cacao (Ramírez *et al.*, 2011; Joya-Dávila *et al.*, 2015).

La proteína antifúngica SU2 aislada por Wang y Ng (2005) de los rizomas de jengibre, es capaz de inhibir la formación de micelio de *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum*, *Mycosphaerella arachidicola* y *Physalospora piricola*.

La concentración mínima inhibitoria de aceite esencial de jengibre contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Alternaria panax*, reportada por Hussein y Joo (2018), fue de 0.3%. La concentración que inhibe *Sclerotinia sclerotiorum* y *Cylindrocarpon destructans* es de 0.1%.

El extracto de jengibre en concentración de 0.4 mg/mL tuvo un 36.13% de inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea*, y en combinación con la vainillina (0.625 mg/mL) se presentó un efecto sinérgico (Rattanapitigorn *et al.*, 2006).

El aceite esencial de jengibre (*Zingiber officinale* Rosc.) mostró actividad fungitóxica absoluta contra *B. cinerea in vitro*, y en uvas retrasó la aparición de síntomas de pudrición 10 días, además de alargar la vida de almacenamiento de éstas 6 días, sin que la fruta presentara ningún efecto fitotóxico (Tripathi *et al.*, 2007).

Atarés y colaboradores (2010) desarrollaron y caracterizaron películas comestibles de microemulsiones de aceite esencial de jengibre sobre frutas y otro alimentos, combinadas con porcentajes muy pequeños de aislados de proteína de soya, que tiene buenas propiedades mecánicas. Una alta concentración de aceite esencial de jengibre afecta el sabor de los alimentos sobre los que es aplicada la película o cubierta, además de otras características sensoriales como textura y color (Beristain-Bauza *et al.*, 2019). Esto puede ser una desventaja dependiendo del producto, pero también puede utilizarse como una ventaja si el perfil de sabor de la fruta permite una buena combinación y si se comercializa de forma adecuada; además, si las concentraciones requeridas para tener un efecto antifúngico no conducen a un gran cambio en el sabor, esto no será problema. Para determinar si podría ser viable o no el recubrimiento de fresas con aceite esencial de jengibre, sería importante realizar pruebas sensoriales para conocer la aceptación de las personas y su reacción.

Son necesarios más estudios respecto a la toxicidad, tanto de aceites esenciales, como de extractos, alcohólicos e hidroalcohólicos, así como oleorresinas y polvos, en diferentes frutos y hortalizas contra *B. cinerea*. (Beristain-Bauza *et al.*, 2019).

1.4 QUITOSANO

El quitosano es un biopolímero que está emparentado químicamente con la quitina (poli β -N-acetil-glucosamina) y el segundo polisacárido más abundante en la naturaleza. La quitina se convierte en quitosano, que es una poli (β -N-acetil-glucosamina-co- β -glucosamina)) mediante una reacción incompleta de desacetilación. Se le llama quitosano cuando al menos el 50% de sus grupos acetilo se eliminan; si el grado de desacetilación alcanza el 100% el polímero se conoce como quitano.

Las principales aplicaciones del quitosano son en agricultura, producción de gasas y vendajes, en el tratamiento de aguas para remover materiales pesados, en la industria cosmética como ingrediente en productos hidratantes, como biosensores para glucosa en la sangre humana (Lárez, 2006). El quitosano es considerado biodegradable y biocompatible, sin toxicidad ni efectos secundarios (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009).

1.4.1 Fuentes y método de extracción

En las paredes celulares de algunas plantas y hongos el quitosano se encuentra de manera natural, pero no utilizable. La producción a gran escala de quitosano se realiza mediante la desacetilación de la quitina. Dicho proceso puede hacerse por medio de reacciones químicas o enzimáticas, siendo las primeras las más comunes. Las principales fuentes de quitina son los exoesqueleto de los crustáceos, las paredes celulares de los hongos, las algas y las alas de insectos como escarabajos o cucarachas. La producción industrial de este biomaterial tiene como base principalmente a camarones, langostas, cangrejos y krill, debido a que sus caparazones y conchas son desecho de las plantas procesadoras de estas especies (Lárez, 2006 & Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009).

El proceso inicia con la recepción de la materia prima, que se descarna, se limpia y secan para molerse. Después de la molienda de los exoesqueletos comienza un proceso de desmineralización utilizando un ácido en solución, como ácido clorhídrico. La desmineralización puede ir antes o después de la

desproteínización. Para la desproteínización se emplea una base, generalmente hidróxido de sodio. Tras estos dos procesos se obtiene la quitina, a la que se le realizará la desacetilación (Giraldo, 2015; Velasco *et al.*, 2019), que es la hidrólisis de los grupos acetilo.

El método de obtención más utilizado para convertir quitina en quitosano es la reacción de N-desacetilación alcalina (Aiba & Muraiki, 1998). La N-desacetilación alcalina, se realiza mediante el tratamiento directo de la quitina con una solución concentrada de hidróxido de sodio o hidróxido de potasio, al 40 o 50%, a una temperatura elevada, que varía dependiendo de la fuente (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009).

Muzzarelli (1977) reportó que el contenido de los acetilos debe encontrarse alrededor de un 40 % para lograr una mayor actividad biológica. De acuerdo con Bautista-Baños (2017) el grado de desacetilación tiene gran influencia en la actividad antimicrobiana del quitosano, ya que el número de grupos amino libres en esta molécula se ha relacionado con esta actividad.

1.4.2 Uso del quitosano como fungicida

Varios autores han sugerido explicaciones sobre el modo de acción del quitosano. Ha exhibido actividad contra hongos filamentosos, levaduras, bacterias y virus. Sus resultados han sido favorables tanto *in vivo* como *in vitro*.

La presencia de grupos amino en la estructura química del quitosano le confieren propiedades útiles para la conservación y seguridad de los alimentos (Bautista-Baños *et al.*, 2017). Algunos autores señalan que la propiedad bactericida y fungicida del quitosano es debida a la interacción entre las cargas catiónicas de los grupos amino del quitosano y las cargas electronegativas que se encuentran en las membranas fúngicas y bacterianas. Esta interacción electrostática tiene efecto en la permeabilidad celular de los microorganismos patógenos y depende de la composición de la membrana plasmática. Puede haber afinidad elevada en membranas sensibles que contienen ácidos grasos poliinsaturados (Dutta *et al.*, 2009, Palma-Guerrero *et al.*, 2010).

La inhibición del crecimiento es causada por los grupos aminos protonados del quitosano a pH 5.6 que forman complejos poli-electrolíticos con los grupos ácidos y básicos de la superficie celular de los hongos (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009). Se sugiere que la interacción entre la carga positiva de la molécula de quitosano y la carga negativa de las células de la membrana plasmática conduce a la salida de proteínas y otros constituyentes intracelulares (Chen *et al.*, 1998).

Según El-Ghaouth y col. (1992), la propiedad fungistática del quitosano parcialmente acetilado se relaciona con la inducción de cambios morfológicos en la pared celular y reducción en el tamaño de las hifas y ramificaciones, debido a que el quitosano puede causar la formación de poros en la membrana plasmática de las hifas que alteran el balance entre biosíntesis y degradación de componentes de la pared celular. La sensibilidad de los hongos patógenos hacia el quitosano puede cambiar en los diferentes estadios de su desarrollo (Rodríguez-Pedroso, *et al.*, 2009).

El quitosano ha sido usado como recubrimiento en diversas frutas para poder conservarlas por más tiempo y para controlar enfermedades. Ha sido útil en la conservación de la fresa y jitomate, que han sido cubiertos con una película de quitosano en diversas investigaciones, mejorando además la calidad e incluso ha logrado controlar pudriciones (Devlieghere *et al.*, 2004 & Hernández-Muñoz *et al.* 2008). También la fruta ojo de dragón (*Dimocarpus longan*) se ha beneficiado de tratamientos de 0.5%, 1% y 2% de quitosano, reduciendo su actividad respiratoria, atarsando cambios en color y calidad, inhibiendo el deterioro de la fruta incluso en condiciones de alta humedad (90%) y aumentando la vida de anaquel en general.

Tratamientos con quitosano controlaron el pudrimiento poscosecha provocado por *Botrytis cinerea*, *Penicillium expansum*, *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum* en una variedad de frutas (El-Ghaouth *et al.*, 2002).

En otro estudio se encontró que el quitosano a concentraciones menores del 1% tiene un efecto negativo en la esporulación de *Botrytis cinerea* y *Penicillium expansum*, al punto de disminuir considerablemente la cantidad de conidios (Alvarado *et al.*, 2011).

En experimentos en los que los frutos fueron expuestos a diferentes temperaturas, Badawy y Rabea (2009) demostraron que el quitosano aplicado en concentraciones de 2 a 4 g/ml tiene completo control de infecciones de *Botrytis cinerea* en jitomates inoculados por herida. En los estudios *in vitro* observaron que el efecto antifúngico del quitosano fue mayor entre menor peso molecular tenía.

El quitosano sobre frutos forma una película semipermeable que regula el intercambio gaseoso y reduce la transpiración. Muchos frutos, incluyendo la ciruela mexicana, el aguacate, la papaya y la pitaya, se han beneficiado con tratamientos de quitosano. La combinación con otros métodos de control puede prolongar la vida de almacenamiento de productos hortícolas importantes, en gran parte, debido a la disminución de la incidencia de microorganismos (Bautista-Baños *et al.*, 2017).

El compósito quitosano/octanoato de sodio tiene un efecto sinérgico, mejorando los resultados en el control de *B. cinerea* (Sandoval *et al.*, 2018). Para el control de enfermedades poscosecha, también se reporta el uso de sales inorgánicas en combinación con quitosano para reducir la infección por hongos. (Bautista-Baños *et al.*, 2017) Recientemente se sugirió que el quitosano podría interactuar mediante puentes de hidrógeno con los terpenos de los aceites esenciales afectando la actividad antifúngica de las mezclas (Alvarado *et al.*, 2011)

Romanazzi y colaboradores (2001) observaron que quitosano a una concentraciones bajas mostró actividad antifúngica contra *Botrytis cinerea* en fresa. Perdonés *et al.* (2012) reportaron un incremento de la actividad antifúngica del quitosano al añadir aceite esencial de limón en pruebas *in vitro*, así como un retraso en la aparición de síntomas y una menor incidencia de *B. cinerea* en fresas almacenadas a bajas temperaturas inoculadas con el hongo, a las que se les aplicó un recubrimiento de aceite esencial de limón con 1% de quitosano de alto peso molecular. También concluyeron que esta mezcla puede extender la vida de anaquel de las fresas.

Se inhibió el crecimiento de hongos *in vitro* con aceites esenciales, ya sea por contacto directo o vapor. Se ha confirmado que existe un efecto sinérgico entre el quitosano y los aceites esenciales; especialmente con limón, tomillo,

bergamota, clavo de olor y canela. Los hongos como *B. cinerea*, *C. gloeosporioides*, *P. digitatum* y *Phytophthora drehsleri*, levaduras y mohos, en fresas, higos, aguacates, pepinos, mandarinas y uvas de mesa, se redujeron y en algunos casos se retrasó la aparición de los síntomas después de aplicar aceite esencial y quitosano (Bill *et al.*, 2014).

1.4.3 Mecanismos de inducción de la defensa de las plantas por quitosano

Se ha estudiado el modo de acción *in vivo* del quitosano y se ha encontrado que además de interferir en la membrana del patógeno, el quitosano induce en las células vegetales resistencia sistémica a infecciones (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009).

Las plantas tienen la capacidad natural de defenderse de los agentes fitopatógenos a través de un fenómeno biológico conocido como resistencia, siendo la susceptibilidad una excepción a lo que naturalmente ocurre (Agrios, 2005). Los inductores son sustancias que promueven respuestas de defensa cuando son aplicados a los tejidos de las plantas o cultivos celulares de éstas. Los inductores pueden ser oligosacáridos, glicoproteínas, péptidos y lípidos, siendo los más estudiados los oligosacáridos, que incluyen oligoglucanos, oligoquitinas, oligoquitosanos y ácidos oligalacturónicos (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009).

Las proteínas relacionadas con la patogenicidad son un grupo heterogéneo de proteínas solubles inducidas en muchas especies de plantas en situaciones patológicas o relacionadas con otros tipos de estrés. Son proteínas de bajo peso molecular, solubles en pH ácidos y resistentes a la proteólisis. Se han reconocido hasta el presente 10 familias de éstas, y al menos tres presentan actividad enzimática: quitinasa, glucanasa y peroxidasa. Los miembros de estas familias se encuentran presentes en muchas especies vegetales (Van Loon *et al.*, 1999).

El quitosano activa la síntesis de lignina y calosa, la inducción la fenilalanina amonio liasa (PAL), la biosíntesis de fitoalexinas, y la producción de inhibidores de proteasas y proteínas relacionadas con la patogenicidad, como las quitinasas,

glucanasas, peroxidasas y quitosanasas (Rodríguez-Pedroso *et al.*, 2009). La resistencia inducida y adquirida no evita la aparición de la enfermedad, sino que bien reduce su severidad (Delgado-Oramas, 2020). La respuesta hacia el patógeno depende además de la especie de éste y de la del hospedero.



1.5 COMBINACIONES DE SUSTANCIAS CON ACTIVIDAD FUNGICIDA

Las mezclas de fungicidas sintéticos han sido utilizadas para el control de enfermedades en campo desde hace varias décadas. Una de las razones por las que se realizan mezclas es la ampliación de las enfermedades contra las cuáles es protegido un cultivo, en el caso de que los fungicidas sean dirigidos a diferentes patógenos o espectros de patógenos. Otra razón se relaciona con la intención de retrasar o disminuir la resistencia que presenta un patógeno contra cierto fungicida. Las mezclas de fungicidas pueden proveer un mejor control de las enfermedades que los componentes solos (Gisi, 1996). Los motivos anteriores corresponden a estrategias utilizadas en la agricultura con fungicidas sintéticos convencionales. La creciente necesidad de reducir la cantidad utilizada de éstos, así como la prohibición o eliminación del uso de algunos fungicidas, ha provocado que no solo se busquen alternativas fuera de estos mecanismos de control.

Así pues, otra causa por la que hay interés en la combinación de sustancias con actividad fungicida es para disminuir la cantidad utilizada de alguno de ellos, por razones económicas o de toxicidad. En este sentido, las investigaciones publicadas al respecto no solo atienden la evaluación de mezclas de fungicidas convencionales con opciones innovadoras de procedencia natural y menores repercusiones ambientales y/o para la salud humana, sino que también hay interés en la evaluación de las combinaciones en las que ninguno de sus componentes sea un fungicida sintético, o bien, que la proporción de éstos últimos o su utilización en el manejo integrado de la enfermedad no sea preponderante.

Existen investigaciones sobre combinaciones de oligómeros y polímeros de quitosano (Attijlou *et al.*, 2021), de quitosano con fungicidas como piraclostrobin, metil tiofanato, fluazinam y ciprodinil (Rahman *et al.*, 2014), mezclas de aceites esenciales con iprodiona (Camilleti *et al.*, 2016), y quitosano con aceite esenciales (De Oliveira *et al.*, 2017).

El término sinergia tiene diferentes acepciones dependiendo del área del conocimiento y contexto en el que se utiliza. A grandes rasgos, la sinergia se define como los efectos combinados o acumulativos producidos por interacciones entre varias fuerzas, partículas, elementos, sustancias, partes o individuos (Biavatti, 2019). Este significado puede tener connotaciones negativas o positivas. En el contexto de la investigación en los campos de fitopatología y farmacología, la palabra sinergia describe el fenómeno del aumento de potencia de dos o más sustancias administradas en combinación (Musiol *et al.*, 2014).

Tomando esta última definición de sinergia, el cálculo de la sinergia puede realizarse de diferentes formas, lo que lleva a resultados e interpretaciones distintas. Dos de los métodos más utilizados, son la fórmula Abbot y la ecuación de Wadley. El método Abbot es utilizado para estimar el efecto de la interacción entre dos componentes de una mezcla para concentraciones específicas de estos, es decir, se obtiene un valor para cada combinación. En cambio, el método de Wadley implica la creación de curvas dosis-respuesta para cada sustancia por separado y de las combinaciones, y una serie de cálculos para calcular el factor de sinergia a cualquier combinación de concentraciones (Gisi, 1996). El método de Wadley requiere mayor cantidad de combinaciones y más trabajo experimental que el de Abbot para obtener todos los datos necesarios para la creación de isobogramas (Levy *et al.*, 1986). El método de Wadley requiere una mayor recolección de datos sobre el efecto de diferentes mezclas de los componentes (Attijlou *et al.*, 2021).

Según la fórmula de Abbot, se declara sinergismo cuando la eficacia de la mezcla es superior a la eficacia esperada (Kosman & Cohen, 1996). El índice de sinergia obtenido por el método Abbot generalmente se interpreta de la siguiente forma: si es menor a 1 se dice que el efecto de la interacción se clasifica como antagónico, si es igual a 1 es aditivo, y si es mayor a 1 es sinérgico. Gisi (1996) menciona que según el método de Wadley, si el número es menor a 0.5 el efecto es antagónico, si está entre 0.5 y 1.5 es aditivo, y si es mayor a 1.5 es sinérgico.

En muchas investigaciones es empleado el método Abbot para calcular la sinergia, entre ellas algunas de las que evaluaron mezclas contra *B. cinerea* son:

la de Malandrakis y colaboradores (2019) que usó nanopartículas de cobre con fungicidas convencionales, y el estudio sobre mezclas de quitosano y otros fungicidas de Rahman y colaboradores (2014). Algunas investigaciones que también han empleado el método de Abbot, utilizaron la otra interpretación del factor de sinergia en la que mayor a 1.5 es efecto sinérgico, y menor a 0.5 es antagónico (Camiletti *et al.*, 2016; De Oliveira *et al.*, 2017).

No se conocen los mecanismos que ocurren para que exista el sinergismo en la inhibición del crecimiento fúngico. Lo más probable es que se deba a los diferentes modos de acción de los compuestos. La sinergia podría ser el resultado de un aumento general del estrés cuando son atacados simultáneamente diferentes procesos celulares del patógeno (Rahman *et al.*, 2014). La manera en la que interactúan químicamente los componentes de una mezcla depende de sus modos individuales de acción respecto al patógeno y de la forma en que se mezclan entre ellos con o sin reacción química, pero ese no es asunto de esta tesis. Lo que se mide con el índice de sinergia con cualquiera de sus métodos es una relación matemática entre los efectos observados y los esperados, y en el caso específico de la fórmula de Abbot el efecto medido es el porcentaje de inhibición.

El hecho de que una combinación sea sinérgica *in vitro* no garantiza que funcione de la misma manera *in vivo*, ya que la combinación puede ser demasiado tóxica para el huésped o pueden no ser alcanzables las concentraciones requeridas (Berembaum, 1978). En cuanto a investigaciones en fruto cosechado, De Oliveira y colaboradores (2017) mencionan que, al ser el quitosano un buen transportador de otras sustancias bioactivas, la incorporación de aceites esenciales puede mejorar las propiedades antimicrobianas de los recubrimientos de fruta basados en quitosano, y posiblemente lograr reducciones en las dosis requeridas para lograr los efectos inhibidores deseados.

CAPÍTULO II. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE *Botrytis cinerea* USANDO EXTRACTO DE *Zingiber officinale*

2.1 RESUMEN

Botrytis cinerea es un fitopatógeno de importancia para muchos cultivos comestibles. Los productos derivados de plantas se contemplan como una posibilidad importante. El jengibre (*Zingiber officinale*) es un rizoma del que han sido reportadas propiedades antimicrobianas. El extracto de jengibre y el aceite esencial de jengibre han sido estudiado como tratamiento *in vitro* contra algunos hongos fitopatógenos. Se han obtenido buenos resultados, por lo que podrían ser opciones viable para utilizarse contra *Botrytis cinerea*. En este trabajo se evaluaron los extractos de jengibre fresco y seco a 0.5, 1, 2 y 4%. Se hizo una extracción Soxhlet de jengibre a partir de rizomas frescos y secos, utilizando etanol al 96%, y se concentró en un rotavapor. Los extractos de jengibre inhibieron el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea in vitro*, siendo el de jengibre seco más efectivo que el de fresco. Las concentraciones inhibitorias medias fueron 1.03% para el extracto de seco, y 10.15% para el de fresco. Los porcentajes de inhibición finales del extracto de jengibre seco al 2 y 4% fueron 65.07 y 92.52%.

2.2 INTRODUCCIÓN

El hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea* tiene una amplia variedad de hospederos, por lo que es considerado un hongo polífago (Jarvis, 1977). Al ser un hongo que ataca muchos cultivos importantes, tales como fresa, jitomate, rosas, vid, uva, kiwi y arándano, es capaz de provocar pérdidas económicas importantes en diferentes etapas de la cadena de suministro. *B. cinerea* es el principal hongo que ataca a la fresa después de la cosecha, y su control es difícil debido a que tiene diversos tejidos huéspedes, además de ser necrótrofo. La infección puede aparecer incluso en fresas sin síntomas debido a la fase de latencia (Petrasch *et al.*, 2019). Los fungicidas sintéticos tienen desventajas, como su toxicidad para la salud humana y para el medio ambiente, así como el desarrollo de resistencia por parte de los hongos. Éste último hace que se requiera cada vez una cantidad mayor, elevando la toxicidad de los alimentos, así como los gastos y pérdidas. En consecuencia, se necesitan nuevos paradigmas en la producción de bienes de consumo humano, en los que deje de pensarse como indispensable el uso de fungicidas sintéticos y se comience por disminuir su uso. Un paso hacia esa dirección es probar otras formas de control de enfermedades.

Los productos derivados de plantas se contemplan como una posibilidad importante aunque hacen falta ensayos a gran escala. Existen muchas investigaciones sobre extractos de plantas, pero más sobre aceites esenciales. Algunas de las plantas más utilizadas para estos estudios son el tomillo, orégano y ajo. El jengibre (*Zingiber officinale*) es un rizoma utilizado no solo como condimento y para infusiones, sino que diferentes culturas le atribuyen propiedades antimicrobianas, algunas de ellas probadas. Resulta conveniente que al tratarse de un alimento, tenga propiedades antimicrobianas, pues podría resultar más sencilla su aceptación pública.

El extracto de jengibre ha sido estudiado como tratamiento *in vitro* contra algunos hongos fitopatógenos y bacterias. Se han obtenido resultados prometedores, por lo que podría ser una opción viable para utilizarse contra *Botrytis cinerea*. Se ha atribuido la actividad antimicrobiana del extracto de jengibre a la presencia de

sesquiterpenoides, zingibereno, β -sesquifelandreno, β -bisaboleno y α -farneseno (Beristain-Bauza *et al.*, 2019).

En este capítulo de la tesis, se describe obtención y concentración del extracto de jengibre a partir de jengibre fresco y polvo de jengibre seco, para ser utilizados en la evaluación de la inhibición de crecimiento *in vitro* de *B. cinerea*.

2.3 OBJETIVOS

- Obtener y concentrar extracto alcohólico de jengibre (*Zingiber officinale*).
- Evaluar la efectividad inhibitoria del extractos de jengibre sobre *Botrytis cinerea* en condiciones *in vitro*

2.4 HIPÓTESIS

El extracto de jengibre (*Zingiber officinale*) inhibe el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea in vitro*.

2.5 MATERIALES Y MÉTODOS

2.5.1 Ubicación del trabajo

Este trabajo se realizó en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Aguascalientes entre los meses de noviembre de 2020 y diciembre de 2021. La obtención del extracto de jengibre se realizó en el laboratorio de Alimentos del Centro de Ciencias Agropecuarias (CCA) y el laboratorio de Biorremediación del Centro de Ciencias Básicas, que está en campus central en Aguascalientes, Ags. El aislamiento y purificación de *Botrytis cinerea*, así como la evaluación de la actividad fungicida se hicieron en el laboratorio de Parasitología Agraria del CCA en el campus Posta Zootécnica, Jesús María, Aguascalientes.

2.5.2 Aislamiento y purificación de *Botrytis cinerea*

Con una aguja de inoculación se tomaron hifas de *B. cinerea* a partir de la superficie de fresas (*Fragaria x ananassa*) infectadas con síntomas de esporulación y también de micelio de la parte interior del fruto, las cuáles se sembraron en cajas de Petri con medio PDA. Se incubaron en oscuridad a 27°C por 6 días hasta que esporularon. Posteriormente, se identificaron macroscópicamente las colonias en las cajas y se tomó un inóculo para sembrarlas individualmente por la técnica de discos de micelio. Se incubaron en oscuridad a 27°C por 6 días hasta que formaron los conidios y conidióforos. Enseguida se tomaron muestras con una aguja de disección una muestra, y se realizaron tinciones con azul de lactofenol en el porta-objetos. Se observaron al microscopio y se tomaron fotografías a las estructuras observadas con el objetivo 40x y 100x.

2.5.3 Obtención y concentración del extracto de jengibre

Para obtener el polvo de jengibre seco, se lavaron los rizomas de jengibre frescos, se partieron en rodajas de 10 mm de grosor y se pusieron a secar descubiertos a temperatura ambiente. Después se molieron los pedazos de

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

jengibre en una licuadora con un vaso de 250 ml de capacidad. El jengibre fresco se utilizó en pedazos de aproximadamente 2 mm x 5 mm. Para la extracción, a partir de jengibre seco y fresco, se utilizó alcohol etílico al 96% y un equipo Soxhlet, compuesto por un matraz de capacidad de 500 ml, un tubo o cámara de extracción, papel filtro, el tubo condensador y las mangueras de entrada y de salida. Para enfriar el agua que pasó por el condensador se utilizó una unidad refrigerante industrial recirculadora de agua CW-5200 B&H. El matraz con el solvente se calentó en parilla a 78°C. Se utilizaron 280 ml de alcohol por cada 58 gramos de jengibre en cada extracción. Se realizaron cinco extracciones de jengibre seco y cinco de jengibre fresco, las cuales duraron seis horas por extracción, lo equivalente a dos flujos.

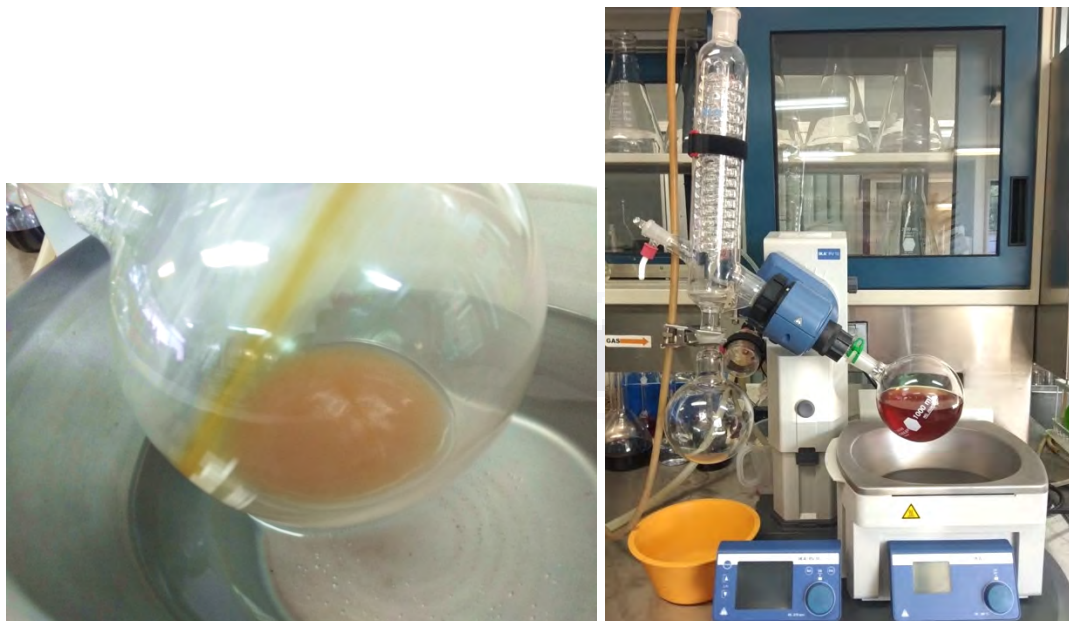


Figura 3. Jengibre fresco partido y jengibre seco molido.



*Figura 4. Equipo Soxhlet en funcionamiento*En la imagen de la izquierda se muestra antes del reflujo y en la parte derecha después.*

Los extractos obtenidos se concentraron por separado en un rotavapor IKA RV-10 digital con baño de agua a 60°C, conectado a una bomba de ¼ caballos de fuerza para hacer vacío. La concentración duró 40 minutos por cada lote.



*Figura 5. Rotavapor. *En la imagen de la izquierda se muestra el concentrado de EJF y en la parte derecha la concentración del EJS.*

2.5.4 Evaluación de la inhibición de crecimiento micelial

Se realizó medio de cultivo PDA y se esterilizó en autoclave a 121°C a 15 PSI. Se hizo la disolución del extracto de jengibre fresco concentrado en los medios PDA a las diferentes concentraciones de tratamientos: 0.5%, 1%, 2% y 4% (v/v), agregando la cantidad correspondiente a los matraces con medio de cultivo estéril, dentro de la campana de flujo, antes de vaciar el medio en las cajas. También se mezcló el extracto de jengibre seco concentrado con los medios PDA a las diferentes concentraciones de tratamientos: 0.5%, 1%, 2% y 4% (v/v). Se hicieron cinco juegos por cada concentración de cada tratamiento. Se inoculó un disco de *Botrytis cinerea* en cada caja con extracto además de cinco juegos testigo sin extracto de jengibre y se mantuvieron a 27°C cerradas, en oscuridad.

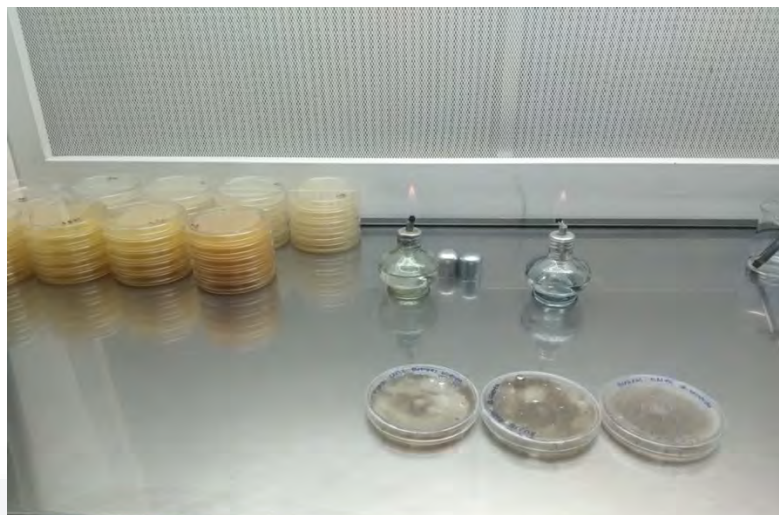


Figura 6. Siembra del hongo en las cajas de Petri.



Figura 7. Cepas de Botrytis cinerea empleadas en el presente trabajo.

Se midieron con un vernier digital dos diámetros cruzados (la primera de un punto al punto diametralmente opuesto del crecimiento, y la otra sobre el eje perpendicular) por cada repetición, cada día hasta que el hongo colonizó las cajas. Las mediciones fueron hechas de la siguiente forma: Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial según la fórmula.

$$ICM = \frac{C_b - C_a}{C_b} \times 100$$

Donde C_a es el crecimiento en la unidad experimental con tratamiento y C_b es el crecimiento en la unidad experimental testigo.

Cuadro 2. Abreviaciones de los tratamientos del Capítulo 2.

Tratamiento		
EJS0.5	Extracto de jengibre fresco	0.5%
EJF1		1%
EJS2		2%
EJF4		4%
EJS0.5	Extracto de jengibre seco	0.5%
EJS1		1%
EJS2		2%
EJS4		4%

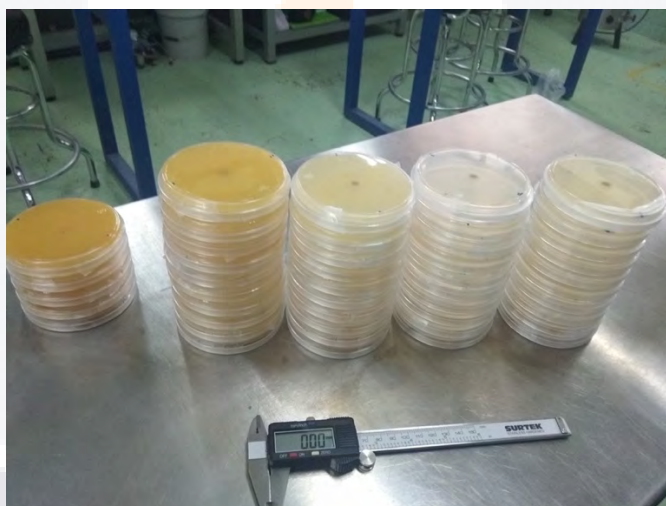


Figura 8. Medición de los diámetros de crecimiento micelial con un vernier digital.

También se determinó la CI50 para cada tratamiento, que es la concentración inhibitoria necesaria para lograr un 50% de inhibición, mediante un análisis Probit.

Se determinó realizar un segundo experimento utilizando únicamente los extractos de jengibre fresco al 6%, 8% y 14% (v/v). Se realizó medio de cultivo PDA y se esterilizó en autoclave a 121°C a 15 PSI. Posteriormente se hizo la

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

disolución del extracto de jengibre fresco concentrado en los medios PDA a las concentraciones ya mencionadas, de la misma manera que el primer experimento. Se inoculó un disco de *Botrytis cinerea* en cada caja con extracto, siendo 5 cajas por cada concentración, además de cinco cajas testigo.

Las unidades experimentales se mantuvieron a 27°C cerradas, en oscuridad. Se midió el crecimiento micelial cada 24 horas hasta que la superficie del medio de cultivo de la caja se cubrió por completo y se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial y la CI50.

2.5.5 Análisis estadístico

Para el primer experimento, se usó un diseño completamente al azar con 8 tratamientos y un testigo absoluto. Para el segundo experimento de extracto de jengibre fresco, se usó un diseño completamente al azar, en el que se se aplicaron 3 tratamientos y un testigo absoluto. Cada unidad experimental estuvo constituida por cinco repeticiones.

Los promedios para cada repetición se sometieron a análisis de varianza ANOVA de un solo factor con prueba de comparación de pares de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial se sometieron a los mismos análisis para estimar diferencias significativas. Todas las pruebas anteriores se hicieron con el programa Minitab. Se hizo un análisis Probit con los promedios de cada tratamiento de los datos de inhibición de crecimiento micelial, para calcular la concentración inhibitoria media (CI50) en el programa Excel.

2.6 RESULTADOS

2.6.1 Aislamiento y purificación de *Botrytis cinerea*

Los conidios tienen una forma ovalada o prolata y están ramificados irregularmente. La fotografías al microscopio de *Botrytis cinerea* se encuentran en la figura 9.

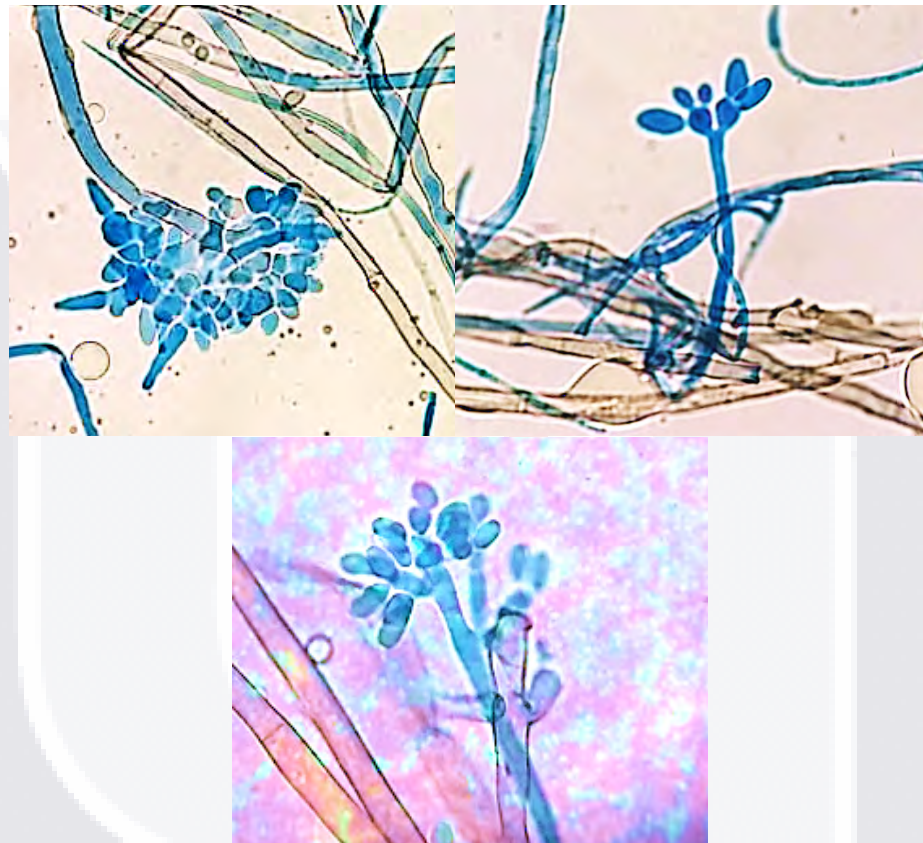


Figura 9. Conidióforos de *Botrytis cinerea*.

*Las fotografías de arriba fueron tomadas en el objetivo 40x, y la de abajo en 100x.

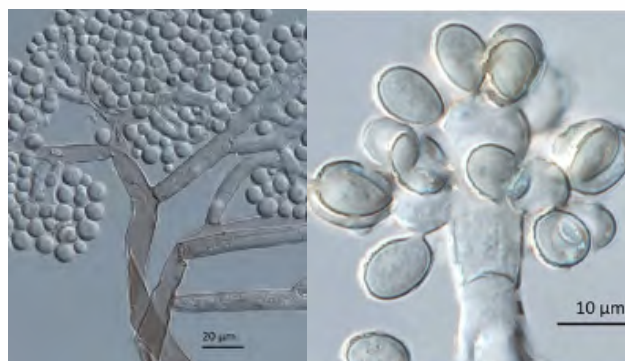


Figura 10. Conidióforos y conidios de *Botrytis cinerea* (Pei et al., 2018).

La fotografía de la figura 11 muestra el color y la forma de la colonia a nivel macroscópico.



Figura 11. Botrytis cinerea esporulado.

El color de los conidióforos es de hialino a gris claro y las hifas son de color gris claro, y se van volviendo gris oscuras conforme va pasando el tiempo, es por eso que en el lugar que se sembró el inóculo se ve más oscuro que el resto. El crecimiento de la colonia es regular.

2.6.2 Obtención y concentración del extracto de jengibre

El jengibre fresco tiene un olor picante intenso con notas amargas, y el polvo seco de jengibre es color café claro opáco con un fuerte olor dulce con notas avainilladas. El extracto del jengibre fresco es amarillo, mantuvo el picor o pungencia de los rizomas de jengibre, aunque con mayor intensidad. En cuanto al extracto obtenido desde jengibre seco, tuvo un color ámbar rojizo, y el mismo olor intenso dulce avainillado. En la figura 12 se muestran los extractos obtenidos a partir de jengibre fresco (izquierda) y jengibre seco (derecha).

Se obtuvieron 1285 ml de extracto de fresco y 1070 ml de seco. Después de concentrarlos en el rotavapor se obtuvieron 45 ml de extracto fresco y 35 ml de extracto seco.



Figura 12. Extracto etanólico de jengibre fresco y de jengibre seco.

2.6.3 Evaluación de la inhibición de crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* usando extractos de jengibre

Los promedios del diámetro de *Botrytis cinerea* con los tratamientos de extracto de jengibre fresco (EJF) y extracto de jengibre seco (EJS), a 0.5, 1, 2 y 4 % están en el cuadro 3. El hongo tardó 7 días colonizar los testigos. El crecimiento micelial fue menor con mayores concentraciones de extractos, tanto del seco como del fresco. Los tratamientos con las concentraciones al 2% y 4% del extracto de jengibre fresco fueron los que presentaron un menor crecimiento.

Cuadro 3. Crecimiento diario de *B. cinerea* in vitro con tratamientos de extracto etanólico de jengibre fresco y seco.

Tratamiento	Medias de crecimiento micelial (diámetro en mm) por día							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Testigo	5.00	6.14a	14.58a	25.05ab	40.05ab	55.15a	70.06a	79.15a
EJF0.5	5.00	5.66ab	13.73a	24.99ab	39.09ab	53.21ab	66.37ab	74.62a
EJF1	5.00	5.66ab	14.25a	28.37a	42.12a	56.27a	68.34ab	76.51a
EJF2	5.00	5.36b	12.00ab	20.16 bc	33.36b	46.24b	60.92b	71.35ab
EJF4	5.00	5.19b	8.50c	14.02d	23.04c	34.00 c	49.32c	62.91b
EJS0.5	5.00	5.61ab	9.19bc	15.64cd	23.04c	31.17c	40.92d	49.30c
EJS1	5.00	5.12b	6.96cd	11.03de	17.79c	26.07c	36.20d	43.34c
EJS2	5.00	5.08b	5.40d	6.84e	10.23d	15.39d	21.15e	27.65d
EJS4	5.00	5.04b	5.31d	5.77e	5.88d	5.88e	5.92f	5.92e

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor, con un 95% de confianza ($\alpha=0.05$).

En las figuras 13 y 14, se muestra la curva de sigmoidea de crecimiento del hongo *Botrytis cinerea*. A los 3 días de crecimiento se observa una diferencia entre las EJS de 0.5, 1 y 2% con el de 4%. Las tres concentraciones más bajas de EJS no tienen diferencias significativas respecto al testigo. EJS4 fue diferente de ESJ1, ESJ2 y EJS3 todo el tiempo. Sobre los promedios de crecimiento de los tratamientos con extracto de polvo de jengibre seco, el grupo testigo mostró diferencias significativas ($\alpha=0.05$) respecto al resto de los grupos. La media del crecimiento con la concentración 0.5% y 1% es similar, al igual que la 2% y 4%

a las 72 horas. A partir del quinto día se distingue más la respuesta, el testigo es marcadamente diferente que el 0.5% y 1%, estos que el 2% y el 4% se aleja de los demás teniendo el menor crecimiento y por lo tanto el mayor porcentaje de inhibición (cuadro 3 y figura 14).

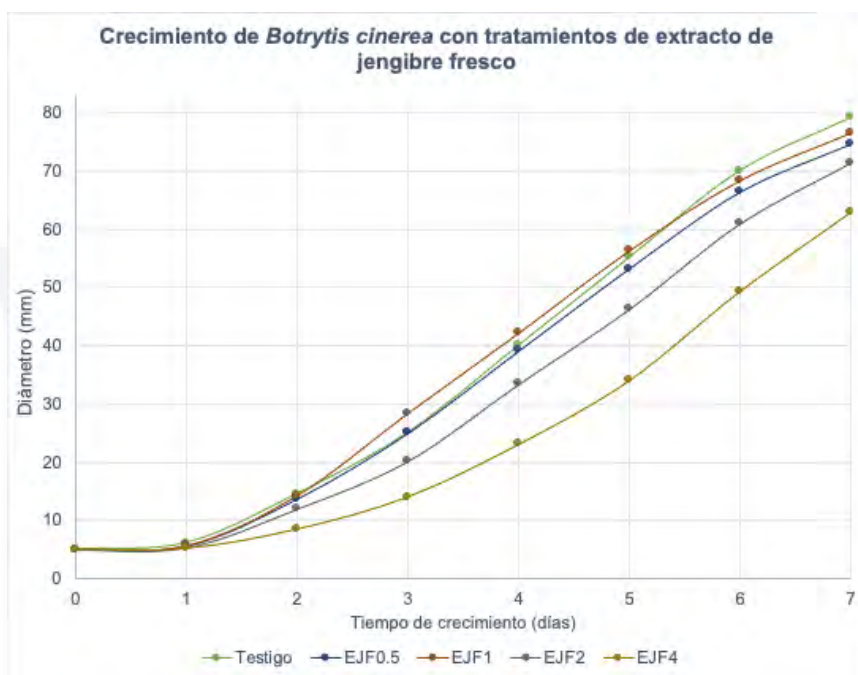


Figura 13. Crecimiento diario de *B. cinerea* in vitro con las diferentes concentraciones de los tratamientos de extracto de jengibre fresco.

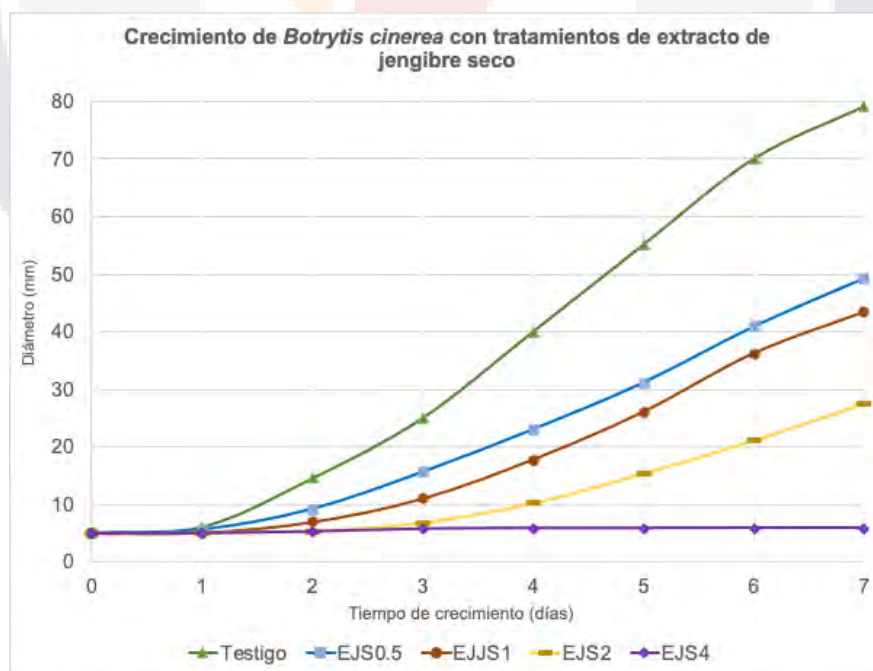


Figura 14. Crecimiento diario de *B. cinerea* con las diferentes concentraciones de los tratamientos de extracto de jengibre seco.

En cuadro 4 se muestran los porcentajes de inhibición de crecimiento para cada día y cada concentración de los tratamientos. Solo los tratamientos de extracto de jengibre seco al 1%, 2% y 4% mostraron inhibiciones mayores al 50%. El porcentaje de inhibición total más alto fue de 92.52% y corresponde a la concentración de 4%.

Cuadro 4. Porcentajes diarios de inhibición de crecimiento de B. cinerea in vitro con tratamientos de extracto etanólico de jengibre seco y fresco.

Tratamiento	Medias de inhibición de crecimiento (%) diarias							
	0	1	2	3	4	5	6	7
Testigo	0	0c	0c	0de	0d	0e	0f	0e
EJF0.5	0	7.85cb	5.82c	0.27de	2.38cd	3.51de	5.27ef	5.73e
EJF1	0	7.84bc	2.30c	-13.25e	-5.19d	-2.03e	2.46ef	3.34e
EJF2	0	12.60ab	17.73c	19.52cd	16.69c	16.15d	13.05e	9.85de
EJF4	0	15.50ab	41.71b	44.06b	42.47b	38.36c	29.61d	20.52d
EJS0.5	0	8.52abc	36.94b	37.57bc	42.46b	43.48c	41.59c	37.72c
EJS1	0	16.61ab	52.28ab	55.99ab	55.57b	52.73c	48.34c	45.25c
EJS2	0	17.21ab	62.98a	72.71a	74.45a	72.10b	69.81b	65.07b
EJS4	0	17.89a	63.57a	76.99a	85.32a	89.33a	91.55a	92.52a

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes (método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor, con un 95% de confianza, $\alpha=0.05$).

Cuadro 5. Velocidad de crecimiento micelial según el tratamiento.

Tratamiento	Velocidad de crecimiento (mm/día)
Testigo	10.59
EJF0.5	9.95
EJF1	10.22
EJF2	9.48
EJF4	7.35
EJS0.5	6.33
EJS1	5.48
EJS2	3.24
EJS4	0.13

La menor velocidad de crecimiento fue de 0.13 mm/día y se dió con el extracto de jengibre seco al 4%, mientras que la mayor fue de 10.22 mm/día, correspondiente al extracto de jengibre fresco al 1%. La velocidad del extracto de jengibre seco al 0.5% fue menor que la mayor concentración del seco.

A continuación se muestran los resultados del cálculo de la concentración efectiva media del extracto de jengibre seco:

Cuadro 6. Concentración inhibitoria media (CI50) del extracto de jengibre seco.

	48 h	168 h
Pendiente	1.104	1.163
Intersección	5.018	4.985
Test	5	5
Log(C%)	-0.017	0.013
CI50	0.96%	1.03%

*Los valores de CI50 del EJS al segundo y último día después de la siembra fueron calculados utilizando la función Probit en el programa Excel.

Los promedios de crecimiento de *Botrytis cinerea* con los tratamientos de extracto de jengibre fresco a concentraciones 6, 8 y 14% (más elevadas que el ensayo anterior) se muestran en el siguiente cuadro:

Cuadro 7. Porcentajes diarios de crecimiento de B. cinerea con tratamientos de extracto etanólico de jengibre fresco a 6, 8 y 14%.

Tratamiento	Medias de crecimiento (%) diarias					
	0	1	2	3	4	5
Testigo	0	8.33a	25.40a	58.59a	76.73a	80.00a
EJF6	0	9.07a	22.35a	38.59b	52.96b	69.24b
EJF8	0	8.18a	19.92a	33.71b	45.50c	56.72c
EJF14	0	5.02b	9.17b	12.14c	15.84d	19.23d

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor, con un 95% de confianza ($\alpha=0.05$).

En la figura 15 se presenta la curva de sigmoidea del crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* a través del tiempo. Los testigos tardaron 5 días en colonizar las cajas. El crecimiento micelial fue menor conforme aumentó la concentración. La concentración inhibitoria media calculada a partir de los porcentajes de inhibición (cuadro 8), para el primer y último día en que hubo inhibición mayor a 50%.

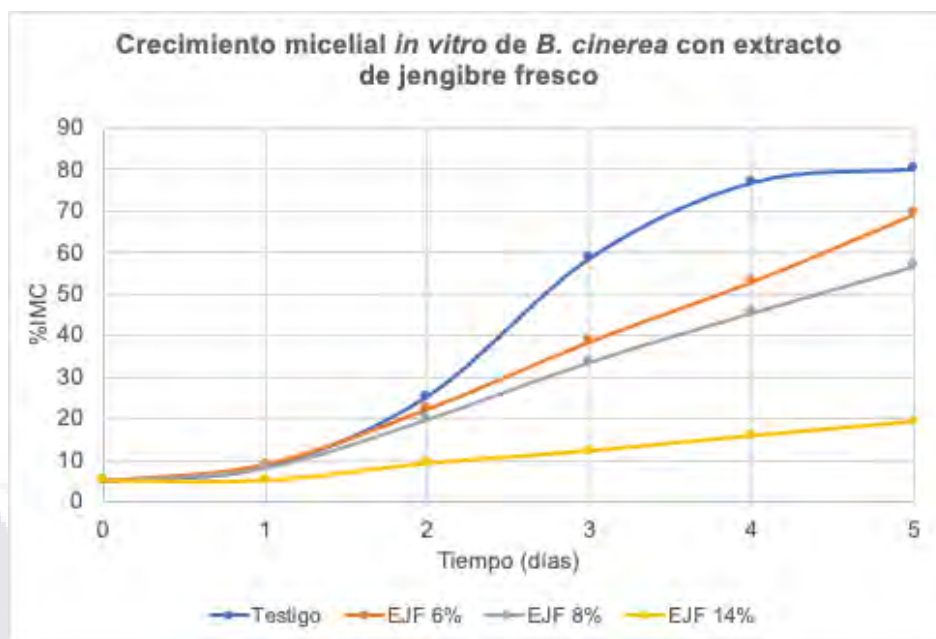


Figura 15. Crecimiento de *Botrytis cinerea* diario para cada concentración de los tratamientos de extracto de jengibre fresco: 6%, 8% y 14%.

Cuadro 8. Porcentajes de inhibición micelial de *B. cinerea* con tratamientos de extracto etanólico de jengibre fresco a 6, 8 y 14%.

Tratamiento	Porcentajes de inhibición de crecimiento (%)					
	0	1	2	3	4	5
Testigo	0	0.00b	0.00c	0.00d	0.00d	0.00d
EJJ6	0	-8.96b	12.01b	34.15c	30.98c	13.45c
EJJ8	0	1.75b	21.58b	42.47b	40.71b	29.11b
EJJ14	0	39.71a	63.90a	79.27a	79.36 ^a	75.96a

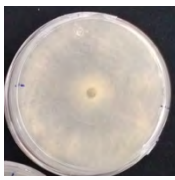
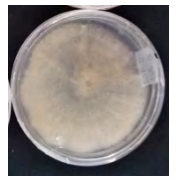
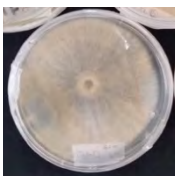
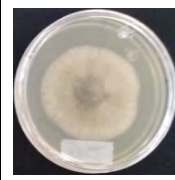
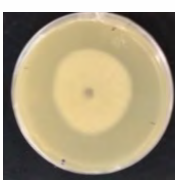
*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor, con un 95%

Cuadro 9. Concentración inhibitoria media del extracto de jengibre fresco.

	48 h	120 h
Pendiente	4.23	4.95
Intersección	0.48	0.01
Test	5	5
Log(C%)	1.07	1.01
CI50	11.72%	10.15%

*Los valores de CI50 del EJJ para el segundo y último día después de la siembra fueron calculados utilizando la función Probit en el programa Excel.

Cuadro 10. Comparación de los crecimientos radiales del micelio de B. cinerea con tratamientos de EJF y EJS en el día 7.

Testigo	EJF0.5	EJF1	EJF2	EJF4
				
	EJS0.5	EJS1	EJS2	EJS4
				

2.7 DISCUSIÓN

La fotografía obtenida de los conidios y conidióforos de *B. cinerea* en el microscopio coincide con las reportadas en la literatura científica al respecto (Pei *et al.*, 2018). Los conidios tienen forma prolata u ovalada, se organizan en forma irregular, en racimo, y las hifas del micelio son septadas.

Los porcentajes de inhibición de *B. cinerea* para los extractos de jengibre seco fueron mayores al 50% desde el día 2 hasta el 7 para las concentraciones a 2 y 4%, mientras que el 1% tuvo concentraciones mayores a 50% del día 2 al 5. El porcentaje más alto fue de 92.52% correspondiente a EJS4. Es por eso que se eligieron los tratamientos EJS1 y EJS2 para utilizarlos en el tercer capítulo de la tesis, ya que EJS4 no tuvo diferencias estadísticamente significativas con EJS2 desde el día 1 hasta hasta el 4.

El tratamiento de EJF al 4% fue significativamente diferente (mayor) del de 2%, pero fue estadísticamente igual al de menor concentración de jengibre seco (0.5%) en los días 1 a 5.

Respecto al segundo ensayo, en donde se evaluó EJF a concentraciones mayores, todas las concentraciones fueron significativamente diferentes desde el día 3 de medición. La concentración más alta, 14% fue marcadamente diferente a las otras. Las concentraciones inhibitorias medias calculadas por cada día, variaron debido a que la respuesta biológica del hongo no es lineal. Es interesante que en el caso del extracto de jengibre seco, la concentración necesaria para un 50% de inhibición fue mayor en el último día que en los primeros, y en el caso del extracto de jengibre fresco, según los CI50 (cuadro 9) disminuyó en el último día. Se puede observar en las líneas de las figuras 13, 14 y 15 que a medida que aumenta la concentración de los compuestos, la línea de crecimiento tiende a hacerse más recta y alejarse de la forma sigmoidea.

Diversos autores han reportado los componentes principales, tanto del aceite esencial de jengibre, como de oleorresinas y extractos vegetales, Beristain-Bauza y colaboradores (2019) tiene una revisión donde se compila información al respecto. Independientemente de cuáles sean los principales compuestos en el jengibre seco y en el fresco, el jengibre seco tienen una mayor proporción de

compuestos activos por peso del rizoma utilizado, pues el jengibre fresco tiene una mayor contenido de agua. La composición química de los extractos varía de estudio en estudio, pero se sabe que el extracto de jengibre seco tiende a tener diferentes propiedades que el de jengibre fresco debido a que en el proceso de secado sea por exposición al calor o a temperatura ambiente, los gingeroles se convierten en shogaol y en zingerona, que están presentes en el jengibre seco (Beristain-Bauza *et al.*, 2019). Entonces algunas moléculas volátiles presentes en el extracto de jengibre fresco se encuentran en menor cantidad en el de jengibre seco y viceversa, gracias a la síntesis y degradación de compuestos bioactivos. Otra diferencia es que el jengibre seco tiene mayor capacidad antioxidante que el fresco, debido a un mayor número de compuestos fenólicos (Mao *et al.*, 2019).

Así, la composición de los extractos de jengibre depende no solo del solvente o mezcla de solventes utilizado para la extracción, sino que la composición de los rizomas utilizados es un factor importante, además de si estos son frescos, o secos (en polvo), y la temperatura de extracción, que a su vez es dependiente del método utilizado.

El extracto de jengibre fresco tuvo una concentración inhibitoria media de 10.15%, mientras que el de jengibre seco tiene una concencetración inhibitoria media de 1.03%, es decir, 9.85 veces menor.

En el ensayo en condiciones in vitro de Allam y colaboradores (2017), obtuvieron un 31.4% de inhibición de *B. cinerea* con una concentración de 10000 ppm (1%), y la concentración calculada para tener un 44% de inhibición fue de 15000 ppm, es decir 1.5% (peso/peso). Mientras que para un 100% de inhibición, la concentración de extracto es de 2.5%. En dicha investigación se trabajó con un extracto obtenido con a partir de jengibre seco, con HCl como solvente, a 50°C por 2 horas y separado del solvente por centrifugación. Después fue secado para obtener el extracto crudo seco. Si se compara con la concentración inhibitoria media calculada para el extracto de jengibre seco, que es de 1.03% (volumen/volumen), se puede afirmar que se tienen resultados similares, dentro del mismo orden de magnitud. En cuanto al extracto de jengibre fresco, cuya

concentración inhibitoria media estuvo entre 10.15 y 11.72%, resulta menos efectivo que el extracto de jengibre seco de este proyecto, y del estudio citado.

En un trabajo que evaluó aceite esencial de jengibre contra *B. cinerea in vitro* se obtuvo una inhibición de 36.13% con una concentración de 0.04% (Rattanapitigorn *et al.*, 2006). Tripathi y colaboradores (2007) obtuvieron una inhibición *in vitro* de *B. cinerea* del 100% a una concentración de 500 ppm ó 0.05%, utilizando aceite esencial de jengibre. Los aceites esenciales obtienen inhibiciones buenas a concentraciones menores debido a que, además de tener una proporción distinta de compuestos activos, y mostrar mayores propiedades lipofílicas, están más concentrados que los extractos.

2.8 CONCLUSIONES

Se extrajo y concentró el extracto vegetal de jengibre con etanol al 96%. El extracto de jengibre inhibió el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea in vitro*. El extracto de jengibre seco fue más efectivo que el extracto de jengibre fresco. El porcentaje de inhibición final del extracto de jengibre fresco al 4% fue menor que el del extracto de jengibre seco al 0.5%. Se calcularon las concentraciones inhibitorias medias, que fueron 1.03% para el EJS y 10.15% para el EJF. Los porcentajes de inhibición finales del extracto de jengibre seco al 2 y 4% fueron 65.07 y 92.52%. El porcentaje de inhibición final del extracto de jengibre fresco al 4% fue menor que el del extracto de jengibre seco al 0.5%.

CAPÍTULO III. EVALUACIÓN DE LA INHIBICIÓN DE *Botrytis cinerea* USANDO EXTRACTO DE JENGIBRE CON QUITOSANO

3.1 RESUMEN

Botrytis cinerea es un fitopatógeno de importancia para muchos cultivos comestibles. El uso desmedido de fungicidas ha ocasionado que algunos hongos, incluido *B. cinerea* desarrollen resistencia y sea cada vez más difícil el control de la enfermedad, provocando pérdidas económicas. El quitosano, que proviene generalmente de las cáscaras de camarón y caparazones de crustáceos, es ampliamente utilizado en otras industrias como la cosmética y el sector de tratamiento de agua, pero también ha sido investigado como un preservador por sus propiedades antimicrobianas y es utilizado en la agricultura. El extracto de jengibre tiene propiedades antifúngicas derivadas de los compuestos fenólicos que contiene. Ha sido evaluado contra diferentes hongos, incluyendo *Botrytis cinerea*. En este trabajo se evaluó el extracto de jengibre seco, quitosano, y combinaciones de ambos. Las 4 concentraciones de quitosano (1.5, 3, 6 y 9 mg/ml) evaluadas tuvieron capacidad inhibitoria. La concentración inhibitoria media del quitosano fue 8.82 mg/ml. Las inhibiciones producidas por los extractos de jengibre seco al 1 y 2% fueron significativamente diferentes. De los tratamientos combinados, los mejores fueron J1Q4, J2Q2, J2Q3 y J2Q4. La mayor inhibición alcanzada por J2Q4 fue de 80.4%, aunque su porcentaje de inhibición final fue de 61%. Se calcularon los índices de sinergia (Abbot) para cada medición de las combinaciones.

3.2 INTRODUCCIÓN

Los métodos alternativos para el control de enfermedades causadas por hongos en cultivos de consumo humano han sido estudiados por un par de décadas. Los peligros y desventajas del uso desmedido de fungicidas sintéticos son conocidos desde hace mínimo 40 años, sin embargo, en los últimos años ha aumentado la tendencia a investigar y evaluar la capacidad de controlar o inhibir fitopatógenos de diferentes alternativas. Entre esas alternativas se encuentran agentes biológicos, sales inorgánicas, extractos vegetales y aceites esenciales, así como otras sustancias reconocidas como seguras en dosis bajas (Romanazzi & Feliziani, 2014).

El quitosano, que es una poli-glucosamina acetilada proveniente de las cáscaras de camarón y caparazones de crustáceos, es utilizado en otras industrias como la cosmética, el sector de tratamiento de agua, y en la agricultura principalmente como regulador del crecimiento (Lárez, 2006). Pero también ha sido investigado como un preservador por sus propiedades antimicrobianas. Ha sido evaluado contra diferentes hongos patógenos, incluyendo *Botrytis cinerea*, que es el principal hongo que ataca a la fresa después de la cosecha, y cuyo control es difícil debido a que tiene diversos tejidos huéspedes, además de ser necrótrofo (Petrash et al., 2019). Es capaz de provocar pérdidas económicas importantes en diferentes etapas de la cadena de suministro.

El extracto de jengibre ha sido estudiado como tratamiento *in vitro* contra algunos hongos, incluyendo *B. cinerea*. Se ha atribuido su actividad a la presencia de sesquiterpenoides, zingibereno, β -sesquifelandreno, β -bisaboleno y α -farneseno (Beristain-Bauza et al., 2019).

La combinación de tratamientos antifúngicos es atractiva, ya sea para disminuir la cantidad utilizada de alguno de ellos. Lo anterior puede ser justificado por el costo de alguna de las sustancias, o por la toxicidad que presenten. Otra razón para hacer combinaciones de tratamientos de control antifúngico es para encontrar mezclas en las que el efecto se vea potenciado.

En este capítulo de la tesis, se describe la evaluación *in vitro* de la inhibición de crecimiento de *B. cinerea* utilizando mezclas de quitosano y extracto de jengibre.

3.3 OBJETIVO

Evaluar la efectividad de **combinaciones** de quitosano con extracto de jengibre (*Zingiber officinale*), para la inhibición de *Botrytis cinerea in vitro*.

3.4 HIPÓTESIS

La combinación de extracto de jengibre (*Zingiber officinale*) con quitosano tiene un efecto sinérgico o aditivo en la inhibición del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea in vitro*.



3.5 MATERIALES Y MÉTODOS

3.5.1 Ubicación del trabajo

Este trabajo se realizó en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Aguascalientes entre Este trabajo se realizó en las instalaciones de la Universidad Autónoma de Aguascalientes entre los meses de noviembre de 2021 y diciembre de 2021, en el laboratorio de Parasitología Agraria Centro de Ciencias Agropecuarias, ubicado en el campus Posta Zootécnica, Jesús María, Aguascalientes.

3.5.2 Evaluación de la inhibición de crecimiento micelial

Se realizó medio de cultivo PDA y se esterilizó en autoclave a 121°C a 15 PSI. Se hizo una solución madre de quitosano a una concentración de 20 mg/ml disolviendo el quitosano en una solución de ácido láctico al 2% en agua. Se ajustó el pH a 5.6 con NaOH, y se agregó agua destilada hasta alcanzar el volumen adecuado para la proporciones antes descritas. Se diseñaron 19 tratamientos distintos en total, lo cuáles se describen en el cuadro 11.

Para los diferentes tratamientos, se disolvió el extracto de jengibre seco concentrado en los medios PDA esterilizados a las diferentes concentraciones de tratamientos: 1% y 2% (volumen/volumen). Además se utilizaron 4 concentraciones diferentes de quitosano de cáscaras de camarón marca Merck (desacetilación>75%): 1.5 mg/ml, 3mg/ml, 6 mg/ml y 9 mg/ml. Se hicieron las combinaciones de todas las concentraciones de quitosano con las concentraciones de extracto de jengibre. Los primeros 14 tratamientos incluyeron Tween a una concentración de 0.1% para ayudar con la mezcla. El proceso de mezcla de las disoluciones se ejecutó dentro de la campana de flujo con los mecheros encendidos, para después vaciar los concenidos de los matraces en las cajas de Petri.

La siembra se realizó al día siguiente en las mismas condiciones con un sacabocados de 5 mm. Se inoculó un disco de *Botrytis cinerea* cada caja y se mantuvieron a 27°C cerradas, en oscuridad. Fueron cinco cajas por cada

tratamiento. Las cajas para los testigos fueron solo llenadas con medio PDA., y además se contemplaron testigos con ácido láctico en las concentraciones resultantes de los tratamientos con quitosano (0.9, 0.6, 0.3 y 0.15 %).

Cuadro 11. Abreviaciones y concentraciones de los tratamientos del Capítulo 3.

Tratamiento		Extracto de jengibre seco (EJS)	Quitosano Merck (Q)
1	Q1	0	1.5 mg/ml
2	Q2	0	3 mg/ml
3	Q3	0	6 mg/ml
4	Q4	0	9 mg/ml
5	EJS1	1%	0
6	EJS2	2%	0
7	J1Q1	1%	1.5 mg/ml
8	J1Q2	1%	3 mg/ml
9	J1Q3	1%	6 mg/ml
10	J1Q4	1%	9 mg/ml
11	J2Q1	2%	1.5 mg/ml
12	J2Q2	2%	3 mg/ml
13	J2Q3	2%	6 mg/ml
14	J2Q4	2%	9 mg/ml
15	Testigo	Testigo absoluto PDA	
16	TAL1	PDA + ácido láctico 0.15%	
17	TAL2	PDA + ácido láctico 0.30%	
18	TAL3	PDA + ácido láctico 0.60%	
19	TAL4	PDA + ácido láctico 0.90%	

Se midieron con un vernier digital dos diámetros (cruzados) por cada repetición, cada día hasta que se cubrieron por completo las cajas de micelio, es decir, hasta que el hongo colonizó las cajas. Las mediciones fueron hechas de la siguiente forma: una de un punto al punto diametralmente opuesto del crecimiento, y la otra sobre el eje perpendicular.

Se calculó el porcentaje de inhibición de crecimiento micelial según la fórmula.

$$ICM = \frac{Cb - Ca}{Cb} \times 100$$

Donde C_a es el crecimiento en la unidad experimental con tratamiento y C_b es el crecimiento en la unidad experimental testigo.

También se determinó la CI50 para cada tratamiento mediante un análisis Probit. El índice o factor de sinergia IS se calculó con la siguiente fórmula de Abbot:

$$FS = \frac{C_{ob}}{C_{esp}} ; \text{ donde } C_{esp} = (A + B) - \frac{A \times B}{100}$$

Donde A y B son los porcentajes de inhibición de las sustancias individuales, C_{esp} es el porcentaje de inhibición esperado y C_{ob} es el porcentaje de inhibición observado.

El criterio de interpretación es el siguiente: IS menor a 1 indica efecto antagónico, lo que significa que la respuesta obtenida u observada fue menor a la esperada matemáticamente; IS igual a uno indica efecto aditivo, esto es que la respuesta fue igual a la esperada; IS mayor a 1, efecto sinérgico, o sea respuesta mejor que la suma de sus partes.

3.5.3 Análisis estadístico

Se usó una distribución completamente al azar con 14 tratamientos, cuatro testigos con ácido láctico y un testigo absoluto. La unidad experimental consistió en una caja de Petri de 80 mm de diámetro con medio de cultivo PDA con los tratamientos a evaluar, y cada unidad estuvo constituida por cinco repeticiones, dos mediciones cruzadas por repetición.

Los promedios para cada repetición se sometieron a análisis de varianza ANOVA de un solo factor con prueba de comparación de pares de Tukey con un nivel de significancia de 0.05. Además, a los promedios para las repeticiones de tratamientos compuestos se les hizo una prueba Tukey para comparación de dos factores. Los porcentajes de inhibición de crecimiento micelial se sometieron a los mismos análisis para estimar diferencias significativas. Todas las pruebas anteriores se hicieron con el programa Minitab. Se hizo un análisis Probit con los promedios de cada tratamiento de los datos de inhibición de crecimiento micelial, para calcular la concentración inhibitoria media (CI50) por día por tratamiento, para los que tuvieran valores mayores al 50%.

3.6 RESULTADOS

Los promedios del diámetro de *Botrytis cinerea in vitro* de todos los tratamientos se muestran en los cuadros 12 y 13. El hongo en las cajas testigos tardó 6 colonizar las cajas, mientras que en las cajas de los testigos con ácido láctico el tiempo fue de 7 días. El crecimiento micelial fue menor con mayores concentraciones, tanto de los extractos como del quitosano.

Cuadro 12. Crecimiento micelial diario de Botrytis cinerea in vitro con tratamientos simples de extracto etanólico de jengibre seco y quitosano.

Tratamiento		Medias de crecimiento micelial (diámetro en mm) por día							
		0	1	2	3	4	5	6	7
1	Q1	5.00	9.37def	25.43d	40.96d	52.03b	61.99b	69.37ab	72.92ab
2	Q2	5.00	9.61def	22.57de	36.25de	48.06bc	57.94b	64.53bc	69.99bc
3	Q3	5.00	11.40bcde	23.04de	33.78e	41.89cd	47.08c	58.20cd	64.54bc
4	Q4	5.00	9.76def	21.04e	32.36e	39.84d	48.59c	58.14cd	67.33bc
5	EJS1	5.00	6.93f	20.94e	30.21e	40.02d	44.59cd	51.19de	61.67c
6	EJS2	5.00	8.39ef	13.67f	21.00f	30.50e	36.25d	42.07e	45.93d
15	Testigo	5.00	14.43b	39.40c	54.17c	65.99a	77.14a	80.00a	80.00a
16	TAL1	5.00	20.68a	46.19ab	60.36abc	69.48a	73.59a	76.20a	80.00a
17	TAL2	5.00	12.06bcd	40.32c	57.82bc	67.93a	70.83a	73.41ab	80.00a
18	TAL3	5.00	13.25bc	42.49bc	62.10ab	68.40a	71.07a	75.27ab	80.00a
19	TAL4	5.00	18.91a	49.85a	64.88a	71.11a	77.14a	78.94a	80.00a

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor, con un 95% de confianza ($\alpha=0.05$).

En cuanto a los grupos de tratamientos simples (cuadro 12, figuras 16 y 17), el tratamiento 6 fue el que presentó el menor crecimiento micelial de *B. cinerea*, ya que desde la medición a las 48 horas, su efecto se diferenció del resto de los grupos con excepción del día 5 y 6 en que entre los tratamiento de EJS al 1 y 2% no hubo diferencias significativas (figura 17). En el cuarto y quinto día, los grupos con un menor crecimiento fueron 4, 5 y 6.

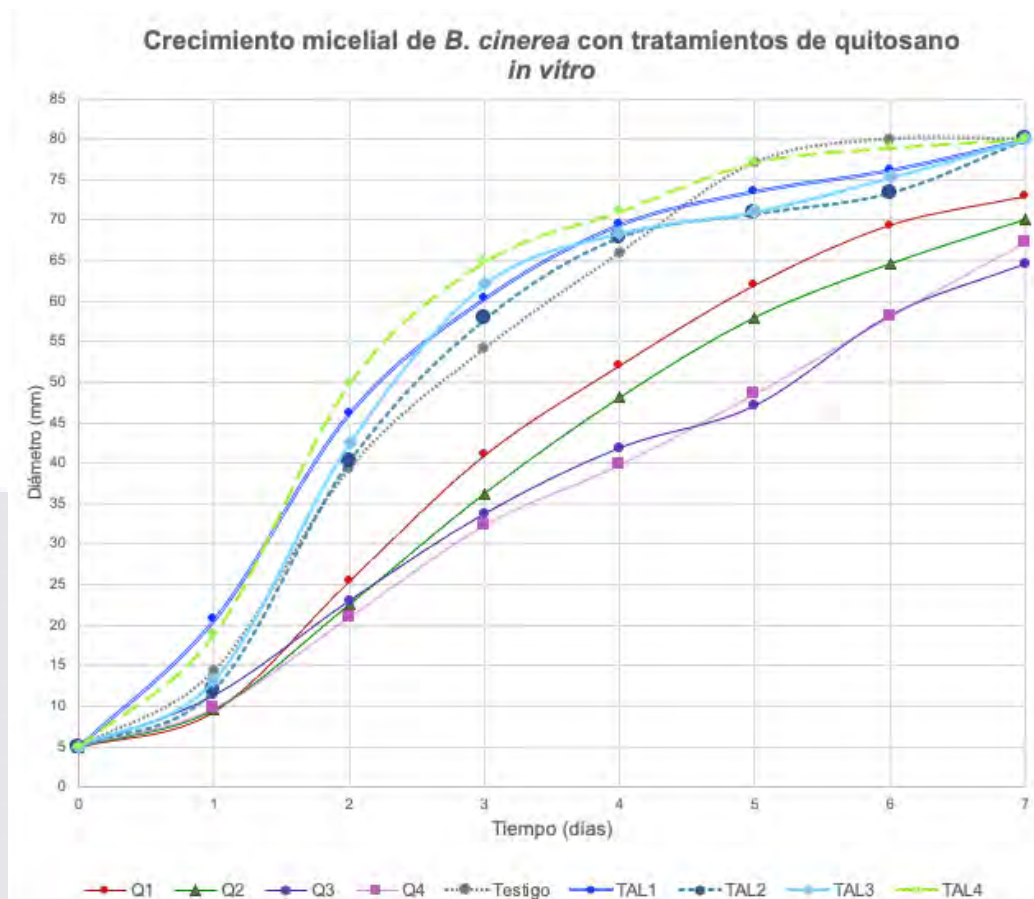


Figura 16. Crecimiento diario de *B. cinerea* in vitro con las diferentes concentraciones de quitosano.



Figura 17. Crecimiento diario de *Botrytis cinerea* in vitro con tratamientos de EJS al 1 y 2%.

Respecto a los tratamientos combinados (cuadro 13), los promedios de crecimiento micelial de los grupos J1Q4, J2Q2, J2Q3 y J2Q4 no presentaron diferencias significativas entre sí. Estos grupos fueron los que tuvieron un menor crecimiento del hongo durante todos los días de tratamiento.

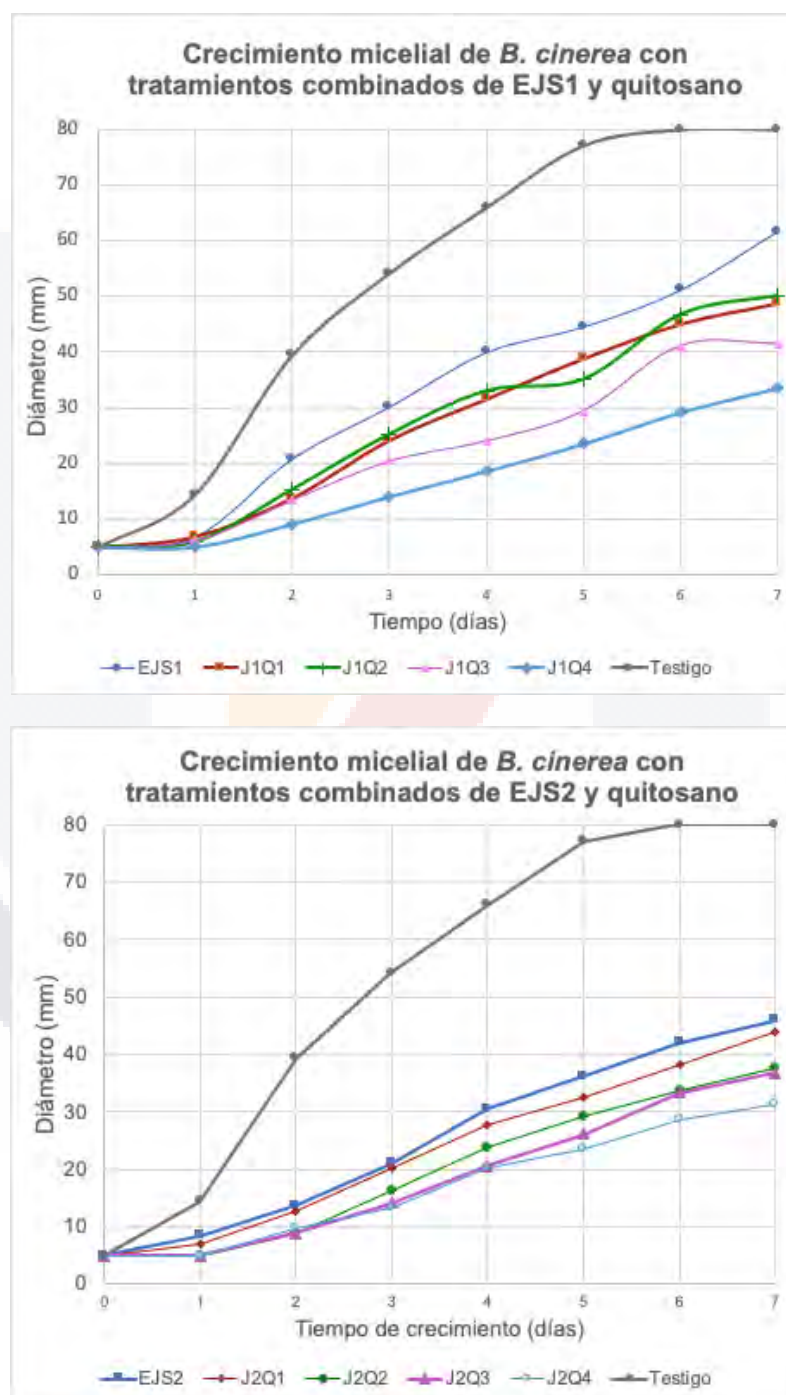


Figura 18. Crecimiento diario de *B. cinerea* para los tratamientos de EJS comparados con sus respectivas combinaciones con quitosano.

El crecimiento de EJS1 es marcadamente diferente que el de sus tratamientos compuestos correspondientes (7, 8, 9 y 10), y el EJS2 de 11, 12, 13 y 14.

Cuadro 13. Crecimiento micelial diario de Botrytis cinerea in vitro con tratamientos de combinaciones de EJS y quitosano.

Tratamiento		Medias de crecimiento micelial (diámetro en mm) por día							
		0	1	2	3	4	5	6	7
7	J1Q1	5.00	6.95a	13.80ab	24.20a	31.61a	38.84 ^a	45.05a	48.72a
8	J1Q2	5.00	5.85a	15.25a	25.17a	32.98a	35.08ab	46.73a	50.12a
9	J1Q3	5.00	6.25a	13.47abc	20.45ab	24.05ab	29.42bcd	41.09ab	41.48abc
10	J1Q4	5.00	5.00a	9.14bc	14.08bc	18.65b	23.59d	29.25cd	33.60cd
11	J2Q1	5.00	6.97a	12.61abc	20.22ab	27.74ab	32.44abc	38.33abc	44.05ab
12	J2Q2	5.00	5.00a	8.85c	16.30bc	23.66ab	29.25bcd	33.73bcd	37.46bcd
13	J2Q3	5.00	5.00a	8.90bc	14.14bc	20.62b	26.05cd	33.40bcd	36.84bcd
14	J2Q4	5.00	5.00a	9.77bc	13.40c	20.16b	23.39d	28.53d	31.19d

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes según el método para comparaciones múltiples de Tukey de dos factores (2 niveles de EJS y 4 niveles de quitosano), con un 95% de confianza ($\alpha=0.05$).

En los cuadros 14, 15 y 17 se muestran los porcentajes de inhibición de crecimiento de *B. cinerea* diarios que tuvieron los tratamientos. Se separaron para hacer más fácil la comparación y visualización de diferencias: en el cuadro 14 se presentan los datos para los tratamientos simples, comparados con los testigos, mientras que en los cuadros 15 y 17, las medias corresponden a los ocho tratamientos de combinaciones. En el cuadro 15 se realizó la prueba de Tukey con un solo factor, pudiendo considerar así los testigos para las comparaciones, en cambio, en el cuadro 17 se realizó la prueba de Tukey con dos factores, tomando en cuenta el factor EJS con 2 niveles y el quitosano con 5 niveles, con el objetivo de comparar los tratamientos simples con los compuestos y obtener las gráficas factoriales de la figura 21. Los tratamientos de extracto de jengibre seco al 2% resultaron los mejores en todos los días de medición (cuadro 14, figura 19). En el día 1, 5 y 6 los porcentajes de inhibición del EJS2 y EJS1 no tuvieron diferencias significativas. En los días 2, 3 y 4, los efectos de los tratamientos EJS2 y Q4 no tuvieron diferencias. Los porcentajes de inhibición de los cinco testigos fueron significativamente iguales a partir del

día 4, mientras que en los días anteriores mostraron algunas diferencias, principalmente el TAL4 y TAL1, con 0.9% y 0.15% de ácido láctico respectivamente pues estos presentaron mayor crecimiento que el testigo en los primeros días (cuadros 14 y 15).

Cuadro 14. Porcentajes de inhibición diarios de Botrytis cinerea con tratamientos simples de extracto etanólico de jengibre seco y quitsano.

Tratamiento		Medias de inhibición diaria de crecimiento (%)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
1	Q1	0	54.7a	44.9b	32.1d	25.1d	15.8cd	9.0cd	8.9cd
2	Q2	0	20.3bc	44.0b	37.3cd	29.3cd	18.2c	12.1cd	12.5bc
3	Q3	0	13.9c	45.8b	45.6bc	38.8bc	33.8b	22.7bc	19.3bc
4	Q4	0	48.4a	57.8a	50.1ab	44.0ab	37.0b	26.4b	15.8bc
5	EJS1	0	52.0a	46.9b	44.2bc	39.4bc	42.2ab	36.0ab	22.9b
6	EJS2	0	41.9ab	65.3a	61.2a	53.8a	53.0a	47.4a	42.6a
15	Testigo	0	0.0c	0.0c	0.0e	0.0e	0.0e	0.0d	0.0d
16	TAL1	0	-43.3d	-17.2de	-11.4fg	-5.3e	4.6de	4.8d	0.0d
17	TAL2	0	16.5c	-2.3c	-6.7ef	-2.9e	8.2cde	8.2d	0.0d
18	TAL3	0	8.2c	-7.8cd	-14.6fg	-3.7e	7.9cde	5.9d	0.0d
19	TAL4	0	-31.0d	-26.5e	-19.8g	-7.8e	0.0e	1.3d	0.0d

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor, con un 95% de confianza ($\alpha=0.05$).

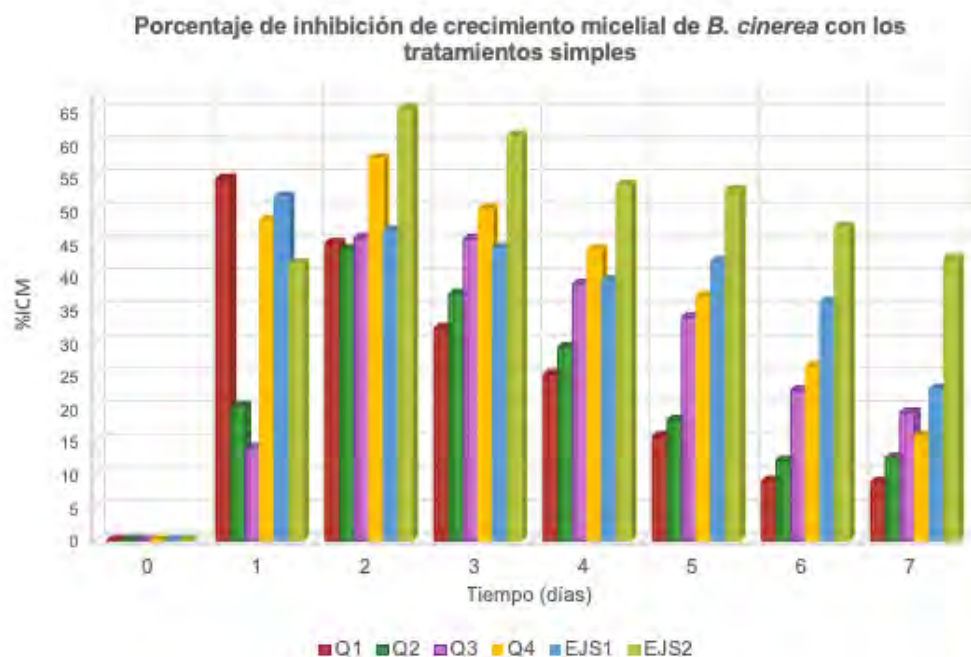


Figura 19. Comparación de porcentajes de inhibición de tratamientos simples de quitosano y de los extractos de jengibre.

Los tratamientos 10, 12, 13 y 14 tuvieron los mejores resultados en todos los días de medición, siendo significativamente iguales (cuadro 15, figura 20). En el día 2 y 4, el tratamiento 11 no tuvo diferencias significativas con los antes descritos. Los tratamientos 13 y 14, que contienen EJS2 con quitosano en concentraciones de 6 y 9 mg/ml, respectivamente, presentaron una inhibición mayor al 50% todos los días de medición.

Cuadro 15. Porcentajes de inhibición de crecimiento micelial diario de Botrytis cinerea con tratamientos combinados de extracto etanólico de jengibre seco y quitsano.

Tratamiento		Medias de inhibición diaria de crecimiento (%)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
7	J1Q1	0	66.4ab	70.1bcd	59.9d	54.5b	47.2c	40.9cd	39.1de
8	J1Q2	0	51.5b	62.2d	56.5d	51.5b	50.5c	36.4d	37.4e
9	J1Q3	0	52.8b	68.3cd	67.1bcd	64.8ab	58.6abc	45.4bcd	48.2bcd
10	J1Q4	0	73.6a	81.7a	78.3ab	73.8a	69.4a	63.0a	58.0ab
11	J2Q1	0	66.3ab	72.7abcd	66.5cd	60.1ab	55.9bc	49.7bc	44.9cde
12	J2Q2	0	58.5ab	78.0abc	71.8abc	65.2ab	58.7abc	54.1ab	53.2abc
13	J2Q3	0	62.2ab	79.1ab	77.2abc	69.9a	63.3ab	55.6ab	53.9abc
14	J2Q4	0	73.6a	80.4ab	79.3a	71.6a	69.7a	63.9a	61.0a
15	Testigo	0	0.0c	0.0e	0.0e	0.0c	0.0d	0.0e	0.0f
16	TAL1	0	-43.3d	-17.2fg	-11.4efg	-5.3c	4.6d	4.7e	0.0f

17	TAL2	0	16.5c	-2.3e	-6.7ef	-2.9c	8.2d	8.2e	0.0f
18	TAL3	0	8.2c	-7.8ef	-14.6fg	-3.7c	7.9d	5.9e	0.0f
19	TAL4	0	-31.0d	-26.5g	-19.8g	-7.8c	0.0d	1.3e	0.0f

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples de Tukey de un solo factor, con un 95% de confianza ($\alpha=0.05$).

La CI50 del quitosano se calculó para los días que la inhibición fue mayor al 50%. Fue mayor para el día 3 ya que el porcentaje de inhibición fue disminuyendo.

Cuadro 16. Concentración inhibitoria media (CI50) del quitosano.

	48 h	72 h
Pendiente	0.67	0.69
Intersección	4.49	4.35
Test	5	5
Log(C%)	0.77	0.95
CI50	5.84 mg/ml	8.82 mg/ml

*Los valores fueron calculados utilizando la función Probit en el programa Excel.

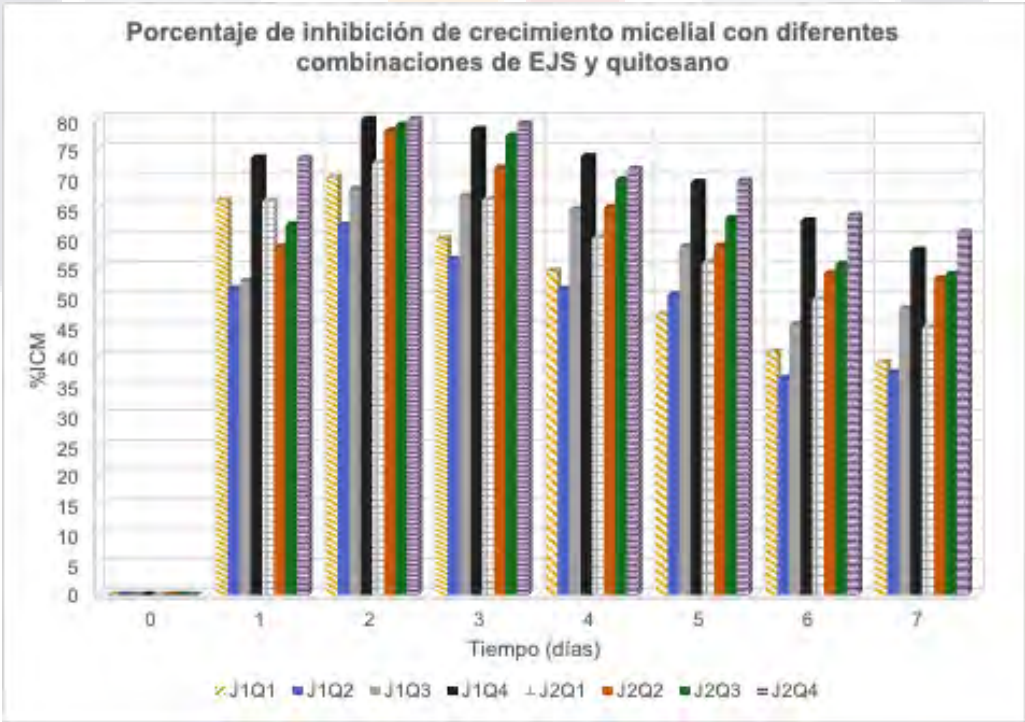
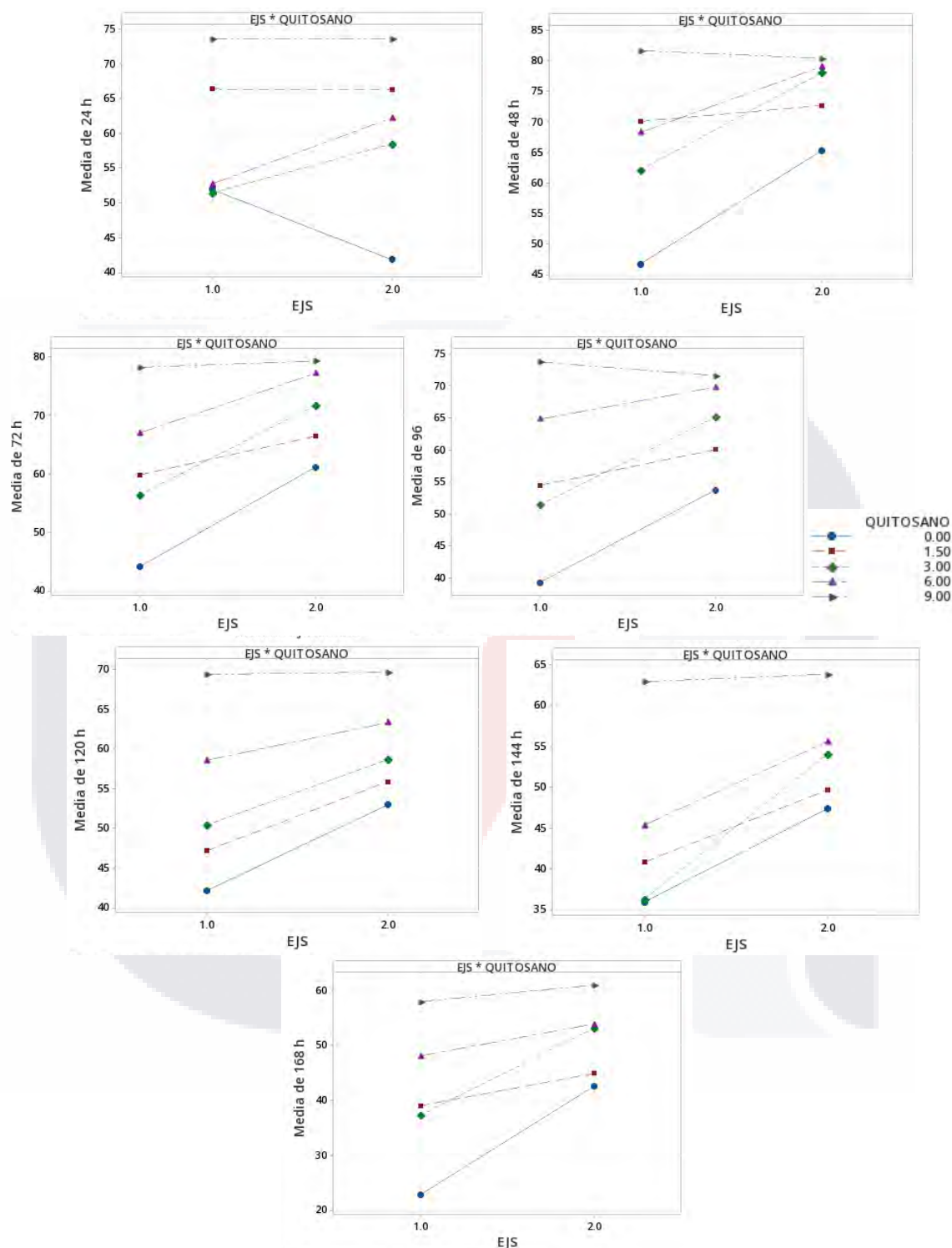


Figura 20. Comparación de porcentajes de inhibición de crecimiento micelial diario de *B. cinerea* con tratamientos combinados de extracto de jengibre seco y quitosano.

Según la agrupación de las medias realizada por la prueba de comparaciones de Tukey con dos factores (cuadro 17, figura 21), el tratamiento simple EJS1 no tuvo diferencias con las combinaciones J1Q1, J1Q2 y J1Q3, a las 24 horas, pero sí con la combinación J1Q4 que tiene mayor cantidad de quitosano. Del segundo día en adelante, la inhibición causada por EJS2 fue estadísticamente igual a la de J2Q2. A partir en los días 4, 5 y 6, el efecto inhibitorio de EJS1 no fue significativamente diferente de J1Q2, y tampoco tuvo diferencia con el J1Q1 en el día 5 y 6. Del cuarto día hasta el séptimo, las combinaciones J2Q1, J2Q3 y J2Q4 tuvieron un porcentaje de inhibición sin diferencias respecto al simple de extracto de jengibre seco al 2%. De los tratamientos combinados con EJS1, el que tuvo la mayor concentración de quitosano (J1Q4) tuvo diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento simple de extracto de jengibre seco al 1%, durante todo el tiempo del ensayo. De igual forma, la inhibición de J2Q4 resultó siempre mayor (y significativamente diferente) que la de EJS2.

Inhibición de crecimiento micelial de los tratamientos de EJS al 1 y 2% y las combinaciones quitosano-EJS



Todos los términos que se muestran están en el modelo.

Figura 21. Porcentajes de inhibición de crecimiento de *B. cinerea* con las combinaciones de EJS-quitosano y los tratamientos simples de EJS.

*Gráficas factoriales que ilustran las diferencias entre los tratamientos EJS1, EJS2, J1Q1, J1Q2, J1Q3, J1Q4, J2Q1, J2Q2, J2Q3 y J2Q4, utilizando el modelo de dos factores. Los valores en la etiqueta de datos del quitosano indican la concentración de éste presente en cada tratamiento (0, 3, 6 y 9 mg/ml).

Cuadro 17. Comparación de los porcentajes de ICM diario de *Botrytis cinerea* de las combinaciones de EJS-quitosano y los tratamientos simples de EJS.

Tratamiento		Medias de inhibición diaria de crecimiento (%)							
		0	1	2	3	4	5	6	7
5	EJS1	0	52.0bc	46.9e	44.2e	39.4c	42.2e	36.0d	22.9e
6	EJS2	0	41.9c	65.3d	61.2cd	53.8b	53.0bcde	47.4bcd	42.6cd
7	J1Q1	0	66.4ab	70.1bcd	59.9cd	54.5b	47.2de	40.9cd	39.1d
8	J1Q2	0	51.5bc	62.2d	56.5d	51.5bc	50.5cde	36.4d	37.3d
9	J1Q3	0	52.8bc	68.3cd	67.1bcd	64.8ab	58.6abc	45.4bcd	48.2bcd
10	J1Q4	0	73.6a	81.7a	78.3ab	73.8a	69.4a	63.0a	58.0ab
11	J2Q1	0	66.3ab	72.7abcd	66.5bcd	60.1ab	55.9bcd	49.7bc	44.9cd
12	J2Q2	0	58.5ab	78.0abc	71.8abc	65.2ab	58.7abc	54.1ab	53.2abc
13	J2Q3	0	62.2ab	79.1abc	77.2ab	69.9a	63.3ab	55.6ab	53.9abc
14	J2Q4	0	73.6a	80.4ab	79.3a	71.6a	69.7a	63.9a	61.0a

*Las medias que no comparten una letra son significativamente diferentes. Método para comparaciones múltiples Tukey de dos factores (2 niveles de EJS y 5 niveles de quitosano), $\alpha=0.05$). Para agregar a la comparación los EJS simples se añadió el nivel 0 de quitosano.

Comparación de la inhibición de crecimiento micelial de *B. cinerea* con tratamientos de quitosano y combinaciones quitosano-EJS

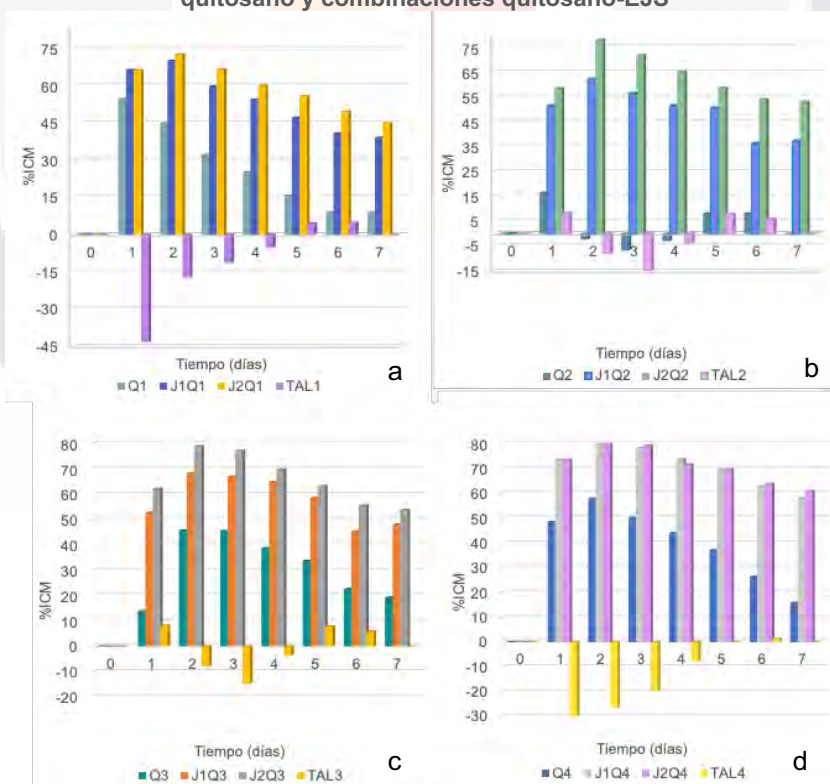


Figura 22. Comparación de los porcentajes de inhibición de *B. cinerea* de los tratamientos de quitosano simples con las combinaciones que los contienen.

*a: Q1(1.5 mg/ml), J1Q1, J2Q1, TAL1; b: Q2 (3 mg/ml), J1Q2, J2Q2, TAL2; c: Q3 (6 mg/ml), J1Q3, J2Q3, TAL3; y d: Q4 (9 mg/ml), J1Q4, J2Q4, TAL4.

En la figura 22 se compararon las combinaciones con tratamientos simples, según su contenido de quitosano para ver las diferencias entre tratamientos de puro quitosano, quitosano con extracto de jengibre seco al 1 y al 2%, y su testigo correspondiente.

A continuación se presentan en el cuadro 18 los índices de sinergia para los tratamientos combinados. Los valores mayores a 1 indican interacción sinérgica; iguales a 1, interacción aditiva; y menores a 1, antagonista. Esta clasificación es matemática, y no necesariamente describe la respuesta biológica, es decir, el que un valor sea menor a 1 no significa que en el sentido biológico existe un antagonismo. Las mejores medias de los valores corresponden a los tratamientos J1Q4 y J2Q4, mientras J1Q4 tiene la mayor cantidad de índices de sinergia mayores a 1, lo que significa que la combinación de dichas concentraciones de quitosano y EJS tuvo un mejor efecto que el matemáticamente esperado.

Cuadro 18. Índice de sinergia de los tratamientos combinados.

Tratamiento	ÍNDICE DE SINERGIA							
	24 h	48 h	72 h	96 h	120 h	144 h	168 h	Media
J1Q1	0.85	0.99	0.96	1.00	0.92	0.98	1.31	1.00
J1Q2	0.83	0.89	0.87	0.90	0.96	0.83	1.15	0.92
J1Q3	0.90	0.96	0.96	1.03	0.95	0.90	1.27	1.00
J1Q4	0.98	1.05	1.08	1.12	1.09	1.19	1.65	1.17
J2Q1	0.90	0.90	0.90	0.92	0.93	0.95	0.94	0.92
J2Q2	1.09	0.97	0.95	0.97	0.95	1.01	1.07	1.00
J2Q3	1.25	0.97	0.98	0.97	0.92	0.94	1.00	1.00
J2Q4	1.05	0.94	0.98	0.97	0.99	1.04	1.18	1.02

**Valores calculados según la fórmula Abbot (1925)*

3.7 DISCUSIÓN

Los tratamientos de combinaciones de sustancias de origen natural reconocidas como seguras para la salud humana en dosis pequeñas han resultado ser efectivos en diversas investigaciones (Romanazzi & Feliziani, 2014; Sanzani et al., 2009), tanto *in vitro* como *in vivo*, ya sea para potenciar el efecto de las sustancias que los componen y así disminuir las concentraciones utilizadas de cada una, o para disminuir la cantidad a utilizar de alguno de los fungicidas tradicionales ya empleados, mediante la incorporación de extractos vegetales, sales inorgánicas u otros compuestos al plan de manejo de enfermedades.

Los tratamientos aumentaron su porcentaje de inhibición a mayores concentraciones, aunque algunos días las diferencias en concentración no se reflejaron en diferencias significativas en los resultados. El mejor tratamiento simple fue el de extracto de jengibre seco al 2% (cuadro 14, figura 18), cuya inhibición fue la mayor en todos los días del ensayo, oscilando entre 42.6 y 65.3%. Pero en los días 1, 5 y 6 no tuvo diferencias significativas con el EJS al 1%, mientras que en los días 2, 3 y 4 fue estadísticamente igual que el quitosano en una concentración de 9mg/ml, cuyo mayor porcentaje de inhibición obtenido fue 52%. La menor de extracto de jengibre seco tuvo porcentajes de inhibición similares algunos días que la mayor, pero en el día último las diferencias en porcentajes fueron significativas, con una diferencia de más de 20 puntos porcentuales.

Los porcentajes de inhibición de los diferentes tratamientos tendieron a disminuir a partir del día 4, debido a que las mayores diferencias entre los valores del crecimiento del hongo y del testigo se mostraron en los días 2 y 3 (cuadros 15 y 16).

Se calculó la concentración inhibitoria media del quitosano según los tratamientos simples y se obtuvo una CI₅₀ de 5.84 mg/ml a las 48 horas, la cuál aumentó a 8.82 mg/ml para las 72 horas, lo cuál indica que para mantener los porcentajes de inhibición en el tiempo es necesaria una dosis más alta de la sustancia empleada. Estos datos aunque son valores menores, están dentro de los mismos rangos que los obtenidos por El-Mougy y colaboradores (2008), que

realizaron un trabajo *in vitro* contra *B. cinerea* en el que lograron 92.8% de inhibición del hongo con 10 mg/ml de quitosano, y 72.2% con una concentración de 5 mg/ml. Además, estos autores hicieron un trabajo *in vivo* en fresa, y con las concentraciones de 10 mg/ml tuvieron un índice de pudrición de entre 10 y 30.2%.

Sandoval y colaboradores (2018) obtuvieron resultados similares al anterior y mejores que el presente trabajo, pues con una concentración de quitosano de 10 mg/ml hubo 100% de inhibición, mientras que con 5 mg/ml, el valor fue de 83%, en condiciones *in vitro*.

Liu y colaboradores (2007) obtuvieron inhibición total de *B. cinerea in vitro* utilizando una concentración de 5 mg/ml de quitosano, ácido clorhídrico al 1% de solvente, y midiendo a las 72 horas. Otro estudio comparó quitosanos de diferente peso molecular contra *B. cinerea in vitro*, y sus concentraciones efectivas fueron marcadamente menores: las CI50 que calcularon oscilaron, según el peso molecular del quitosano entre 1.4 y 2.4 mg/ml.

En los resultados expresados en las tablas de inhibición de crecimiento micelial (cuadros 14, 16 y 17), ya está considerado el efecto del ácido láctico para cada uno de los tratamientos que lo incluyen, pues para los tratamientos que incluyeron quitosano fueron tomados como testigos los grupos con la concentración de ácido láctico correspondiente, eliminando así cualquier interferencia en los datos. Además, al comparar el testigo absoluto con los testigos que contienen ácido láctico, el crecimiento (cuadro 12) en esos cinco grupos no presentó diferencias significativas a partir de la medición de las 96 horas. Lo anterior indica que el efecto del ácido láctico utilizado en diferentes concentraciones para disolver el quitosano que se agregó a los medios de los tratamientos 1, 2, 3, 4, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13 y 14 no tuvo efecto significativo en el crecimiento del micelio de *B. cinerea* en el medio de cultivo a partir del día 4. En cuanto a los primeros días del ensayo, el testigo absoluto sí tuvo diferencias con algunos de los testigos con ácido láctico. A las 24 y 48 horas, el testigo absoluto no tuvo diferencias estadísticamente significativas con los testigos AL2 y AL3, aunque sí las tuvo con AL1 y AL4 (0.15 y 0.9% de ácido láctico), los que tuvieron un mayor crecimiento radial de *B. cinerea*. En la hora 72, los datos de

los testigos AL3 y AL4 (0.15 y 0.9% de ácido láctico), son los que fueron diferencias (mayores) al testigo absoluto.

Al comparar tratamientos simples con combinados (cuadro 17) se observó que EJS1 no tuvo diferencias con las combinaciones J1Q1, J1Q2 y J1Q3 (cuadro 17) a las 24 horas, pero sí con la combinación J1Q4 que tiene una concentración de 9 mg/ml quitosano. De los tratamientos combinados con EJS1, el que tuvo la mayor concentración de quitosano (J1Q4) tuvo diferencias estadísticamente significativas respecto al tratamiento simple de extracto de jengibre seco al 1%, durante todo el tiempo del ensayo. La inhibición causada por EJS2 fue estadísticamente igual a la de J2Q1 todos los días desde el segundo, es decir, los resultados del tratamiento de extracto de jengibre seco al 2% no se vieron afectados significativamente por la adición de quitosano a concentración de 1.5 mg/ml. Los días 4, 5 y 6, el efecto inhibitorio de EJS1 fue estadísticamente igual que el de J1Q1 y J1Q2, es decir, la adición de 1.5 y 3 mg/ml de quitosano no representó diferencias matemáticas significativas. La inhibición de J2Q4 resultó siempre mayor (y significativamente diferente) que la de EJS2.

Así pues, la agrupación de las medias arrojada por el programa estadístico varió según el día. Después de la hora 48 se empezaron a diferenciar los datos, siendo los menores crecimientos los correspondientes a los cuatro grupos que contienen EJS al 2%, así como los de EJS al 1% con 6 y 9 mg/ml de quitosano (tratamientos 9 al 14), sin diferencias significativas. A la hora 72, el tratamiento combinado de EJS al 2% con 1.5 mg/ml de quitosano fue significativamente diferente del de EJS al 2% con 9 mg/ml de quitosano (J2Q4), siendo este último junto con los grupos 10, 12 y 13 los que siguieron con los menores crecimientos, así como las mayores inhibiciones (cuadro 17), significativamente iguales, las cuáles en los días 5, 6 y 7 oscilaron entre 53.2% y 69.7%.

Dado que no hay diferencias significativas entres los tratamientos 10, 12, 13 y 14, se puede decir que según el porcentaje de inhibición *in vitro*, los mejores tratamientos combinados son el 12 y el 10, debido a que el 12 utiliza una menor cantidad de quitosano para producir un resultado estadísticamente igual que el 13 y el 14. En cuanto al tratamiento 10, utiliza una menor concentración de extracto de jengibre seco, aunque una mayor de quitosano, pero tuvo el mismo

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

crecimiento que el tratamiento 12 por lo que cualquiera de los dos son alternativas viables.

Todos los índices de sinergia obtenidos fueron cercanos a 1, según la fórmula Abbot que se puede calcular para cada porcentaje de inhibición observado. Los índices de sinergia calculados con este método no toman en cuenta el desarrollo en el tiempo del hongo, la interpretación de sus valores es matemática, más no necesariamente de respuesta biológica (Gisi, 1996), lo que significa que los valores iguales a 1 son iguales a lo esperado matemáticamente con la combinación de las dos sustancias a las concentraciones específicas a las que fue calculado. El método de Wadley, según Gisi (1996) puede ayudar a tener índices más precisos.

Los valores mayores a 1, tuvieron un porcentaje de inhibición mejor que el esperado, aunque se desconoce la razón. El mayor índice de sinergia (1.65) fue el de J1Q4 en el séptimo día de crecimiento. Tomando en cuenta solo los índices del última día de medición, J1Q4 Y J2Q4 tuvieron un efecto sinérgico y todos los demás tuvieron un efecto aditivo excepto la combinación J2Q1, que corresponde a la concentración mayor de jengibre con la menor de quitosano. Dicha combinación no tuvo ningún valor mayor a 1 en todos los días de medición, aunque todos fueron cercanos.

Valdría la pena, ya que se conoce que en general estos resultados indican que la adición de extracto de jengibre al quitosano tiene un efecto aditivo por lo menos, y sinérgico en otros, que se realizaran estudios más extensos que involucren diseños con más combinaciones y la creación de curvas de dosis-respuesta y más consideraciones como con el método Wadley para verificar la adición y la sinergia.

3.8 CONCLUSIONES

Se evaluó la efectividad del extracto de jengibre seco, el quitosano, y combinaciones de ambos para la inhibición del crecimiento micelial de *B. cinerea* *in vitro*. Los 14 tratamientos evaluados mostraron capacidad inhibitoria. El efecto de EJS2 fue significativamente diferente, durante la mayoría de las mediciones, del de EJS1. De los tratamientos simples, el mejor fue EJS2. La mayor inhibición alcanzada por EJS2 fue 65.3%. De los tratamientos combinados, los mejores fueron J1Q4, J2Q2, J2Q3 y J2Q4, que no presentaron diferencias significativas entre sí. La mayor inhibición alcanzada por J2Q4 fue de 80.4%, aunque su porcentaje de inhibición final fue de 61%. La concentración inhibitoria media del quitosano fue 8.82 mg/ml. Según los promedios de los índices de sinergia, los tratamientos J1Q4 y J2Q4 fueron los únicos cuya combinación de sus partes tuvo un porcentaje de inhibición mayor al matemáticamente esperado, es decir con efecto sinérgico. Según los índices del última día de medición, todas las combinaciones tuvieron un efecto final sinérgico o aditivo, excepto la J2Q1.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES

Se aisló e identificó *Botrytis cinerea* a partir de fresas infectadas. Se extrajo y concentró el extracto vegetal de jengibre con etanol al 96%, a partir de jengibre fresco y seco. Ambos extractos inhibieron el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea in vitro*, aunque el extracto de jengibre seco fue más efectivo que el extracto de jengibre fresco. Las concentraciones inhibitorias medias, fueron 1.03% para el extracto de jengibre seco y 10.15% para el extracto de jengibre fresco. El porcentaje de inhibición final del extracto de jengibre fresco al 4% fue menor que el del extracto de jengibre seco al 0.5%. Los porcentajes de inhibición finales del extracto de jengibre seco al 2 y 4% fueron 65.07 y 92.52%.

Además se evaluó la efectividad del extracto de jengibre seco, el quitosano, y combinaciones de ambos como inhibidores del crecimiento micelial de *B. cinerea*. Se hicieron 14 tratamientos y la totalidad de ellos mostraron capacidad inhibitoria. El efecto del extracto de jengibre seco al 2% fue significativamente diferente del de 1%, durante la mayoría de las mediciones. De los tratamientos simples, el mejor fue EJS2, cuya mayor inhibición alcanzada fue 65.3%.

De los tratamientos combinados, los mejores fueron J1Q4, J2Q2, J2Q3 y J2Q4. La mayor inhibición alcanzada por J2Q4 fue de 80.4%, aunque su porcentaje de inhibición final fue 61%. Dado que esos cuatro tratamientos fueron estadísticamente iguales se podría decir que los mejores tratamientos fueron J1Q4 y J2Q2, pues a pesar de que J2Q4 tuvo mayores porcentajes de inhibición, las diferencias no fueron significativas. La concentración inhibitoria media del quitosano fue 8.82 mg/ml. Según los promedios de los índices de sinergia, los tratamientos J1Q4 y J2Q4 fueron los únicos con efecto sinérgico. Tomando en cuanto solo los índices del última día de medición, todas las combinaciones tuvieron un efecto final sinérgico o aditivo, excepto la J2Q1.

Son necesarias más investigaciones que combinen tratamientos de quitosano y extracto de jengibre, con diseños de más niveles, para establecer qué tipo de interacción ocurre entre ambos en *Botrytis cinerea* como en otros patógenos, y trasladar los mejores tratamientos a estudios *in vivo*, ya sea sobre planta o en fruto cosechado.

CAPÍTULO V. REFERENCIAS

- Agrios, G. (2005). *Plant pathology*. USA: 5th ed. Elsevier Academic Press. eBook ISBN: 9780080473789.
- Aiba, S. & Muraiki, E. (1998). Preparation of higher N-acetylchitooligosaccharides in high yields. *Proceeding of the Third Asia-Pacific chitin and chitosan Symposium*. Feelung, Taiwán, 89-96.
- Alvarado, A., Barrera, L., Hernández, A. & Velázquez, M. (2011). Actividad antifúngica del quitosano y aceites esenciales sobre *Rhizopus stolonifer* (Ehrenb.:Fr.) Vuill., agente causal de la pudrición blanda del tomate. *Revista Colombiana de Biotecnología*, 13(2), 127-134. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=776/77621587011>.
- Álvarez-Medina, A., Silva-Rojas, H., Leyva-Mir, S., Marbán-Mendoza, N. & Rebollar-Alviter, A. (2017). Resistencia de *Botrytis cinerea* de fresa (*Fragaria x ananassa* Duch.) a fungicidas en Michoacán México. *Agrociencia*, 51(7), 783-798. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952017000700783&lng=es&tng=es.
- Antunes, M. D. C., & Cavaco, A. M. (2010). The use of essential oils for postharvest decay control. A review. *Flavour and Fragrance Journal*, 25(5), 351–366. doi:10.1002/ffj.1986
- Apolonio-Rodríguez, I., Franco-Mora, O., Salgado-Siclán, M. & Aquino-Martínez, J. (2017). Inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.). *Revista mexicana de fitopatología*, 35(2), 170-185. <https://dx.doi.org/10.18781/r.mex.fit.1611-1>
- Atarés, L., De Jesús, C., Talens, P. & Chiralt, A. (2010). Characterization of SPI-based Edible Films Incorporated with Cinnamon or Ginger Essential Oils. *Journal of Food Engineering*, 99, 384–391. 10.1016/j.jfoodeng.2010.03.004.
- Attjoui, M., Gillet, D., Eddin, N., Gueddari, E. & Moerschbacher, B. (2021). Synergistic Antimicrobial Effect of Chitosan Polymers and Oligomers. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 34(7), 770–778. doi:10.1094/MPMI-07-20-0185-R.
- Badawy, M. & Rabea, E. (2009). Potential of the biopolymer chitosan with different molecular weights to control postharvest gray mold of tomato fruit. *Postharvest Biology and Technology*, 51(1), 110-117. doi: 10.1016/j.postharvbio.2008.05.018
- Bajpai, V. K., Shukla, S., & Kang, S. C. (2008). *Chemical composition and antifungal activity of essential oil and various extract of Silene armeria L.* *Bioresource Technology*, 99(18), 8903–8908. doi:10.1016/j.biortech.2008.04.060
- Bautista-Baños, S., Ventura-Aguilar, R., Correa-Pacheco, Z. & Corona-Rangel, M. (2017). Chitosan: a versatile antimicrobial polysaccharide for fruit and vegetables in postharvest – a review. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 23(2), 103-121. <http://dx.doi.org/10.5154/r.rchsh.2016.11.030>
- Benito, P., Arranz, M., Eslava, A. (2000). Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. *Revista Iberoamericana de Micología*, 17, S43-S46. <http://www.reviberoammicol.com/2000-17/S43S46.pdf>
- Berenbaum, M. C. (1978). A Method for Testing for Synergy with Any Number of Agents. *Journal of Infectious Diseases*, 137(2), 122–130. doi:10.1093/infdis/137.2.122
- Beristain-Bauza, S., Hernández-Carranza, P., Cid-Pérez, T., Ávila-Sosa, R., Ruiz-López, I. & Ochoa-Velasco, C. (2019). Antimicrobial Activity of Ginger (*Zingiber Officinale*) and Its Application in Food Products. *Food Reviews International*, 10.1080/87559129.2019.1573829.
- Biavatti, M. W. (2009). Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(3), 371–378. doi:10.1590/s1984-82502009000300002

- Biavatti, M. W. (2009). *Synergy: an old wisdom, a new paradigm for pharmacotherapy*. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*, 45(3), 371–378. doi:10.1590/s1984-82502009000300002
- Bill, M., Sivakumar, D., Korsten, L. & Thompson, A. (2014). The efficacy of combined application of edible coatings and thyme oil in inducing resistance components in avocado (*Persea americana* Mill.) against anthracnose during post-harvest storage. *Crop Protection*, 64, 159–167. doi: 10.1016/j.cropro.2014.06.015
- Boughalleb N, Debbabi N, Jannet HB, Mighr Z, Mahjoub ME. Antifungal activity of volatile components extracted from leaves, stems and flowers of four plants growing in Tunisia. *Phytopathol Mediterr*. 2005;44:307-312
- Camiletti, B. X., Asensio, C. M., Gadban, L. C., Pecci, M. de la P. G., Conles, M. Y., & Lucini, E. I. (2016). *Essential oils and their combinations with iprodione fungicide as potential antifungal agents against the rot (Sclerotium cepivorum Berk) in garlic (Allium sativum L.) crops*. *Industrial Crops and Products*, 85, 117–124. doi:10.1016/j.indcrop.2016.02.053
- Ciliberti, N., Fermaud, M., Roudet, J. Languasco, L. & Rossi, V. (2016). Environmental effects on the production of *Botrytis cinerea* conidia on different media, grape bunch trash, and mature berries. *Australian Journal of Grape and Wine Research*, 22, 262–270. doi: 10.1111/ajgw.12217
- De Oliveira, K. Á. R., Berger, L. R. R., de Araújo, S. A., Câmara, M. P. S., & de Souza, E. L. (2017). Synergistic mixtures of chitosan and *Mentha piperita* L. essential oil to inhibit *Colletotrichum* species and anthracnose development in mango cultivar Tommy Atkins. *Food Microbiology*, 66, 96–103. doi:10.1016/j.fm.2017.04.012
- El-Ghaouth, A., Wilson, C., Wisniewski, M., Droby, S., Smilanick, J. & Korsten, L. (2002). Chapter 13 Biological Control of Postharvest Diseases of Citrus Fruits. En: *Biological Control of Crop Diseases*, 289-312. New York : CRC Press.
- El-Mougy, N., El-Gamal, N. & Abdalla, M. (2008). The use of fungicide alternatives for controlling postharvest decay of strawberry and orange fruits. *Journal of Plant Protection Research*, 48 (3), 385-396. doi: 10.2478/v10045-008-0048-z
- Elad, Y., Pertot, I., Cotes, A. & Stewart, A. (2015). Plant Hosts of *Botrytis* spp. En: *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*, (Fillinger, S. and Elad, Y., eds), 413–486. Cham: Springer International Publishing. https://doi.org/10.1007/978-3-319-23371-0_20
- Fielding, B., Knowles, C.-L., Vries, F., & Klaasen, J. (2015). Testing of Eight Medicinal Plant Extracts in Combination with Kresoxim-Methyl for Integrated Control of *Botrytis cinerea* in Apples. *Agriculture*, 5(3), 400–411. doi:10.3390/agriculture5030400
- Franco-Gaytán, I., Saucedo-Veloz, C., Calderón-Zavala, G., Cruz-Huerta, N., Teliz-Ortiz, D. & Galicia-Cabrera, R. (2018). Calidad y vida de anaquel de tres cultivares de fresa (*Fragaria ananassa*) tratadas con concentraciones altas de CO₂ por periodo corto. *Agrociencia*, 52(3), 393-406. http://www.scielo.org.mx/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1405-31952018000300393&lng=es&tlng=es.
- Giraldo, J. (2015). Propiedades, obtención, caracterización y aplicaciones del quitosano. doi: 10.13140/RG.2.1.3350.9287
- Gutiérrez, J. & Barry-Ryan, C. (2009). Antimicrobial activity of plant essential oils using food model media: Efficacy, synergistic potential and interactions with food components. *Food Microbiology*, 26(2), 142-150. doi: 10.1016/j.fm.2008.10.008
- Hooker, W. (1980). *Compendio de enfermedades de la papa*. Perú: Centro Internacional de la papa. 166 .
- Hussein, K. & Joo, J. (2018). Antifungal activity and chemical composition of ginger essential oil against ginseng pathogenesis fungi. *Current Research in Environmental & Applied Mycology (Journal of Fungal Biology)*, 8(2), 194-203. doi:10.5943/cream/8/2/4
- Jarvis, W. (1962). The infection of strawberry and raspberry fruits by *Botrytis cinerea* Fr. *Annals of applied Biology*, 50(2), 569-575. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1962.tb06049.x>

- Joya-Dávila, J., Ramírez-González, S., López-Báez, O. & Alvarado-Gaona, A. (2015) Efecto antifúngico de hidrodestilados de *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif&Par). *Ciencia y Agricultura*, 12(2), 21-29. doi: 10.19053/01228420.4350.
- Kosman, Evsey. (1996). Procedures for calculating and differentiating synergism and antagonism in action of fungicide mixtures. *Phytopathology*. 86. 1263-1272.
- Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, P., Gargova, S. (2007). Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry*, 102, 764-770. doi:10.1016/j.foodchem.2006.06.023
- Kumar G., Karthik L. & Rao K. (2011). A review on pharmacological and phytochemical properties of *Zingiber officinale* Roscoe (Zingiberaceae). *Journal of Pharmacy Research*, 4(9), 2963-2966.
- Lárez, C. (2006). Quitina y quitosano: materiales del pasado para el presente y el futuro. *Avances en Química*, 1(2), 15-21. ISSN: 1856-5301. <https://www.redalyc.org/articulo.oa?id=933/93310204>
- Larios-Palacios, O., López-Vázquez, E., Rodríguez, A., Ruiz-Espinoza, F., Solano-Vidal, R. & Serrato-Cruz, M. (2020). Evaluación *in vitro* de métodos contra *Botrytis cinerea*. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. <https://doi.org/10.29312/remexca.v11i3.2077>.
- Latorre, B., Rioja, M. & Lillo, Catalina. (2002). Efecto de la temperatura en el desarrollo de la infección producida por *Botrytis cinerea* en flores y bayas de uva de mesa. *Ciencia e Investigación Agraria: Revista Latinoamericana de Ciencias de la Agricultura*, 29(3), 145-152.
- León, J. (2000). *Botánica de los cultivos tropicales*. Costa Rica: Agroamérica – IICA.
- Malandrakis, A. A., Kavroulakis, N., & Chrysikopoulos, C. V. (2019). Synergy between Cu-NPs and fungicides against *Botrytis cinerea*. *Science of The Total Environment*, 135557. doi:10.1016/j.scitotenv.2019.135557
- Mao, Q., Xu, X., Cao, S., Gan, R., Corke, H., Beta, T. & Li, H. (2019). Bioactive Compounds and Bioactivities of Ginger (*Zingiber officinale* Roscoe). *Foods*, 8(6), 185. <https://doi.org/10.3390/foods8060185>
- Martínez, A., Díaz, G. & Ramírez, R. (2019). Estudio comparativo de obtención, caracterización y actividad antioxidante de quitosano a partir de exoesqueletos de camarón estero y camarón de altamar. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4, 1002-1013.
- Mertely, J., MacKenzie, S. & Legard, D. (2002). Timing of fungicide applications for *Botrytis cinerea* based on development stage of strawberry flowers and fruit. *Plant Disease*, 86, 1019-1024.
- Moon, Y., Lee, H. & Lee, S. (2018). Inhibitory effects of three monoterpenes from ginger essential oil on growth and aflatoxin production of *Aspergillus flavus* and their gene regulation in aflatoxin biosynthesis. *Applied Biological Chemistry*, 61, 243–250. <https://doi.org/10.1007/s13765-018-0352-x>
- Musiol, R., Mrozek-Wilczkiewicz, A. & Polanski, J. (2014). Synergy Against Fungal Pathogens: Working Together is Better Than Working Alone. *Current Medicinal Chemistry*, 21(7), 870-893. Bentham Science Publishers
- Muzzarelli, R. (1977). Enzymatic synthesis of chitin and chitosan. En: *Chitin* (164-167). Pergamon Press, Oxford University.
- Nair, N. & Allen, R. (1993). Infection of grape flowers and berries by *Botrytis cinerea* as a function of time and temperature. *Mycal. Res.* 97(8), 1012-1014.
- Nobrega, L., Monteiro, A., Meireles, M., Angela, A. & Marques, M. (1997). Comparison of ginger (*Zingiber officinale* Roscoe) oleoresin obtained with ethanol and isopropanol with that obtained with pressurized CO₂. *Food Science and Technology*, 17(4), 408-412. <https://dx.doi.org/10.1590/S0101-20611997000400013>
- Olea, Andrés F., Angelica Bravo, Rolando Martínez, Mario Thomas, Claudia Sedan, Luis Espinoza, Elisabeth Zambrano, Denisse Carvajal, Evelyn Silva-Moreno, and Héctor

- Carrasco. 2019. "Antifungal Activity of Eugenol Derivatives against *Botrytis Cinerea*" *Molecules*, 24(7), 1239. <https://doi.org/10.3390/molecules24071239>
- Organización Mundial de la Salud. (1999). *Monographs on Selected Medicinal Plants*. Ginebra, Suiza.
- Pandey, S. & Chadha, A. (1993). *A Textbook of Botany - Plant Anatomy and Economic Botany, Volume III*. India: Vikas Publishing House.
- Pei, Y., Tao, Q. J., Zheng, X., Li, Y., Sun, X., Li, Z., ... Gong, G. (2018). *Phenotypic and Genetic Characterization of Botrytis cinerea Population from Kiwifruit in Sichuan Province, China. Plant Disease*. doi:10.1094/pdis-04-18-0707-re
- Perdones, A., Sánchez-González, L., Chiralt, A., & Vargas, M. (2012). Effect of chitosan-lemon essential oil coatings on storage-keeping quality of strawberry. *Postharvest Biology and Technology*, 70, 32-41. doi: 10.1016/j.postharvbio.2012.04.002
- Pérez, M., Flores, P., García, V. & Lozano V. (1995). Factores genéticos y ambientales relacionados con la dinámica temporal y efecto de las enfermedades en frijol (*Phaseolus vulgaris* L.) en Marín, Nuevo León, México. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 13 (1), 1-9.
- Petrasch, S., Knapp, S., Van Kan, J. & Blanco-Ulate, N. (2019). Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*, 20(6), 877-892. <https://doi.org/10.1111/mpp.12794>
- Plotto, A., Roberts, D. D., & Roberts, R. G. (2003). *EVALUATION OF PLANT ESSENTIAL OILS AS NATURAL POSTHARVEST DISEASE CONTROL OF TOMATO (LYCOPERSICON ESCULENTUM)*. *Acta Horticulturae*, (628), 737–745. doi:10.17660/actahortic.2003.628.93
- Prusky, D. & Lichter, A. (2007). Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. *FEMS Microbiology Letters*, 286(1), 1-8. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2006.00603.x>
- Rahman, M. H., Shovan, L. R., Hjeljord, L. G., Aam, B. B., Eijlsink, V. G. H., Sørli, M., & Tronsmo, A. (2014). *Inhibition of Fungal Plant Pathogens by Synergistic Action of Chito-Oligosaccharides and Commercially Available Fungicides*. *PLoS ONE*, 9(4), e93192. Doi: 10.1371/journal.pone.0093192
- Ramírez, S., López, O., Guzmán, T., Munguía, S. & Espinosa, S. (2011). Actividad antifúngica *in vitro* de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et ál. *Tecnología en Marcha*, 24(2), 3-17.
- Rattanapitigorn, P., Arakawa, M. & Tsuru, M. (2006). Vanillin enhances the antifungal effect of plant essential oils against *Botrytis cinerea*. *The International Journal of Aromatherapy*, 16, 193–198.
- Reyes-Najar, A., Castro-Vargas, H., Rodríguez-Varela, L., Quijano-Celis, C. & Parada-Alfonso, F. (2011). Obtención de extractos de jengibre (*Zingiber officinale*) empleando CO₂ supercrítico. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*, 35(136), 381-385. http://www.scielo.org.co/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0370-39082011000300011&lng=en&tlng=es.
- Rodríguez-Pedroso, A., Ramírez-Arrebató, M., Rivero-González, D., Bosquez-Molina, E., Barrera-Necha, L. & Bautista-Baños, S. (2009). Propiedades químico-estructurales y actividad biológica de la quitosano en microorganismos fitopatógenos. *Revista Chapingo Serie Horticultura*, 15(3), 307-319. doi: 10.5154/r.rchsh.2009.15.042
- Romanazzi, G., Nigro, F. & Ippolito, A. (2001). Chitosan in the control of postharvest decay of some Mediterranean fruits. En: Muzarelli, R. (Editor), *Chitin Enzymology* (141-146), Italy.
- Sandoval, M., Jiménez, R., Santoyo, G., Alva, P., López, J. & Loeza, P. (2018). Compósitos de quitosano-ácidos grasos reducen la infección de *Botrytis cinerea* en fresa en poscosecha. *Nova scientia*, 10(21), 207-227. <https://dx.doi.org/10.21640/ns.v10i21.1599>
- Sanzani, S.M., Nigro, F., Mari, M., Ippolito, A., 2009. Innovations in the control of postharvest diseases of fresh fruits and vegetables. *Arab J. Plant Protect*. 27, 240–244.

TESIS TESIS TESIS TESIS TESIS

Sasidharan, I.; Menon, A. N. Comparative Chemical Composition and Antimicrobial Activity Fresh & Dry Ginger Oils (*Zingiber Officinale Roscoe*). *Int. J. Curr. Pharm. Res.* 2010, 2, 40–43.

Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Rural, Pesca y Alimentación. (2017) <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>

Šernaitė, L., Rasiukevičiūtė, N., Dambrauskienė, E., Viškelis, P. & Valiuškaitė, A. (2020). Biocontrol of strawberry pathogen *Botrytis cinerea* using plant extracts and essential oils. *Zemdirbyste-Agriculture*, 107(20), 147–152. DOI: 10.13080/z-a.2020.107.019

Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2016 <https://www.gob.mx/cms/uploads/attachment/file/257075/Potencial-Fresa.pdf>

Singh, G., Kapoor, I., Singh, P., De Heluani, C., De Lampasona, M. & Catalan, C. (2008). Chemistry, antioxidant and antimicrobial investigations on essential oil and oleoresins of *Zingiber officinale*. *Food and Chemical Toxicology*, 46(10), 3295-3302. <https://doi.org/10.1016/j.fct.2008.07.017>.

Sivasothy Y., Chong W., Hamid A., Eldeen I., Sulaiman S. & Awang K. (2011). Essential oils of *Zingiber officinale* var. rubrum Theilade and their antibacterial activities. *Food Chemistry*, 124(2), 514–517. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2010.06.062>

Stoilova, I., Krastanov, A., Stoyanova, A., Denev, A. & Gargova, S. (2007). Antioxidant activity of a ginger extract (*Zingiber officinale*). *Food Chemistry*, 102, 764-770. doi: 10.1016/j.foodchem.2006.06.023.

Tripathi, P., Dubey, N. K., & Shukla, A. K. (2007). *Use of some essential oils as post-harvest botanical fungicides in the management of grey mould of grapes caused by Botrytis cinerea*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 24(1), 39–46. doi:10.1007/s11274-007-9435-2

Tzortzakis, N. G., & Economakis, C. D. (2007). *Antifungal activity of lemongrass (Cymbopogon citratus L.) essential oil against key postharvest pathogens*. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 8(2), 253–258. doi:10.1016/j.ifset.2007.01.002

Velasco, J., Díaz, G., Ramírez, R. & Pérez, L. (2019). Producción de quitosano a partir de desechos de camarón generados del procesamiento industrial. *Investigación y Desarrollo en Ciencia y Tecnología de Alimentos*, 4, 897-901.

Wang, H. & Ng, T. (2005). An Antifungal Protein from Ginger Rhizomes. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 336, 100–104. 10.1016/j.bbrc.2005.08.058.

Williamson, B., Tudzynski, B., Tudzynski, P. & Van Kan, J. (2007). *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology*, 8: 561-580. doi:10.1111/j.1364-3703.2007.00417.x

Wilson, C., Solar, J. El Ghaouth, A. & Winsniewski, M. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease*, 81, 204-210.

Yamamoto-Ribeiro, M., Grespan, R., Kohiyama, C., Dias, F., Galerani, S., Leite, E., Alves, B., Graton, J. & Machinsky, M. (2013). Effect of *Zingiber officinale* essential oil on *Fusarium verticillioides* and fumonisin production. *Food Chemistry*, 141(3), 3147-3152. doi:10.1016/j.foodchem.2013.05.144

Yeh, H. Chuang, C., Chen, H., Wan, C. Chen, T. & Lin, L. (2014). Bioactive components analysis of two various gingers (*Zingiber officinale* Roscoe) and antioxidant effect of ginger extracts. *LWT – Food Science and Technology*, 55(1), 329-334. <https://doi.org/10.1016/j.lwt.2013.08.003>

Zaker, M. (2016). *Natural Plant Products as Eco-friendly Fungicides for Plant Diseases Control- A Review*. *The Agriculturists*, 14(1), 134. doi:10.3329/agric.v14i1.29111

Zhang, Q. W., Lin, L. G., & Ye, W. C. (2018). Techniques for extraction and isolation of natural products: a comprehensive review. *Chinese medicine*, 13, 20. <https://doi.org/10.1186/s13020-018-0177-x>