



Artículo

**Potencial antifúngico de extractos de cuatro especies vegetales
sobre el crecimiento de *Colletotrichum gloeosporioides*
en papaya (*Carica papaya*) en poscosecha**

Antifungal potential of extracts from four vegetables species on the growth of
Colletotrichum gloeosporioides in postharvest papaya (*Carica papaya*)

Nadia **Landero Valenzuela**^{1*}, Daniel **Nieto Ángel**¹, Daniel **Téliz Ortiz**¹, Raquel **Alatorre Rosas**¹,
Mario **Orozco Santos**², Carlos Fredy **Ortiz García**³

¹Colegio de Postgraduados, Campus Montecillo. Carretera Texcoco-México, km 36.5, Montecillo,
Texcoco, México. E-correos: nadialv@hotmail.com, dnieto@colpos.mx, dteliz@colpos.mx,
alatoros@colpos.mx

²Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Carretera Colima-
Manzanillo, km. 35, Colonia Predio La Escondida, Tecomán, C. P. 28930, Colima, Colima, México.
E-correo: orozco.mario@inifap.gob.mx

³Colegio de Postgraduados, Campus Tabasco. Periférico Carlos A. Molina, s/n, Carretera Cárdenas-
Huimanguillo, km 3, Cárdenas, Tabasco, México. E-correo: cfortiz@colpos.mx

*Autora para correspondencia: landerovn@colpos.mx

Aceptado 24-Mayo-2013

Resumen

El manejo de antracnosis por *Colletotrichum gloeosporioides* es el problema más importante en poscosecha de frutos tropicales. La actividad antifúngica de diferentes extractos vegetales fue evaluada *in vitro* e *in vivo* para controlar la antracnosis poscosecha en papaya. Extractos de ajo (*Allium sativum*)

(10 y 15 %) y canela (*Cinnamomum zeylanicum*) (0,0050; 0,0100; 0,0150 %) mostraron efecto fungicida en contra de *C. gloeosporioides* para supresión de crecimiento micelial (100 %), inhibición de germinación (100 %) y esporulación del hongo (100 %), considerándose estos extractos como los más promisorios para inhibir el desarrollo del hongo *in vitro*. Estudios *in vivo* también revelaron que los extracto de ajo (11,74 %) y canela a dosis de 0,0054 % aplicada antes y al mismo tiempo de la inoculación con *C. gloeosporioides*, fueron las dosis óptimas para el control (severidad) de la antracnosis en frutos de papaya artificialmente inoculados, mientras que a mayores dosis la severidad aumentó. La variable fitotoxicidad arrojó resultados consistentes con lo anterior, comprobándose que al aumentar las dosis de extracto de canela se presentó cambio de color en los frutos. Los resultados sugieren la posibilidad de usar estos extractos a dosis adecuadas como biofungicidas para controlar antracnosis en papaya en poscosecha.

Palabras claves: ajo, canela, crecimiento micelial, fungicidas, *in vitro* e *in vivo*, limón, neem.

Abstract

Management of anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides* is the most important issue for the tropical fruit postharvest. Antifungal activity of several plant extracts was evaluated *in vitro* and *in vivo* for controlling postharvest anthracnose of papaya. Garlic (10 and 15 %) and cinnamon (0,0050, 0,0100, 0,0150 %) extracts showed fungicidal effect against *C. gloeosporioides* in suppressing the mycelial growth (100 %), and spore germination and sporulation inhibition (100 %), being these extracts the most promising for inhibiting *in vivo* fungal growth. *In vivo* studies also revealed that garlic extracts (11,74 %) and cinnamon (0,0054 %) were applied before and the same time of the inoculation of *C. gloeosporioides*, these were optimal dose for anthracnose control (severity) on artificially inoculated papaya fruits. Phytotoxicity variable showed results consistent with the above, and found that increasing the dose of cinnamon extract was color change on the fruits. These results suggest the possibility of using these extracts in suitable doses as biofungicides for control postharvest papaya anthracnose.

Key words: cinnamon, fungal growth, fungicides, garlic, *in vitro* and *in vivo*, lemon, neem.

INTRODUCCIÓN

El fruto de papaya (*Carica papaya*) es muy susceptible a diversas enfermedades ocasionadas por hongos durante la poscosecha como son *Cladosporium* sp., *Fusarium* sp., *Alternaria* sp., *Rhizopus* sp. (Cappellini, 1988; Vásquez-López *et al.*, 2012), *Phomopsis* sp., *Botriodiplodia* y *Colletotrichum gloeosporioides*, siendo este el más importante ocasionando elevadas pérdidas que han sido informadas desde un 1 % hasta un 93 % (Paull

et al., 1997).

En México, el control de la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* se logra a través de fungicidas (Benomilo y Tiabendazol) (Sanders *et al.*, 2000; Tavares y de Souza, 2005; Liberato y Tatagiba, 2001). El uso continuo de estos compuestos trae consigo el desarrollo de resistencia en algunos microorganismos, por lo que se vuelven obsoletos, tal es el caso de Benomilo (Liberato y Tatagiba, 2001) y Tiabendazol (Gutiérrez-Alonso, J. G. *et al.*, 2003; Gutiérrez-Alonso, O.

y Gutiérrez-Alonso, J. G. 2003) que ya no presenta efectividad o es muy baja en el control del hongo *Colletotrichum gloeosporioides*. Además, el uso de estos agentes en poscosecha se ha visto restringido debido a la posibilidad de que los seres humanos estén sometidos a una exposición directa a estos compuestos químicos y a los riesgos que esto implica (Tripathi y Dubey, 2004). Por otro lado, el consumo de frutas frescas se ha incrementado debido al conocimiento público de que éstas contienen una gran cantidad de nutrimentos que ayudan a mantener la salud en los seres humanos (Spadaro y Gullino, 2004). Debido a lo anterior es necesario contar con alternativas que permitan reducir la cantidad de compuestos fungicidas que se aplican a las frutas en poscosecha.

Las alternativas de control para *Colletotrichum gloeosporioides* y otras especies son variadas. Entre las principales se encuentran el uso de aire caliente (Coates *et al.*, 1993), tratamientos hidrotérmicos (Prusky *et al.*, 1999), atmósferas modificadas (Karabulut y Baykal, 2004), luz ultravioleta (Stevens *et al.*, 1997), microorganismos como agentes de control biológico (Janisiewicz y Korsten, 2002; Spadaro y Gullino, 2004) y extractos de plantas (Bautista-Baños *et al.*, 2003).

Una de las alternativas que se han estudiado con resultados prometedores, se basa en el hecho que las plantas elaboran metabolitos secundarios, con la finalidad de disminuir el ataque de parásitos y depredadores naturales, muchos de estos compuestos se caracterizan por ser inocuos para el ser humano, y se consideran como “fungicidas naturales” (Hopkins, 1999).

El objetivo del presente trabajo fue determinar la actividad antifúngica *in vitro* e *in vivo* de diferentes extractos vegetales como control de *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de papaya en poscosecha.

MATERIALES Y MÉTODOS

Origen de los aislamientos

Se seleccionaron frutos de papaya (*Carica papaya*) en etapa de madurez de consumo, con uniformidad en apariencia y tamaño, con síntomas de “antracnosis” provenientes de Oaxaca y Veracruz; 2 de los estados con las mayores producciones a nivel nacional de esta especie vegetal (SIAP, 2011); estos fueron obtenidos de la Central de Abasto de la Ciudad de México. Los frutos fueron procesados en el Laboratorio de Enfermedades de Frutos en Poscosecha del Colegio de Postgraduados.

Aislamientos, identificación y prueba de patogenicidad de *Colletotrichum gloeosporioides*

Una vez en el laboratorio, se tomaron fragmentos del tejido enfermo de un tamaño aproximado de 5 x 5 mm, tratando de involucrar tejido infectado (20 %) y tejido sano (80 %); posterior a esto se sembraron en cajas de Petri con Agar Papa Dextrosa (PDA) y se incubaron a temperatura ambiental (26 ± 2 °C) durante 10 días. Posteriormente, una porción de tejido micelial se transfirió a otra caja de Petri con PDA con la finalidad de obtener cepas puras esporuladas. Una vez confirmada la identidad de *C. gloeosporioides*, usando claves taxonómicas para identificación de hongos de Sutton (1980) se obtuvieron 7 cepas plurispóricas (PVC16, PVC20, PVC28, PVC36, OC5, OC8 y OC14). Artificialmente se inocularon frutos sanos de papaya, a las heridas de 2 mm de diámetro x 2 mm de profundidad causadas por mondadientes de madera previamente esterilizados, se les agregaron 20 µL de esporas del patógeno a concentración de 1×10^6 ; lo anterior para reproducir la sintomatología y realizar nuevamente el aislamiento, con el fin de corroborar la

patogenicidad de *C. gloeosporioides* según los Postulados de Koch (Agris, 1995). Junto a este procedimiento se agregaron frutos testigos, a los cuales se les colocó PDA sin el hongo. Con la finalidad de evitar pérdida de patogenicidad del organismo se mantuvo una cepa madre, de la cual se obtuvo el micelio para inocular frutos sanos de papaya y hacer reislamientos los cuales fueron empleados para los bioensayos. Además del uso de claves morfológicas, la identificación del patógeno se confirmó mediante análisis moleculares.

El método de extracción se adecuó de acuerdo a lo descrito por Doyle y Doyle (1990). Para la amplificación de la extracción por PCR ('Polymerase Chain Reaction'), las regiones ITS-5,8s fueron amplificadas con los iniciadores universales ITS2 e ITS5. Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes de reacción de 25 µL. La amplificación se llevó a cabo en un termociclador C-1000 Touch™ (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA, USA) con el siguiente programa: 4 min a 95 °C, seguido de 35 ciclos de 1 min a 95 °C, 2 min a 52 °C, 1 min a 72 °C, y por último 10 min a 70 °C. Los productos de PCR obtenidos se observaron mediante electroforesis en gel de agarosa al 1 % teñido con bromuro de etidio (0,2 µg/µL); los resultados observados se documentaron a través de fotografías para posteriormente ser analizados. La secuenciación del ADN se realizó con 2 iniciadores (ITS2 e ITS5) en ambas direcciones para asegurarse de que no había lectura errónea. Los productos de PCR fueron purificados y secuenciados por el Laboratorio Nacional de Biotecnología Agrícola, Médica y Ambiental (LAMBAMA) del Instituto Potosino de Investigación Científica y Tecnológica (IPICYT), México. Las secuencias se compararon con las registradas en la base de datos GenBank® (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA).

Obtención de extractos vegetales crudos

Las diferentes especies vegetales empleadas para los procedimientos de extracción fueron recolectadas de diversos lugares. Las hojas y frutos de limón (*Citrus lemon* (L.) Burm. f.) fueron proporcionados por una huerta ubicada en el Municipio de Tecmán, Colima, por otro lado, el ajo (*Allium sativum* L.) al igual que la corteza de canela (*Cinnamomum zeylanicum*) se obtuvieron del Mercado San Antonio, del Municipio de Texcoco, Estado de México. Por último, el polvo de neem (*Azadirachta indica*) fue proporcionado por el Laboratorio de Entomología del Colegio de Postgraduados en el Estado de México.

Extracto de ajo (*Allium sativum* L.)

Semillas de ajo (600 g) se colocaron en 600 mL de etanol al 99 %. Se licuó hasta que estuvo totalmente licuado, se permitió un reposo de 24 horas, y se filtró a través de un paño de tela previamente esterilizado. Posteriormente se concentró bajo flama directa hasta que todo el etanol fue evaporado (6 horas). El extracto así obtenido se resuspendió en 200 mL de agua destilada estéril (Wagner y Bladt, 1996).

Extracto de hojas, semillas y cáscara de limón (*Citrus lemon* (L.) Burm. f.)

Se recolectaron hojas y frutos de limón, de estos últimos se utilizaron las semillas y la cáscara. Las semillas al igual que la cáscara fueron lavadas con agua corriente hasta eliminar impurezas y residuos. Se pesaron por separado las semillas (30 g de 3 kg de frutos de limón) y la cáscara (365 g de 3 kg de frutos de limón). Las primeras fueron maceradas y colocadas en un frasco de vidrio, posteriormente se agregó éter de petróleo de tal

manera que cubriera a las mismas; se dejó en reposo durante 3 días. Pasado este tiempo el extracto fue filtrado, se dejó evaporar el solvente, para lo cual fue necesario mantenerlo bajo agitación, se llevó a sequedad el extracto, resuspendiéndolo en 250 mL de agua con Tween 20®, considerándose lo anterior como el extracto al 100 %. Lo anterior se guardó en refrigeración a 10 °C para su posterior uso en los bioensayos (Manici *et al.*, 1997). Para obtener los extractos de cáscara y hojas de limón se repitió todo el procedimiento a excepción de la maceración.

Extracto de canela (*Cinnamomum zeylanicum*)

Se pesaron 50 g de corteza de canela, que se mezcló con 200 mL de agua destilada. Esto fue calentado a 100 °C por 2 h. Para extraer el aceite esencial de la fase acuosa se emplearon 200 mL de éter de petróleo 3 veces. Posteriormente se concentró a temperatura ambiental (26 ± 2 °C). El extracto volátil resultante se mantuvo a 10 °C hasta su uso para los bioensayos (Wang *et al.*, 2009).

Extracto de neem (*Azadirachta indica*)

Para realizar la extracción se empleó metanol. Polvo de semilla de neem se colocó en un frasco al cual previamente se le vaciaron 600 mL de metanol y se dejó en reposo durante 48 h. La mezcla obtenida fue filtrada usando un paño de algodón previamente esterilizado. El filtrado se concentró por agitación a temperatura ambiental (26 ± 2 °C), para lograr una mezcla homogénea se resuspendió en agua destilada estéril con Tween 20®, considerándose lo anterior como el extracto al 100 % (Kosma *et al.*, 2011).

Control de *C. gloeosporioides in vitro* utilizando extractos vegetales

Se preparó medio de cultivo (PDA), el cual se mezcló antes de su solidificación con cada una de las concentraciones ensayadas de los diferentes extractos vegetales (en 100 mL de PDA se agregó el porcentaje correspondiente) (Cuadro 1) y se vació en cajas de Petri marcadas con anterioridad. En cada placa se colocó en el centro de la misma un disco de PDA con micelio de cada una de las cepas recolectadas de *C. gloeosporioides* de 5 mm de diámetro. En total se utilizaron 23 tratamientos (Cuadro 1); cada uno constó de 3 repeticiones. El testigo químico para esta prueba fue Imazalil, el cual se preparó a 500 ppm.

Crecimiento micelial

Se midió cada 24 h el diámetro ecuatorial (en mm) en las cajas Petri con PDA en el cual los hongos crecieron, para ello se usó un vernier digital hasta que en el testigo absoluto cubrió totalmente la superficie del medio de cultivo.

Germinación de esporas

Para determinar el efecto de los extractos sobre la capacidad de las esporas para germinar se utilizaron recipientes translúcidos con capacidad de 300 μ L y se colocaron 150 μ L de medio de cultivo PDA. Antes de que el medio de cultivo solidificara se mezcló con la cantidad necesaria de extractos vegetales hasta lograr concentraciones indicadas en el Cuadro 1. Posteriormente se colocaron 20 μ L de una suspensión previamente preparada a concentración de 1×10^6 esporas por mL (20.000 esporas). Se evaluó la germinación a las 5, 10 y 15 h (datos son adimensionales, ya que fueron obtenidos del análisis del área bajo la curva del progreso del porcentaje de germinación) empleando un microscopio compuesto AO® MicroStar®, 1130 (American Optical Scientific Instruments, Buffalo, NY, USA - Reichert™,

Cuadro 1.- Tratamientos con los diferentes extractos vegetales crudos sobre *C. gloeosporioides* en papaya en poscosecha.

Tratamiento	Especie vegetal	Órgano	Concentración (%)
1		Semilla	5
2	<i>Allium sativum</i>	Semilla	10
3		Semilla	15
4		Semilla	5
5		Semilla	10
6		Semilla	15
7	<i>Citrus lemon</i>	Hoja	5
8		Hoja	10
9		Hoja	15
10		Cáscara	5
11		Cáscara	10
12		Cáscara	15
13		Corteza	0,0005
14		Corteza	0,0015
15	<i>Cinnamomum zeylanicum</i>	Corteza	0,0025
16		Corteza	0,0050
17		Corteza	0,0100
18		Corteza	0,0150
19		Semilla	0,0300
20	<i>Azadirachta indica</i>	Semilla	0,0624
21		Semilla	0,1200
22	Testigo absoluto	-	0
23	Testigo químico (PDA + Imazalil)	-	500 ppm

Inc., Depew, NY, USA) (Gutiérrez-Alonso, 2001). Una espora fue considerada germinada cuando el largo de su tubo germinativo alcanzó la mitad del diámetro de la espora (Plascencia-Jatomea *et al.*, 2003).

Esporulación

A los 10 días, cuando el hongo logró su esporulación total se determinó la

concentración de conidios. Para recolectarlos, cada caja de Petri con los diferentes tratamientos, fueron enjuagadas con agua destilada estéril, la superficie fue raspada con una varilla de vidrio y filtrada a través de una malla de algodón estéril. Alícuotas de 0,5 mL de cada suspensión con conidios fueron transferidas a una cámara de Newbauer para realizar el recuento de los conidios (datos presentados son dados en medias de números de esporas).

Control de *C. gloeosporioides* in vivo en frutos de papaya utilizando extractos crudos vegetales

Se utilizaron frutos de papaya (variedad Maradol) los cuales se conservaron bajo condiciones de laboratorio; estos fueron obtenidos de un productor con un manejo adecuado del cultivo en el Estado de Oaxaca, México. Se seleccionaron frutos sanos sin daños físicos o signos y síntomas aparentes de la enfermedad. De las 7 cepas obtenidas se seleccionó la más patogénica para llevar a cabo las pruebas (OC14); la selección se realizó obteniendo después de previa prueba que todos los aislamientos presentaron un desarrollo morfológico similar, además de que en pruebas *in vitro* todos mostraron resistencia a Benomilo.

Cada fruto fue desinfestado con hipoclorito de sodio al 2 % durante 3 minutos, frotándolos suavemente para evitar dañar el exocarpio; posteriormente se enjuagaron con agua destilada estéril y se dejaron secar a temperatura ambiental sobre papel secante. De manera paralela se preparó una solución de esporas de *C. gloeosporioides* a concentración de 1×10^6 , y extractos de canela a 0,00264; 0,0054; 0,012; 0,020 y 0,030 %, asimismo se prepararon las dosis para los extractos de ajo (5,87; 11,74; 17,61; 23,48 y 29,35 %).

Las diferentes concentraciones de extractos de canela ensayadas fueron asperjadas sobre 15 frutos (cinco concentraciones con tres repeticiones) 24 h antes de la inoculación con *C. gloeosporioides*, al mismo tiempo que la inoculación y 24 horas después de la inoculación, tres bloques fueron formados con 15 frutos cada uno. La combinación de los diferentes tiempos transcurridos entre la aplicación del extracto a diferentes dosis y la inoculación generó 15 tratamientos, un testigo químico y uno absoluto.

La inoculación se realizó haciendo heridas sobre el exocarpio de los frutos con palillos de madera estéril de 2 mm de profundi-

dad, sobre dicha herida se colocó con micropipeta una suspensión de esporas previamente preparada a concentración de 1×10^6 conidios/mL. El efecto de los extractos fue comparado con el efecto de un fungicida comercial (Imazalil). Posteriormente los frutos se colocaron en cámara húmeda (recipientes plásticos cubiertos con bolsas del mismo material, para evitar la pérdida de humedad) a temperatura de 26 ± 2 °C. Las variables fueron medidas cada 24 h.

Severidad

La severidad del daño ocasionado por la antracnosis en la superficie de los frutos se midió diariamente por medio del diámetro de la lesión característica de antracnosis (datos analizados arrojaron valores en unidades adimensionales debido a que se aplicó el área bajo la curva del progreso de la enfermedad), a partir del punto de inoculación.

Fitotoxicidad

Se determinó mediante los cambios de color en los frutos tratados en relación con los testigos, para lo cual se utilizaron imágenes digitales de los frutos tratados con extractos vegetales. Para la digitalización se utilizó una cámara Kodak EasyShare Z712 IS de 7,1 megapíxeles (Eastman Kodak Company, Rochester, NY, USA). Las fotografías se tomaron en tamaño de 1024 x 768 píxeles a distancia de 1 metro, iluminadas con una lámpara fluorescente de 20 w. El ángulo entre la lente de la cámara y la fuente de la iluminación fue de aproximadamente 45°. La apertura del diafragma utilizada fue f/2,8 y la velocidad del obturador de 1/30 s manteniendo estos parámetros constantes. Las imágenes fueron guardadas en un formato tipo JPEG. Se obtuvieron las medias de RGB (red, green, blue), que en conjunto conforman el color real del fruto de papaya, mediante el software

Adobe® Photoshop® CS5, actualización 12.0.4 (Adobe System Incorporated, San José, California, USA) que fueron analizadas estadísticamente. Los valores más cercanos a los obtenidos para el testigo absoluto correspondieron a la coloración normalmente exigida en los mercados para la especie y variedad. Se analizaron imágenes de 40 x 40 píxeles por cada tratamiento (Lúquez-Bibiloni y Aguilera-Radic, 2005).

Análisis estadístico

Los datos obtenidos fueron sometidos a pruebas de normalidad (Shapiro Wilk) y homostacididad (Barret), los datos que no cumplieron con estos supuestos (esporulación) fueron transformados mediante la fórmula $x = y^{1/2}$; donde x = dato transformado, y = concentración de esporas. Para facilitar la interpretación de los resultados, éstos se mostraron en sus valores reales (sin transformar). De igual manera se realizaron análisis de varianza y pruebas de separación múltiple de medias (Tukey, $\alpha = 0,05$) así como análisis de regresión lineal para determinar la concentración (*in vitro*) y dosis (*in vivo*) letal 50 (CL_{50}) con la ayuda de comando Solver de Microsoft® Office Excel, versión 2007 (Microsoft® Corporation, Redmond, WA, USA). Se calculó la curva del progreso de la enfermedad por medio del método de los polígonos, y las áreas resultantes fueron sometidas a análisis de varianza y a pruebas de separación de medias mediante el programa Statistical Analysis System, versión 9 para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Pruebas *in vitro*

Efecto de los extractos de ajo y limón

Con relación al crecimiento micelial de

las cepas de Veracruz y de Oaxaca se observaron diferencias estadísticas altamente significativas entre los aislamientos donde se empleó extracto de ajo ($p < 0,0001$), y a excepción del tratamiento al 5 % en todos los demás no hubo desarrollo de micelio. Los tratamientos en donde se utilizaron los extractos con algún órgano o parte de limón también presentaron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,0001$), pero hubo desarrollo del hongo; en general, las concentraciones más altas correspondieron con un menor crecimiento micelial—para estos extractos (Cuadro 2). El ajo en concentraciones de 10 y 15 % igualó el efecto del testigo químico en la concentración utilizada (500 ppm). La DL_{50} más baja (2,37 %) correspondió al ajo, mientras que la más alta (18,4 %) fue para los tratamientos con hoja de limón. Debido a que en los tratamientos con semilla de limón no hubo diferencias estadísticas significativas ($p > 0,05$) no se pudo determinar la DL_{50} .

Baños-Guevara *et al.* (2004) realizaron un estudio similar, en donde se emplearon 17 diferentes extractos vegetales, dentro de ellos, ajo, con el cual se mostró una inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* de 54,34 %, seguido por la hierba santa (*Piper auritum*) con un 48,82 %. Asimismo, Bosquez-Molina *et al.* (2010), con extracto de tomillo y limón mexicano sobre *C. gloeosporioides* y *Rhizopus stolonifer* en papaya, obtuvieron los mejores resultados con el primero, ya que a una concentración de 0,06 % no se presentó crecimiento micelial, mientras que con aceite de limón mexicano se requirió de 0,085 % para lograr el mismo resultado. En el presente trabajo ni aún a la mayor concentración (15 %) se logró inhibir completamente el crecimiento micelial, obteniéndose una DL_{50} de 16,34 %.

Los aislamientos de *C. gloeosporioides* provenientes de los estados de Veracruz y Oaxaca mostraron valores de germinación diferentes en función de las concentraciones evaluadas; en las de 10 y 15 % el extracto de

Cuadro 2.- Evaluación para crecimiento micelial (C. M.), germinación (Germ.) y esporulación (Espor.) de *Colletotrichum gloeosporioides* al aplicar extractos de ajo y limón (cáscara, hoja y semilla) para su control.†

Parámetros	Ajo			Cáscara de limón			Hoja de limón			Semilla de limón		
	C. M.*	Germ.*	Espor.**	C. M.*	Germ.*	Espor.**	C. M.*	Germ.*	Espor.**	C. M.*	Germ.*	Espor.**
Veracruz												
5 (%)	105,991 ^b	16,234 ^b	6,002 ^a	295,5 ^b	58,313 ^b	9,759 ^a	178,84 ^b	77,22 ^a	10,895 ^a	228,44 ^a	107,33 ^a	8,459 ^a
10 (%)	0 ^c	0 ^c	0 ^b	198,44 ^c	34,667 ^c	10,698 ^a	125,52 ^c	74,39 ^a	8,162 ^a	201,27 ^a	101,83 ^a	8,206 ^a
15 (%)	0 ^d	0 ^d	0 ^c	150,06 ^d	14,563 ^d	8,710 ^a	110,79 ^c	71,11 ^a	12,445 ^a	204,32 ^a	66,28 ^a	8,704 ^a
Imazalil (500 ppm)	0 ^d	0 ^d	0 ^c	0 ^e	0 ^e	0 ^b	0 ^d	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Testigo absoluto	338,43 ^a	120,14 ^a	9,296 ^a	450,69 ^a	139,889 ^a	9,590 ^a	250,22 ^a	47,78 ^a	6,187 ^a	230,52 ^a	91,94 ^a	10,155 ^a
p-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,8015	<0,0001	0,2683	0,5577	0,089	0,212	0,48
R ²	0,99	0,95	0,82	0,95	0,99	0,68	0,88	0,37	0,246	0,28	0,33	0,41
DL ₅₀ (%)	2,37			16,34		15,06						
Oaxaca												
5 (%)	100,088 ^b	12,167 ^b	1,5155 ^b	206,209 ^b	22,250 ^b	135,34 ^{ba}	193,564 ^b	47,583 ^{bc}	8,941 ^a	179,35 ^a	112,42 ^a	66,80 ^a
10 (%)	0 ^c	0 ^c	0 ^c	149,804 ^c	18,500 ^b	172,28 ^a	156,781 ^c	57,37 ^{ba}	10,695 ^a	185,38 ^a	134,38 ^a	97,78 ^a
15 (%)	0 ^c	0 ^c	0 ^c	96,633 ^d	3,583 ^c	84,06 ^b	128,398 ^d	35,08 ^c	9,002 ^a	179,35 ^a	92,38 ^a	102,25 ^a
Imazalil (500 ppm)	0 ^c	0 ^c	0 ^c	0 ^e	0 ^c	0 ^b	0 ^e	0 ^d	0 ^b	0 ^b	0 ^b	0 ^b
Testigo absoluto	357,898 ^a	114,583 ^a	8,1150 ^a	299,637 ^a	119,208 ^a	184,50 ^a	240,686 ^a	75,29 ^a	12,47 ^a	202,77 ^a	150 ^a	113,03 ^a
p-valor	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	<0,0001	0,016	<0,0001	<0,0001	0,072	0,2	0,12	0,51
R ²	0,99	0,97	0,79	0,97	0,99	0,35	0,9	0,86	0,62	0,19	0,48	0,25
DL ₅₀ (%)	5,87			10,649		18,4						

* Valores expresados son adimensionales, debido a que son el resultado de un análisis del área bajo la curva.

** Valores son la media del número de esporas.

† Letras iguales en superíndices de una misma columna indican que no hubo diferencias estadísticas significativas (Tukey > 0,05).

ajo inhibió por completo la germinación de las esporas, seguida, en efectividad, por 5 % para el mismo extracto ($p < 0,0001$). En relación al limón, para cáscara las concentraciones mayores correspondieron con una menor germinación (Cuadro 2).

Por otro lado, respecto a la esporulación de los aislamientos, hubo diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,0001$) entre tratamientos para las diferentes concentraciones de extracto de ajo, presentándose la menor esporulación a concentraciones de 10 y 15 %. Para el caso del limón, las concentraciones de extractos de las distintas partes u órganos no produjeron un efecto significativo ($p > 0,05$).

La actividad inhibitoria de compuestos de ajo ha sido ampliamente investigada. Benkeblia (2004), encontró que el ajo tiene un efecto inhibitorio antifúngico muy marcado a medida que se aumentan las concentraciones (50 mL-500 mL/1000 mL) sobre *Penicillium cyclopium* y *Fusarium oxysporum*. Kyung *et al.* (2002) también informaron que la alicina, compuesto azufrado del extracto de ajo mostró actividad antibacteriana en contra de *Staphylococcus aureus* B33.

Efecto del extracto de canela

Para los tratamientos *in vitro* con canela, se presentaron diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,0001$). En las concentraciones desde 0,0050 hasta 0,0150 % no se observó crecimiento del hongo igualando lo anterior al testigo químico; mientras que el mayor desarrollo fue para la concentración de 0,0005 %. Caso similar fue para la variable esporulación, en donde la diferencia estadística significativa marcó el mayor número de esporas para la concentración de 0,0005 % y la menor para los tratamientos de 0,0050; 0,0100 y 0,0150 % al igual que el testigo químico (Cuadro 3). Los resultados en un estudio realizado por Maqbool *et al.* (2011) fueron

similares, al encontrarse que con la aplicación de aceite de canela a concentración de 0,4 % no se presentó crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* y *C. musae*, comparado con goma arábica y aceite de limoncillo (*Cymbopogon citratus*). Asimismo, encontraron que la germinación de *C. gloeosporioides* fue inhibida en un 49,5 % con aceite de canela al 0,4 %, mientras que cuando estuvo combinado con goma arábica la inhibición fue del 85 %. Este efecto inhibitorio pudo estar relacionado con el componente eugenol, que se encuentra en mayor porcentaje en esta especie (81,2 %) (Combrinck *et al.*, 2011). Por su parte, otro autor encontró este componente en un porcentaje de 74,92 % (Tzortzakis, 2009). El cinamaldehído también es considerado como uno de los componentes de la canela con actividad antifúngica, por ejemplo, Sivakumar *et al.* (2002) demostraron que este compuesto a 30 ppm inhibió la germinación conidial y el crecimiento micelial de *Botryodiplodia theobromae*, *C. gloeosporioides* y *Gliocephalotrichum microchlamyosporum*.

Efecto del extracto de semillas de neem

Los tratamientos en los que se evaluó el extracto de neem resultaron en diferencias estadísticas altamente significativas ($p < 0,0001$) con respecto a los controles. Encontrándose el menor valor cuando se empleó la concentración de 0,0300 % para crecimiento micelial y 0,1200 % para germinación, con respecto a las demás concentraciones las cuales fueron mayores (Cuadro 4). La esporulación no fue posible llevarla a cabo debido a que los tratamientos con este extracto no lograron purificarse por lo que estaban contaminados con bacterias dando como resultado que estos no esporularan. Los resultados anteriores discreparon de los encontrados por Amadioha (2000), quien mencionó que extracto de semillas de neem

Cuadro 3.- Evaluación para crecimiento micelial, germinación y esporulación de la cepa más patogénica seleccionada de *Colletotrichum gloeosporioides* (OC14) al aplicar extracto de canela para su control.[†]

Parámetros	Crecimiento micelial*	Germinación*	Esporulación**
0,0005 (%)	75,3183 ^b	10,45 ^b	6,87 ^b
0,0015 (%)	62,1867 ^c	20,698 ^b	5,2234 ^c
0,0025 (%)	46,0050 ^d	0 ^c	5,768 ^d
0,0050 (%)	0 ^e	0 ^c	0 ^e
0,0100 (%)	0 ^e	0 ^c	0 ^e
0,0150 (%)	0 ^e	0 ^c	0 ^e
Testigo químico (500 ppm)	0 ^e	0 ^c	0 ^e
Testigo absoluto	163,415 ^a	150,46 ^a	10,16 ^a
<i>p</i> -valor	< 0,0001	< 0,0001	< 0,0001
<i>R</i> ²	0,99	0,82	0,87
DL ₅₀	0,00264 %		

[†] Letras iguales en superíndices de una misma columna indican que no hubo diferencias estadísticas significativas (Tukey > 0,05).

* Valores son adimensionales, ya que fueron obtenidos de un análisis de varianza del área bajo la curva.

** Valores son la media del número de conidios (fueron transformados con la fórmula $x = y^{1/2}$).

Cuadro 4. Evaluación para crecimiento micelial, germinación y esporulación de diferentes cepas de *C. gloeosporioides* al aplicar extracto de neem para su control.[†]

Parámetros	Crecimiento micelial*	Germinación*	Esporulación
Veracruz			
0,0300 (%)	99,59 ^b	58,667 ^b	-
0,0624 (%)	137,28 ^b	66,333 ^b	-
0,1200 (%)	124,26 ^b	56,333 ^b	-
Testigo químico (500 ppm)	0 ^c	0 ^c	-
Testigo absoluto	218,45 ^a	134,333 ^a	
<i>p</i> -valor	< 0,0001	< 0,0001	
<i>R</i> ²	0,85	0,94	
DL ₅₀	0,0996 %		
Oaxaca			
0,0300 (%)	91,3 ^b	70,567 ^b	-
0,0624 (%)	112,4 ^b	66,54 ^b	-
0,1200 (%)	98,5 ^b	52,945 ^b	-
Testigo químico (500 ppm)	0 ^c	0 ^c	-
Testigo absoluto	194,5 ^a	206,87 ^a	
<i>p</i> -valor	< 0,0001	< 0,0001	
<i>R</i> ²	0,9	0,96	
DL ₅₀	0,1006 %		

[†] Letras iguales en superíndices de una misma columna indican que no hubo diferencias estadísticas significativas (Tukey > 0,05).

* Valores son adimensionales, ya que fueron obtenidos de un análisis de varianza del área bajo la curva.

inhibió el crecimiento del patógeno *Pyricularia oryzae* en medio de cultivo, reduciendo el crecimiento radial en un 83,6 %, siendo comparable a un testigo comercial (Carbendazim 0,1 %); también difirieron de los obtenidos por Niaz *et al.* (2008) y Wang *et al.* (2010); esta diferencia en los resultados podría atribuirse a los diferentes métodos de extracción. Por ejemplo, diferentes solventes usados para la extracción pueden resultar en diferentes niveles de actividad antifúngica *in vitro*, como también, los extractos crudos de distintas especies de plantas pueden exhibir diferentes niveles de actividad en contra de *C. gloeosporioides* (Bussaman *et al.*, 2012). Incluso extractos de semillas de neem recolectadas de distintas localidades pueden presentar diferentes propiedades antifúngicas (Niaz *et al.*, 2008).

Pruebas *in vivo*

Severidad y fitotoxicidad

Las pruebas *in vivo* para el extracto de ajo en relación a la severidad, mostraron diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos ($p = 0,0012$). La concentración de 11,74 % arrojó el menor desarrollo del hongo en la herida en los frutos, mejorando el resultado obtenido con el testigo químico, mientras que para los demás tratamientos se obtuvo un grupo homogéneo (Cuadro 5).

De manera contrastante al comportamiento *in vitro*, las dosis más altas de extracto de ajo no mostraron un mayor control sobre *C. gloeosporioides*, por el contrario, la severidad se incrementó con dosis más altas. Lo anterior podría deberse a un posible fenómeno de toxicidad en el fruto que tendría como consecuencia el incremento de la severidad de la enfermedad, lo cual es consistente con el trabajo de Zoffoli *et al.* (2008), que señalan la aparición de un desorden en frutos de uva

tratados con compuestos azufrados. En los frutos de ajo se han encontrado compuestos que contienen azufre (Ichikawa *et al.*, 2006), por lo cual es posible que estos causen eventualmente alguna fitotoxicidad a dosis elevadas. Sin embargo, dicho fenómeno no se manifestó en el color del fruto (Cuadro 6) ni se ha señalado en la producción de gas etileno, maduración o firmeza que se han publicado en trabajos similares (Baños-Guevara *et al.*, 2004), por lo cual es necesario estudiar los cambios bioquímicos que sufre el fruto después de la aplicación de extractos de ajo.

Los datos de severidad en los frutos tratados con extractos de canela mostraron diferencias estadísticas altamente significativas entre tratamientos ($p < 0,0001$). El menor promedio de severidad se observó en el tiempo 2 (aplicación de canela e inoculación de esporas de *C. gloeosporioides* al mismo tiempo) con la dosis 0,0054 % (T_{2D54}), así como en el tiempo 1 (aplicación de canela 24 h antes de la inoculación de esporas de *C. gloeosporioides*) con la dosis 0,012 % (T_{1D120}), mientras que la media de severidad más grande fue para el tratamiento de tiempo 3 (aplicación de canela 24 h después de la inoculación de esporas *C. gloeosporioides*) con una dosis de 0,030 % (T_{3D300}), superando al testigo absoluto (Cuadro 5).

El fenómeno anterior indicó que la efectividad de los extractos de canela se incrementa si estos son aplicados antes de la llegada de las esporas a la superficie del fruto. La dosis de 0,020 y 0,030 % mostraron los valores de severidad más altos, y en estas mismas dosis también se pudo apreciar una alteración en los valores medios de RGB (Cuadro 6), lo cual indicó que esas dosis podrían tener un efecto perjudicial sobre la fisiología del fruto ocasionando un incremento en la severidad de la enfermedad, lo cual se vio soportado por las diferencias de color observadas en los frutos tratados con esas mismas dosis.

Cuadro 5. Evaluación de la variable severidad de antracnosis al aplicar diferentes concentraciones de extractos de ajo y canela para su control.[†]

Extracto	Parámetros	Severidad*
Ajo	5,87 (%)	55,85 ^a
	11,74 (%)	11,29 ^b
	17,61 (%)	57,41 ^a
	23,48 (%)	44,57 ^a
	29,35 (%)	51,85 ^a
	Testigo químico	52,83 ^a
	Testigo absoluto	52,67 ^a
	<i>p</i> -valor	0,0012
	<i>R</i> ²	0,79
Canela	T1 _{D26}	16,119 ^{fg}
	T1 _{D54}	12,386 ^g
	T1 _{D120}	8,950 ^g
	T1 _{D200}	14,359 ^{fg}
	T1 _{D300}	20,598 ^{fged}
	T2 _{D26}	40,161 ^{bedc}
	T2 _{D54}	1,350 ^g
	T2 _{D120}	18,893 ^{fge}
	T2 _{D200}	47,131 ^{bac}
	T2 _{D300}	23,990 ^{fgedc}
	T3 _{D26}	40,451 ^{bedc}
	T3 _{D54}	41,094 ^{bedc}
	T3 _{D120}	41,403 ^{bedc}
	T3 _{D200}	43,904 ^{bdc}
	T3 _{D300}	67,989 ^a
	Testigo químico	36,463 ^{fbedc}
	Testigo absoluto	48,555 ^{ba}
	<i>p</i> -valor	< 0,0001
	<i>R</i> ²	0,83

[†] Letras iguales en superíndices indican que no hubo diferencias estadísticas significativas (Tukey > 0,05).

* Valores son adimensionales, ya que fueron obtenidos de un análisis de varianza del área bajo la curva.

T1 = aplicación de canela 24 h antes de la inoculación de esporas de *C. gloeosporioides*. T2 = aplicación de canela e inoculación de esporas de *C. gloeosporioides* al mismo tiempo. T3 = aplicación de canela 24 h después de la inoculación de esporas *C. gloeosporioides*.

Cuadro 6.- Evaluación de la variable fitotoxicidad a los extractos de ajo y canela aplicados para el control de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya en poscosecha.[†]

Extracto	Parámetros	Media de RGB*
Ajo	5,87 (%)	43,80 ^a
	11,74 (%)	88,49 ^a
	17,61 (%)	89,10 ^a
	23,48 (%)	75,15 ^a
	29,35 (%)	80,80 ^a
	Testigo químico	84,50 ^a
	Testigo absoluto	93,35 ^a
	<i>p</i> -valor	0,3378
	<i>R</i> ²	0,44
Canela	0,00264 (%)	138,788 ^a
	0,0054 (%)	137,284 ^a
	0,012 (%)	128,879 ^c
	0,020 (%)	132,281 ^{bc}
	0,030 (%)	111,903 ^c
	Testigo químico	133,450 ^{ba}
	Testigo absoluto	134,287 ^{ba}
	<i>p</i> -valor	< 0,0001
	<i>R</i> ²	0,80

[†] Letras iguales en superíndices indican que no hubo diferencias estadísticas significativas (Tukey > 0,05).

* Los valores más cercanos a los obtenidos para el testigo absoluto corresponden a la coloración normalmente exigida en los mercados para la especie y variedad, mientras que los más alejados podrían indicar fitotoxicidad.

Maqbool *et al.* (2011) encontró diferentes efectos fungicidas al aplicar aceite de canela comparado con limoncillo, goma arábica y sus combinaciones sobre *C. gloeosporioides* en papaya. Con canela a concentración de 0,4 % combinado con goma arábica 10 %, se obtuvo el más alto efecto fungicida, retardando la aparición de los síntomas además de que se mantuvo la calidad de los frutos durante almacenamiento (13 °C, 80 % HR). Los síntomas se presentaron levemente después de mantenerse las papayas 5 días a temperatura 25 °C (60 % HR).

CONCLUSIONES

Los extractos ensayados mostraron efectividad en contra del patógeno en los análisis *in vitro*. Sin embargo, en los resultados *in vivo* dosis elevadas mostraron un incremento en la severidad de la enfermedad. Se observó que a dosis adecuadas, el uso de extractos de ajo y canela son una alternativa viable para el control de *Colletotrichum gloeosporioides* en frutos de papaya en poscosecha.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Agrios, G.N. 1995. Fitopatología. (2da. ed.) México: Editorial Limusa. 838 p.
- Amadioha, A.C. 2000. Controlling rice blast *in vitro* and *in vivo* with extracts of *Azadirachta indica*. Crop Protection. 19(5):287-290.
- Baños-Guevara, Patricia Elizabeth; Zavaleta-Mejía, Emma; Colinas-León, Ma. Teresa; Luna-Romero Isaac y Gutiérrez-Alonso, Juan Gabriel. 2004. Control biológico de *Colletotrichum gloeosporioides* [(Penz.) Penz. y Sacc.] en papaya Maradol Roja (*Carica papaya* L.) y fisiología postcosecha de frutos infectados. Revista Mexicana de Fitopatología. 22(2):198-205.
- Bautista-Baños, S.; Hernández-López, M.; Bosquez-Molina, E. and Wilson, C.L. 2003. Effect of chitosan and plant extracts on growth of *Colletotrichum gloeosporioides* anthracnose level and quality of papaya fruit. Crop Protection. 22(9):1087-1092.
- Benkeblia, N. 2004. Antimicrobial activity of essential oil extracts of various onions (*Allium cepa*) and garlic (*Allium sativum*). Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie (LWT) - Food Science and Technology. 37(2):263-268.
- Bosquez-Molina, E.; Ronquillo-de Jesús, E.; Bautista-Baños, S.; Verde-Calvo, J.R.; Morales-López, J. 2010. Inhibitory effect of essential oils against *Colletotrichum gloeosporioides* and *Rhizopus stolonifer* in stored papaya fruit and their possible application in coatings. Postharvest Biology and Technology. 57(2):132-137.
- Bussaman, Prapassorn; Namsena, Piyarat; Rattanasena, Paweena and Chandrapatya, Angsuman. 2012. Effect of crude leaf extracts on *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Sacc. Psyche. Vol 2012:Article ID 309046. 6 p.
- Cappellini, R.A.; Ceponis, M.J. and Lightner, G.W. 1988. Disorders in apricot and papaya shipments to the New York market 1972-1985. Plant Disease. 72(4):366-368.
- Coates, L.M.; Johnson, G.I. and Cooke, A.W. 1993. Postharvest disease control in mangoes using high humidity hot air and fungicide treatments. Annals of Applied Biology. 123(2):441-448.
- Combrinck, S.; Regnier, T. and Kamatou, G.P.P. 2011. *In vitro* activity of eighteen essential oils and some major components against common postharvest fungal pathogens of fruit. Industrial Crops and Products. 33(2):344-349.
- Doyle, J.J. and Doyle, J.L. 1990. Isolation of Plant DNA from fresh tissue. Focus 12:13-15.
- Gutiérrez-Alonso, J.G. 2001. Manejo integrado de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* Penz.) del mango (*Mangifera indica* L.) en postcosecha. Tesis Doctoral. Colegio de Postgraduados, Montecillo, Mexico. 105 p.
- Gutiérrez-Alonso, Juan Gabriel; Gutiérrez-Alonso, Omar; Nieto-Ángel, Daniel; Téliz-Ortiz, Daniel; Zavaleta-Mejía, Emma; Delgadillo-Sánchez, Felipe y Vaquera-Huerto, Humberto. 2003. Resistencia a Benomil y Tiabendazol en aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc. obtenidos de mango (*Mangifera indica* L.)

- en cinco regiones de México. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(3):260-266.
- Gutiérrez-Alonso, Omar y Gutiérrez-Alonso, Juan Gabriel. 2003. Evaluación de resistencia a Benomil, Thiabendazol y Azoxystrobin para el control de antracnosis [*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. and Sacc.] en frutos de guayaba (*Psidium guajava* L.) en postcosecha. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 21(2):228-232.
- Hopkins, William G. 1999. *Introduction to the plant physiology*. (2nd. ed.). New York, NY, USA: John Wiley & Sons, Inc. 512 p.
- Ichikawa, Makoto; Ide, Nagatoshi; Yoshida, Jiro; Yamaguchi, Hiroyuki and Ono, Kazuhisa. 2006. Determination of seven organosulfur compounds in garlic by high-performance liquid chromatography. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*. 54(5):1535-1540.
- Janisiewicz, Wojciech J. and Korsten, Lise. 2002. Biological control of postharvest diseases of fruits. *Annual Review of Phytopathology*. 40:411-441.
- Karabulut, Ozgur Akgun and Baykal, Necati. 2004. Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Protection*. 23(5):431-435.
- Kosma, P.; Ambang, Z.; Begoude, B.A.D.; Ten Hoopen, G.M.; Kuate, J. and Akoa A. 2011. Assessment of nematicidal properties and phytochemical screening of neem seed formulations using *Radopholus similis*, parasitic nematode of plantain in Cameroon. *Crop Protection*. 30(6):733-738.
- Kyung, K.H.; Kim, M.H.; Park, M.S. and Kim, Y.S. 2002. Alliinase-independent inhibition of *Staphylococcus aureus* B33 by heated garlic. *Journal of Food Science*. 67(2):780-785.
- Liberato, J.R. e Tatagiba, J.S. 2001. Avaliação de fungicidas *in vitro* e em pós-colheita para o controle da antracnose e da podridão peduncular em frutos de mamão. *Summa Phytopathologica*. 27(4):409-414.
- Lúquez-Bibiloni, Claudia V. y Aguilera-Radic, José Miguel. 2005. Mensura digitalizada de la evolución del color en aceitunas según el grado de madurez del fruto. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias UNCuyo*. XXXVII(2):33-40.
- Manici, Luisa M.; Lazzeri, Luca and Palmieri, Sandro. 1997. *In vitro* fungitoxic activity of some glucosinolates and their enzyme-derived products toward plant pathogenic fungi. *Journal Agricultural and Food Chemistry*. 45(7):2768-2773.
- Maqbool, Mehdi; Ali, Asgar; Alderson, Peter G.; Muda-Mohamed, Mahmud Tengku; Siddiqui, Yasmeen and Zahid, Noosheen. 2011. Postharvest application of gum arabic and essential oils for controlling anthracnose and quality of banana and papaya during cold storage. *Postharvest Biology and Technology*. 62(1):71-76.
- Niaz, Ishrat; Sitara, Uzma; Kazmi, S.A.R. and Qadri, Shahabudin. 2008. Comparison of antifungal properties of neem seed oil collected from different parts of Pakistan. *Pakistan Journal of Botany*. 40(1):403-408.
- Paull, Robert E.; Nishijima, Wayne; Reyes Marcelino and Cavaletto, Catherine. 1997. Postharvest handling and losses during marketing of papaya (*Carica papaya* L.). *Postharvest Biology and Technology*. 11(3):165-179.
- Plascencia-Jatomea, Maribel; Viniegra, Gustavo; Olayo, Roberto; Castillo-Ortega, María Mónica and Shirai, Keiko. 2003. Effect of chitosan and temperature on spore germination of *Aspergillus niger*. *Macromolecular Bioscience*. 3(10):582-586.

- Prusky, Dov; Fuchs, Yoram; Kobiler, Ilana; Roth, Ilana; Weksler, Asya; Shalom, Yavin; Fallik, Elazar; Zauberman, Giora *et al.* 1999. Effect of hot water brushing, Prochloraz treatment and waxing on the incidence of black spot decay caused by *Alternaria alternata* in mango fruits. *Postharvest Biology and Technology*. 15(2):165-174.
- Sanders, Gina M.; Korsten, L. and Wehner, F.C. 2000. Survey of fungicide sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa. *European Journal of Plant Pathology*. 106(8):745-752.
- SIAP. 2011. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Cierre de la producción agrícola por cultivo. Anuario Estadístico de la Producción Agrícola. Producción Agrícola. Ciclo: Cíclicos y Perennes. Modalidad: Riego + Temporal. Papaya. http://www.siap.gob.mx/index.php?option=com_wrapper&view=wrapper&Itemid=289
- Sivakumar, D.; Wilson-Wijeratnam, R.S.; Wijesunderab, R.L.C. and Abeyesekerea, M. 2002. Control of postharvest diseases of rambutan using cinnamaldehyde. *Crop Protection*. 21(9):847-852.
- Spadaro, Davide and Gullino, Maria Lodovica. 2004. State of the art and future prospects of the biological control of postharvest fruit diseases. *International Journal of Food Microbiology*. 91(2):185-194.
- Stevens, C.; Khan, V.A.; Lu, J.Y.; Wilson, C.L.; Pusey, P.L.; Igwegbe, E.C.K.; Kabwe, K.; Mafolo, Y. *et al.* 1997. Integration of ultraviolet (UV-C) light with yeast treatment for control of postharvest storage rots of fruits and vegetables. *Biological Control*. 10(2):98-103.
- Sutton, B.C. 1980. The Coelomycetes: Fungi imperfecti with picnidia, acervuli and stromata. Kew, United Kingdom: Commonwealth Mycological Institute.
- Tavares, Giltembergue Macedo e de Souza, Paulo Estevão. 2005. Efeito de fungicidas no controle *in vitro* de *Colletotrichum gloeosporioides*, agente etiológico da antracnose do mamoeiro (*Carica papaya* L.). *Ciência e Agrotecnologia*. 20(1):52-59.
- Tripathi, Pramila and Dubey, N. K. 2004. Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology*. 32(3):235-245.
- Tzortzakis, Nikos G. 2009. Impact of cinnamon oil-enrichment on microbial spoilage of fresh produce. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 10(1):97-102.
- Vásquez-López, Alfonso; Hernández-Castro, Elías; Mora-Aguilera, J. Antonio; Nava-Díaz, Cristian y Sánchez-García, Francisco. 2012. Etiología y epidemiología de la necrosis de flores y frutos juveniles del papayo (*Carica papaya* L.) en Guerrero, México. *Agrociencia*. 46(8):757-767.
- Wagner, H. and Bladt, S. 1996. *Plant drug analysis*. (2nd. ed.). Berlin - Heidelberg - New York: Springer Verlag.
- Wang, Jingfa; Li, Jian; Cao, Jiankang and Jiang, Weibo. 2010. Antifungal activities of neem (*Azadirachta indica*) seed kernel extracts on postharvest diseases in fruits. *African Journal of Microbiology Research*. 4(11):1100-1104.
- Wang, Rui; Wang, Ruijiang and Yang, Bao. 2009. Extraction of essential oils from five cinnamon leaves and identification of their volatile compound compositions. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*. 10(2):289-292.
- Zoffoli, Juan Pablo; Latorre, Bernardo A. and Naranjo, Paulina. 2008. Hairline, a postharvest cracking disorder in table grapes induced by sulfur dioxide. *Agrociencia*. 47(1):90-97.