

**Universidad Autónoma de Occidente**

**Unidad Regional Los Mochis**

**Departamento Académico de Investigación y Posgrado**

**Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente**



**Tesis**

Evaluación de Extractos Acuáticos de Malezas para el Manejo de Antracnosis Causada por *Colletotrichum gloeosporioides* en Postcosecha de Cítricos

**Presenta:**

Xavier Eduardo Verdugo Contreras

Para la obtención del grado de:

Maestro en Fitopatología y Medio Ambiente

**Directores**

Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero

Dr. Juan Carlos Martínez Álvarez

Los Mochis, Sinaloa. Septiembre de 2021



**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE**  
VICERRECTORÍA ACADÉMICA  
DIRECCIÓN DE INVESTIGACIÓN Y POSGRADO

Asunto: **carta conclusión de tesis para opción de grado.**  
Los Mochis Sinaloa, 15 de septiembre 2021

**Dra. Karla Mariela Sandoval Cota**

Jefa del Departamento de Investigación y Posgrado  
Unidad Regional Los Mochis

**Presente.-**

Habiendo constatado que las observaciones realizadas por el comité revisor han sido atendidas en la obra, el suscrito en la calidad de director de tesis, doy por concluido el trabajo siguiente:

Nombre del maestrante: **Xavier Eduardo Verdugo Contreras** Matrícula: **19021109**

Nombre de Tesis: **EVALUACIÓN DE EXTRACTOS ACUOSOS DE MALEZAS PARA EL MANEJO DE ANTRACNOSIS CAUSADA POR *Colletotrichum gloeosporioides* EN POSTCOSECHA DE CÍTRICOS**

Nombre del Programa Educativo: **Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente.**

A t e n t a m e n t e.

**Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero**  
Directora de Tesis



El presente trabajo de investigación titulado “**Evaluación de Extractos Acuoso de Malezas para el Manejo de Antracnosis Causada por *Colletotrichum gloeosporioides* en Postcosecha de Cítricos**” realizado por el **Biol. Xavier Eduardo Verdugo Contreras** con matrícula **19021109**, dirigido por los integrantes del Comité de Tesis abajo indicados, ha sido aprobado por el mismo y aceptado como requisito parcial, para la obtención del grado de Maestro en Ciencias.

#### COMITÉ DE TESIS:

Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero  
Directora de tesis

Dr. Juan Carlos Martínez Álvarez  
Director de tesis

MC. Cecilia de Los Ángeles Romero  
Urías  
Asesora

Dr. Jesús Damián Cordero  
Ramírez  
Asesor

Los Mochis, Sinaloa, Septiembre de 2021



**UAdeO**  
UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE OCCIDENTE**

*CARTA DE CESIÓN DE DERECHOS*

En la Ciudad de Los Mochis, Sinaloa, el día 15 del mes Septiembre del año 2021, quien suscribe Xavier Eduardo Verdugo Contreras alumno del Programa Educativo de Maestría en Fitopatología y Medio Ambiente (Registro CONACyT No. CVU 1014813) con número de matrícula 19021109, de la Unidad Regional Los Mochis manifiesta que es autor intelectual del presente trabajo de Tesis bajo la dirección de Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero y Dr. Juan Carlos Martínez Álvarez y cede los derechos del trabajo titulado “Evaluación de extractos acuosos de malezas para el manejo de antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides* en postcosecha de cítricos”, a la Universidad Autónoma de Occidente para su difusión, con fines académicos y de investigación por medios impresos y digitales.

La Ley Federal del Derecho de Autor (LFDA) de los Estados Unidos Mexicanos (México) protege el contenido de la presente tesis. Los usuarios de la información contenida en ella deberán citar obligatoriamente la tesis como fuente, dónde la obtuvo y mencionar al autor intelectual. Cualquier uso distinto como el lucro, reproducción, edición o modificación, será perseguido y sancionado por el respectivo titular de los Derechos de Autor.

---

Xavier Eduardo Verdugo Contreras

## **AGRADECIMIENTOS**

En este apartado hago acto de reconocimiento para todas aquellas personas que estuvieron conmigo en el trayecto de este logro, el cual es un escalón importante en mi vida profesional y es una gran satisfacción el poder concluirlo.

Aprovecho para dar las gracias a Dios, quien me ha mantenido firme en mis decisiones y con salud para alcanzar cada una de mis aspiraciones, agradezco a mi familia; mis padres, hermano e hija, por estar conmigo en toda circunstancia. También ofrezco un agradecimiento muy especial a la Dra. Guadalupe Arlene Mora Romero directora de este trabajo de tesis, pero mucho más que eso, por haber intervenido en mi formación como profesionista desde la licenciatura y hoy en la culminación de mi maestría, sin olvidarme del resto de mi comité tutorial que también fueron pieza importante en mi formación, le doy las gracias a mi codirector de tesis el Dr. Juan Carlos Martínez Álvarez, agradezco a mis asesores la Maestra en Ciencias Cecilia De Los Ángeles y el Dr. Jesús Damián.

Quiero dar las gracias a mis compañeros de la maestría María Belén, Luis Alberto y especialmente al Ing. Marañón y Marrufo que me permitieron formar una amistad e hicieron un mejor momento y experiencia durante este camino, esperando continúe muchos años más. Quiero agradecer a un gran amigo, compañero y buen consejero, Juan Luis Pérez Mora, me apoyó bastante en este trabajo, agradezco de igual manera a la Dra. Karla Yeriana Leyva, sus asesorías en filogenia y algunas charlas fueron de gran ayuda para mi crecimiento personal y profesional, también agradecer a un compañero y gran amigo Manuel Chávez quien me apoyó en una ocasión con la captura de datos de mis ensayos, a Octavio Martínez otro gran amigo y compañero de laboratorio, agradezco de igual manera al CONACYT por la beca que se me otorgó como alumno de posgrado.

Por último doy las gracias al resto de personas que directa e indirectamente hicieron de esta experiencia la mejor de muchas más que están por venir, con esto concluyo este apartado, expresando mi gratitud en la culminación de esta grandiosa etapa.

## ÍNDICE

ÍNDICE DE CUADROS.....	I
ÍNDICE DE FIGURAS.....	II
RESUMEN.....	IV
ABSTRACT.....	V
I. INTRODUCCIÓN.....	1
II. JUSTIFICACIÓN.....	3
III. ANTECEDENTES.....	4
3.1 Biocontrol de <i>C. gloeosporioides</i> mediante de extractos vegetales .....	4
3.2 Mecanismos de control antifúngico de extractos vegetales.....	4
IV. REVISIÓN DE LITERATURA.....	6
4.1. Generalidades de los cítricos.....	6
4.1.1. Importancia de la producción mundial.....	6
4.2. Toronja ( <i>Citrus x paradisi</i> ).....	6
4.2.1. Clasificación taxonómica de la toronja ( <i>C. x paradisi</i> ).....	6
4.2.2. Características botánicas de la toronja ( <i>C. x paradisi</i> ).....	7
4.2.3. Variedades de toronja ( <i>C. x paradisi</i> ).....	7
4.3. Limón ( <i>Citrus x limon</i> ).....	8
4.3.1. Clasificación taxonómica del limón.....	8
4.3.2. Características botánicas de limón ( <i>C. x limon</i> ).....	8
4.3.3 Variedades de limón ( <i>C. x limon</i> ) en México.....	9
4.4. Naranja ( <i>Citrus x sinensis</i> ).....	9
4.4.1. Clasificación taxonómica de la naranja.....	10
4.4.2. Características botánicas de la naranja ( <i>C. x sinensis</i> ).....	10
4.4.3. Variedades comerciales de naranja ( <i>C. x sinensis</i> ) en México....	10
4.5 Principales enfermedades de origen biótico en cítricos.....	11
4.5.1 Enfermedades causadas por bacterias.....	11
4.5.2. Enfermedades causadas por virus.....	11
4.5.3. Enfermedades causadas por nematodos.....	12
4.5.4. Enfermedades causadas por Oomycetes.....	12
4.5.5 Enfermedades causadas por hongos.....	12
4.6. Generalidades de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> .....	13

4.6.1. Taxonomía de <i>C. gloeosporioides</i> .....	13
4.6.2. Caracterización morfológica.....	13
4.6.3. Caracterización molecular.....	14
4.6.4 Ciclo de vida de <i>C. gloeosporioides</i> .....	14
4.6.5. Agente causal de la antracnosis.....	16
4.7 Manejo de la enfermedad de antracnosis.....	17
4.7.1 Métodos de control.....	17
4.7.2 Métodos de control cultural.....	17
4.7.3 Métodos de control físico.....	17
4.7.4 Métodos de control químico.....	17
4.7.5 Métodos de control biológico.....	18
4.7.5.1 Aplicación de agentes de control biológico.....	18
4.7.5.2 Aplicación de extractos vegetales.....	19
4.8 Malezas con potencial antifúngico.....	19
4.8.1 Uso de extractos de malezas con propiedades antifúngicas.....	19
4.8.2 Compuestos bioactivos antimicrobianos provenientes de extractos vegetales.....	20
4.9 Malezas en la región norte del estado de Sinaloa.....	21
4.9.1 Estafiate ( <i>Ambrosia confertiflora</i> DC.).....	21
4.9.1.2 Distribución.....	21
4.9.1.2 Características botánicas.....	22
4.9.1.3 Información taxonómica.....	22
4.9.2 Cardo santo ( <i>Argemone mexicana</i> L.).....	22
4.9.2.1 Distribución.....	22
4.9.2.2 Características botánicas.....	23
4.9.2.3 Información taxonómica.....	23
4.9.3 Girasol ( <i>Helianthus annuus</i> L.).....	23
4.9.3.1 Distribución.....	23
4.9.3.2 Características botánicas.....	24
4.9.3.3 Información taxonómica.....	24
4.9.4 Higuierilla ( <i>Ricinus communis</i> L.).....	24
4.9.4.1 Distribución.....	24
4.9.4.2 Características botánicas.....	25
4.9.4.3 Información taxonómica.....	25
4.9.5 Toloache ( <i>Datura discolor</i> Bernh.).....	25

4.9.5.1 Distribución.....	25
4.9.5.2 Características botánicas.....	26
4.9.5.3 Información taxonómica.....	26
4.9.6 Bledo ( <i>Amaranthus palmeri</i> ).....	26
4.9.6.1 Distribución.....	26
4.9.6.2 Características Botánicas.....	27
4.9.6.3 Información taxonómica.....	27
<b>V. HIPÓTESIS.....</b>	<b>28</b>
<b>VI. OBJETIVOS.....</b>	<b>29</b>
VI.1 OBJETIVO GENERAL.....	30
VI.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
<b>VII. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>30</b>
7.1 Recolecta de especies de malezas.....	30
7.2 Identificación molecular de especies de malezas.....	30
7.2.1 Extracción de DNA de tejido de malezas.....	30
7.2.2 Amplificación por PCR punto final.....	30
7.2.3 Análisis filogenético.....	31
7.3 Obtención de extractos acuosos de malezas.....	31
7.4 Evaluación <i>in vitro</i> de extractos acuosos de malezas contra <i>C. gloeosporioides</i> .....	32
7.5 Evaluación <i>in vivo</i> de extractos acuosos de malezas contra <i>C. gloeosporioides</i> .....	32
7.5.1 Preservación de aislado fúngico y conteo de conidios.....	32
7.5.2 Prueba de patogenicidad del aislado de <i>C. gloeosporioides</i> en distintos hospedantes.....	32
7.6 Cuantificación de <i>C. gloeosporioides</i> por medio de la técnica q-PCR..	33
7.6.1 Extracción de ADN de tejido de cítricos infectado con <i>C. gloeosporioides</i> .....	33
7.6.2 Amplificación por q-PCR.....	33
7.7 Pruebas <i>in vitro</i> de viabilidad de extracto acuoso.....	34
7.8 Análisis estadístico.....	35
<b>VIII. RESULTADOS.....</b>	<b>36</b>
8.1 Recolecta de especímenes.....	36
8.2 Identificación molecular de las especies de malezas.....	37



8.3 Evaluación <i>in vitro</i> de extractos acuosos de malezas contra <i>C. gloeosporioides</i> .....	45
8.4. Evaluación de extracto acuoso de la maleza <i>D. discolor</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> en cítricos.....	46
8.4.1 Pruebas de patogenicidad del aislado de <i>C. gloeosporioides</i> .....	46
8.4.2 Evaluación de extracto acuoso de la maleza <i>D. discolor</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> en toronja.....	47
8.4.3 Evaluación de extracto acuoso de la maleza <i>D. discolor</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> de naranja valencia.....	49
8.4.4 Evaluación de extracto acuoso de la maleza <i>D. discolor</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> en limón persa.....	51
8.4.5 Cuantificación de <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de limón persa tratados con extracto de <i>D. discolor</i> al 4%.....	53
8.5 Pruebas <i>in vitro</i> de viabilidad de extracto acuoso de <i>Datura discolor</i>	54
<b>IX. DISCUSIÓN</b> .....	54
9.1 Identificación molecular de especies de malezas.....	54
9.2 Efecto antifúngico <i>in vitro</i> de extractos de malezas contra <i>C. gloeosporioides</i> .....	55
9.3 Efecto antifúngico del extracto acuoso de <i>D. discolor</i> para el manejo de antracnosis causada por <i>C. gloeosporioides</i> en postcosecha de cítricos...56	
9.3.1 Patogenicidad del aislado de <i>C. gloeosporioides</i> .....	56
9.3.2 Efecto <i>in vivo</i> antifúngico del extracto acuoso de <i>D. discolor</i> .....	57
9.4 Pruebas de viabilidad de extractos acuosos de <i>D. discolor</i> .....	58
<b>X.CONCLUSIÓN</b> .....	59
<b>XI. BIBLIOGRAFÍA</b> .....	60

## ÍNDICE DE CUADROS

<b>Cuadro 1.</b> Modo de acción de fitoquímicos.....	22
<b>Cuadro 2.</b> Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación por q-PCR.....	36
<b>Cuadro 3.</b> Datos de muestreo de malezas.....	38
<b>Cuadro 4.</b> Comparación de las secuencias de malezas con secuencias depositadas en el GenBank.....	39
<b>Cuadro 5.</b> Efecto de extractos acuosos de <i>D. discolor</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de toronja.....	48
<b>Cuadro 6.</b> Efecto de extractos acuosos de <i>D. discolor</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de toronja.....	49
<b>Cuadro 7.</b> Efecto de extractos acuosos de <i>D. discolor</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de naranja valencia.....	50
<b>Cuadro 8.</b> Efecto de extractos acuosos de <i>D. discolor</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de naranja valencia.....	51
<b>Cuadro 9.</b> Efecto de extractos acuosos de <i>D. discolor</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de limón persa.....	52
<b>Cuadro 10.</b> Efecto de extracto acuoso de <i>D. discolor</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> en frutos de limón persa.....	53
<b>Cuadro 11.</b> Porcentaje de inhibición micelial de <i>C. gloeosporioides</i> con el extracto acuoso de <i>D. discolor</i> al 4%, en un periodo de 3 meses.....	56

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Toronja ( <i>Citrus x paradisi</i> Macf.) variedad Red Blush.....	9
<b>Figura 2.</b> Limón Persa ( <i>Citrus x latifolia</i> L.).....	10
<b>Figura 3.</b> Naranja Valencia ( <i>Citrus x sinensis</i> ).....	12
<b>Figura 4.</b> Etapas de infección de <i>C. gloeosporioides</i> .....	15
<b>Figura 5.</b> Antracnosis asociada a <i>C. gloeosporioides</i> en fruto de toronja ( <i>C. x paradisi</i> ).....	16
<b>Figura 6.</b> Especies catalogadas como malezas.....	37
<b>Figura 7.</b> Árbol filogenético del espaciador interno transcrito (ITS), inferido por Máxima Verosimilitud en MEGA X.....	39
<b>Figura 8.</b> Árbol filogenético del espaciador interno transcrito (ITS), inferido por Máxima Verosimilitud en MEGA X.....	40
<b>Figura 9.</b> Árbol filogenético del espaciador interno transcrito (ITS), inferido por Máxima Verosimilitud en MEGA X.....	41
<b>Figura 10.</b> Árbol filogenético del espaciador interno transcrito (ITS), inferido por Máxima Verosimilitud en MEGA X.....	42
<b>Figura 11.</b> Árbol filogenético del espaciador interno transcrito (ITS), inferido por Máxima Verosimilitud en MEGA X.....	43
<b>Figura 12.</b> Árbol filogenético del espaciador interno transcrito (ITS), inferido por Máxima Verosimilitud en MEGA X.....	44
<b>Figura 13.</b> Efecto de los extractos acuosos de <i>D. discolor</i> en crecimiento <i>in vitro</i> de <i>C. gloeosporioides</i> .....	45
<b>Figura 14.</b> Antracnosis en cítricos causada por <i>C. gloeosporioides</i> .....	46
<b>Figura 15.</b> Efecto de la segunda aplicación (a los 15 días post inoculación) de extractos acuoso de <i>D. discolor</i> en frutos de toronja.....	48
<b>Figura 16.</b> Efecto de la segunda aplicación (a los 15 días post inoculación) de extractos acuosos de <i>D. discolor</i> en frutos de naranja valencia.....	50

**Figura 17.** Efecto de la segunda aplicación (a los 15 días post inoculación) de extractos acuosos de *D. discolor* en frutos de limón persa.....52

**Figura 18.** Detección específica de *C. gloeosporioides*, por q-PCR con los oligos ColTqF3, ColTqR1 y ColTqP1.....53

## RESUMEN

La antracnosis de los cítricos causada por *Colletotrichum gloeosporioides*, es una enfermedad de importancia económica en la producción mundial, está se presenta en precosecha y postcosecha. Para su control se recurre comúnmente a la aplicación de fungicidas químicos, pero debido a su uso continuo, se ha favorecido la resistencia de este hongo, a su vez esto afecta la eficacia en su control. El objetivo del presente trabajo fue evaluar la efectividad de extractos acuosos de malezas para el manejo de dicha enfermedad. Se recolectó estafiate (*Ambrosia confertiflora*), cardo santo (*Argemone mexicana*), girasol (*Helianthus annuus*), higuera (*Ricinus communis*), toloache (*Datura discolor*) y bleo (*Amaranthus palmeri*) en la zona norte del estado de Sinaloa y se identificó molecularmente cada especie en base a la región de ADN ribosomal. Posteriormente se obtuvieron los extractos acuosos de cada una y se evaluaron en las dosis 1, 2 y 4%, en bioensayos *in vitro*, en medio PDA, e *in vivo* en frutos de toronja, naranja valencia y limón persa, se realizaron dos aplicaciones con una frecuencia de 7 días. En las pruebas *in vitro* se observó que el extracto de toloache (*D. discolor*) ejerció una inhibición a partir del 50% en las dosis evaluadas, la concentración al 4% no mostró diferencia significativa con el producto químico carberdazim®. Por otro lado, en los ensayos *in vivo* sólo se evaluó el extracto acuoso de *D. discolor* al 4%, el cual tuvo efecto en la reducción de la antracnosis en frutos de limón persa en la segunda aplicación. Estos resultados indican que el extracto acuoso de *D. discolor* puede ser efectivo en el manejo de esta enfermedad en frutos de limón persa, esto abre camino para futuras investigaciones enfocadas al diseño de estrategias alternativas para el control del patógeno.

**Palabras clave:** Antracnosis, malezas, control biológico, *C. gloeosporioides*

## ABSTRACT

Citrus anthracnose caused by *Colletotrichum gloeosporioides*, is economically important in world production, it occurs in pre-harvest and post-harvest. For its control, the application of chemical fungicides is exclusively used, but due to its continuous use, the resistance of this fungus has been favored, in turn this affects the effectiveness of its control. The objective to this work was to evaluate the effectiveness of aqueous extracts of weeds for the management of this disease. weakleaf bur ragweed (*Ambrosia confertiflora*), Mexican pricklypoppy (*Argemone mexicana*), sunflower (*Helianthus annuus*), castor (*Ricinus communis*), desert thorn-apple (*Datura discolor*) and palmer pigweed (*Amaranthus palmeri*) were collected in the northern area of the Sinaloa State and molecularly identified based on ribosomal DNA region. Subsequently, the aqueous extracts of each one were obtained and evaluated at doses 1, 2 and 4%, in *in vitro* assays, in PDA medium, and *in vivo* in grapefruit, Valencia orange and Persian lemon fruits, two applications were carry out with a frequency of 7 days. In the *in vitro* assay, the extract of desert thorn-apple (*D. discolor*) exerted an inhibition from 50% in the evaluated doses, the concentration at 4% did not show a significant difference with the chemical product carberdazim®. On the other hand, in the *in vivo* tests, only the 4% aqueous extract of *D. discolor* was evaluated, which had an effect on reducing anthracnose in Persian lemon fruits in the second application. These results indicate that the aqueous extract of *D. discolor* can be effective in the management of this disease in Persian lemon fruits, this opens the way for future research focused on the design of alternative strategies for the control of the pathogen.

**Key words:** Anthracnose, weeds, biological control, *C. gloeosporioides*

## I. INTRODUCCIÓN

Los principales países productores de cítricos son: Brasil, China, Unión Europea, EEUU y México, nuestro país ocupa el quinto lugar (FAS, 2020). En México se estimó una producción nacional de cítricos de 6, 615,344 t, entre los que destacan las especies: limón, toronja y naranja; el estado de Veracruz es el principal productor a nivel nacional, por sus condiciones climáticas tropicales y subtropicales; por otro lado, el estado de Sinaloa ocupa las posiciones 9, 8 y 14 en la producción de toronja, limón persa y naranja, respectivamente (SIAP, 2020).

La producción de cítricos a nivel mundial se ve afectada por diversas enfermedades de origen abiótico y biótico, estas últimas ocasionadas principalmente por *Colletotrichum* spp., con pérdidas económicas de hasta un 100% en frutos postcosecha (Prusky, 1996; Guarnaccia *et al.*, 2017). Especies de este género, son causantes de tres enfermedades importantes en cítricos en todo el mundo: la antracnosis, caída de fruta postfloración y antracnosis de lima (Lima *et al.*, 2011; McGovern *et al.*, 2012).

Cruz-Lagunas *et al.* (2020) reportaron síntomas de antracnosis en una plantación de toronja (*Citrus x paradisi*) en el estado de Guerrero, México, con una incidencia del 15% en frutos, asociado como agente causal *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc.; donde se describe la presencia de lesiones de pudrición blanda, de color marrón claro, variables en tamaño y forma. En el 2020 se dio a conocer el primer reporte en México de la presencia de *C. gloeosporioides* y *C. siamense* como agentes causales de antracnosis en *Citrus* spp. (Pérez-Mora *et al.*, 2020).

Para el control de este fitopatógeno, es común el uso de diversos productos químicos de acción fungicida, principalmente los inhibidores externos de quinonas (Qol), conocidos como “estrobilurinas” (Piccirillo *et al.*, 2018) y los benzimidazoles (MCB) (Peres *et al.*, 2004). Se ha revelado la resistencia de cepas de *Colletotrichum* spp. (Ma y Michailides, 2005; FRACC, 2021) debido al uso irracional de ambos grupos químicos; por lo que se infiere una reducción de su eficacia en el control.

El uso de extractos vegetales con propiedades antifúngicas es una alternativa, de control biológico, para el manejo de esta enfermedad. Se ha documentado ampliamente el efecto antifúngico de extractos etanólicos y acuosos; tal es el caso de los resultados obtenidos de la aplicación de extractos provenientes de hojas de la planta *Datura innoxia*, que inhibieron el crecimiento de *Sclerotinia sclerotiorum* y *Fusarium solani* (actualmente: *Neocosmospora solani*) (Sandoval-Denis *et al.*, 2019; Matías *et al.*, 2020). Así como el biocontrol *in vitro* e *in vivo* de extractos de plantas medicinales nativas de Egipto, para el manejo de antracnosis en frutos de mango (Zakaria *et al.*, 2020).

La elaboración de fungicidas a base de plantas ha ganado interés en los últimos años por sus atributos: bajo costo, eficacia y amigables con el ambiente (Mushatq *et al.*, 2012). Se han realizado diversos trabajos a nivel mundial sobre la actividad antifúngica de extractos obtenidos de malezas contra hongos fitopatógenos (Qasem y Abu-Blan, 1995,1996; Thembo *et al.*, 2010; Karim *et al.*, 2017). Las especies de plantas clasificadas como malezas son un grupo muy amplio con una gran distribución, lo cual representa un potencial para su aprovechamiento en la extracción de compuestos con actividad antifúngica (Qasem y Abu-Blan, 1995; Mushatq *et al.*, 2012).

El presente estudio tiene como objetivo evaluar el efecto *in vitro* e *in vivo* de extractos acuosos de especies consideradas malezas, presentes en los cultivos agrícolas de la región norte del estado de Sinaloa, para el manejo de la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en postcosecha de cítricos y con ello sentar bases para contribuir en el control biológico de un problema fitosanitario, que hoy en día es resuelto por medio de la aplicación de fungicidas químicos, los cuales ocasionan efectos adversos en el ambiente y la salud humana. Este trabajo favorece el desarrollo sustentable y aprovechamiento de los recursos naturales de la región, al ofrecer alternativas que puedan ser incorporadas en el manejo agroecológico, para reducir el uso de fungicidas químicos en el combate de enfermedades en la producción agrícola.



## II. JUSTIFICACIÓN

Por la alta producción de cítricos en el país y la presencia de enfermedades emergentes que demeritan el valor en el mercado, en la presente investigación se propone la adaptación de métodos de control biológico, como parte de una alternativa estratégica para el manejo de antracnosis en cítricos causada por *C. gloeosporioides*.

Los antecedentes de investigaciones sobre el control biológico con la aplicación de extractos vegetales de malezas en otros países, nos indican su efectividad en el control de hongos fitopatógenos. Sin embargo, en nuestro país se carece del registro de trabajos previos, por lo cual el objetivo de este estudio, es proporcionar bases para el desarrollo de conocimiento y establecer estrategias para su aprovechamiento, sentar bases para futuras investigaciones enfocadas al manejo de enfermedades en diversos cultivos. De igual manera, contribuir al desarrollo sustentable de los recursos naturales de la región, mediante el empleo de métodos de biocontrol.

### III. ANTECEDENTES

#### 3.1 Biocontrol de *C. gloeosporioides* mediante extractos vegetales

El uso de extractos vegetales es una alternativa de control biológico; han sido ampliamente estudiados por su actividad antifúngica, asociada al contenido de diversos compuestos activos derivados del metabolismo secundario de la planta (Das *et al.*, 2010). La aplicación de extractos de *Ruta chalapensis*, *Eucalyptus globulus*, *Datura stramonium* y *Adhatoda schimperiana* han sido efectivos contra el desarrollo de la antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en frutos de mango (Alemu *et al.*, 2014).

*Echinops* sp. reduce de manera significativa la severidad de *C. gloeosporioides* en frutos de papaya, mientras que los extractos de *Lantana camara*, *L. viburnoides*, *Echinops* sp., y *R. chalepensis* inhiben al 80% en germinación de conidios del patógeno *in vitro* (Ademe *et al.*, 2013).

Recientemente un estudio realizado en Egipto reportó que la aplicación de extractos, etanólicos y acuosos, de *P. sinaica* evita el crecimiento de *C. gloeosporioides*, *in vitro* y en frutos de mango. Se observó por HPLC que los extractos presentaron gran cantidad de compuestos fenólicos, principalmente ácido elágico; por lo que los autores sugieren que dichos compuestos pueden ser los responsables de la inhibición del crecimiento y de los cambios ultraestructurales observados en las hifas de *C. gloeosporioides* por microscopía electrónica (Zakaria *et al.*, 2020).

Los hallazgos mencionados anteriormente sugieren que los extractos vegetales pueden ser una alternativa para el control de antracnosis causada por *C. gloeosporioides*.

#### 3.2 Mecanismos de control antifúngico de extractos vegetales

Existen una gran variedad de compuestos químicos producidos por plantas superiores con propiedades antimicrobianas, tales como alcaloides, flavonoides, terpenos, ácidos orgánicos, aceites esenciales y saponinas, a los cuales se les atribuye participación importante en los mecanismos de control

frente a hongos fitopatógenos (Field *et al.*, 2006; da Cruz Cabral *et al.*, 2013; Matušinský *et al.*, 2015).

La escina, una saponina proveniente de planta, mostró en la interacción del patosistema *Brassica napus*, *Leptosphaeria maculans*, un mecanismo dual de control, que involucra la actividad antifúngica y la inducción de defensa en la planta (Trdá *et al.*, 2019). Los mecanismos subyacentes de la actividad de saponinas, están basados en la capacidad de formar complejos con esteroides en las membranas de microorganismos y en consecuencia ocasionan la perturbación de la misma (Morrissey y Osbourn, 1999; Augustin *et al.*, 2011; Sreij *et al.*, 2019). La actividad antifúngica de estos compuestos se conoce desde hace décadas (Wolters, 1966; Gruiz, 1996).

La aliospirosida, una saponina extraída de *Allium cepa*, confirió protección a plantas de fresa contra *C. gloeosporioides*. Esta saponina tiene potencial para el control de la antracnosis en dicho cultivo (Teshima *et al.*, 2013).

Karim *et al.* (2017) sugieren que los ácidos grasos saturados, como el ácido octadecadienoico y el ácido n-hexadecanoico, provenientes de extractos acuosos de *Datura metel*, pueden ser responsables de la actividad antifúngica contra *C. gloeosporioides*.

Un trabajo reciente dio a conocer la actividad antifúngica del extracto de *P. sinaica* contra *C. gloeosporioides*, que exhibió una alta cantidad de ácido elágico, asociado como responsable de cambios ultraestructurales en las células del patógeno, principalmente daño en las membranas, en la envoltura nuclear y la presencia de grandes vacuolas (Zakaria *et al.*, 2020).

De acuerdo con lo anterior, el presente trabajo evaluó el efecto antifúngico de extractos acuosos, obtenidos de especies catalogadas como malezas en la región norte del estado de Sinaloa, México, con la finalidad de ser propuestas como alternativa viable en el manejo de antracnosis en cítricos, ocasionada por *C. gloeosporioides*. Esto abre camino a nuevas investigaciones en la región con un enfoque sustentable para el aprovechamiento de los recursos naturales.

## IV. REVISIÓN DE LITERATURA

### 4.1. Generalidades de los cítricos

#### 4.1.1. Importancia de la producción mundial

Los cítricos son considerados la fruta de mayor importancia en el comercio internacional por su valor económico (Maya-Ambia, 2017). La FAO reveló en el 2013 que México ocupó el quinto lugar de producción mundial de cítricos, con un 5.6%, seguido de China (24%), Brasil (14.5%), Estados Unidos (7.49%) y la India (7.46%). Actualmente México se mantiene en el quinto lugar, entre los principales países productores (FAS, 2020).

Se estimó en el año 2019, una producción de naranjas de 2.53 millones de toneladas (t), para consumo en fresco y 90 mil t para jugo. La producción de toronjas se estimó en 350 mil t, mientras que la producción de limón y limas fue de 2.19 millones de t (FAS, 2019).

Los cítricos constituyen un producto agrícola básico en México, por ser esencial en la dieta de la población; en el país se destinan un poco más de medio millón de hectáreas al cultivo, ubicadas en 23 entidades federativas. El 91% de la producción total en el país se concentra en 10 estados: Tamaulipas, Veracruz, Tabasco, Yucatán, Nuevo León, Puebla, Sonora, Colima, Michoacán y Oaxaca (Maya-Ambia, 2017). Por otro lado, en el estado de Sinaloa se destinan 1529 ha al cultivo de limón persa con un rendimiento de 18 t ha<sup>-1</sup>, 1649 ha para naranja valencia con un rendimiento aproximado de 11 t ha<sup>-1</sup> y en la producción de toronja 95 ha con un rendimiento de 16 t ha<sup>-1</sup> (SIAP, 2020).

### 4.2. Toronja (*Citrus x paradisi*)

La toronja, también llamada pomelo o pamplemusa, es un híbrido cuyo origen se desconoce (Rosa-Hernandez *et al.*, 2016), se cree que proviene de un cruce natural entre la pampelmusa (*C. maxima*) y la naranja dulce (*C. sinensis*) en Barbados, alrededor del siglo XVII (Cruz-Fernández, 2007).

#### 4.2.1. Clasificación taxonómica de la toronja (*C. x paradisi*).

Basado en GBIF (2020);

**Reino:** Plantae; **División:** Tracheophyta; **Clase:** Magnoliopsida; **Orden:** Sapindales; **Familia:** Rutaceae; **Género:** *Citrus*; **Especie:** *Citrus x paradisi* Macfad

#### **4.2.2. Características botánicas de la toronja (*C. x paradisi*)**

Cruz-Fernández (2007), describe a *C. x paradisi*:

**Árbol:** perennifolio el cual puede llegar a medir de 5 a 8 m de altura, con copa redondeada, follaje poco denso y fuste ancho; las ramas jóvenes se caracterizan por tener espinas cortas y flexibles en las axilas foliares; las hojas son simples, alternas, ovaladas y dentadas, de 7 y 15 cm de largo, tienen una superficie coriácea y de color verde oscura por el haz, sujeta con peciolo cortos y alados.

**Flor:** hermafroditas, fragantes, tetrámeras, blancas o purpúreas, pueden estar en racimos pequeños o solitarias.

**Fruto:** hesperidio globoso de aproximadamente 15 cm de diámetro; el epicarpio es grueso liso o rugoso, carnoso, color variable (verde, amarillo, naranja o rosáceo). El endocarpio posee tonalidades blancas, amarillas o rojas, puede contener de 11 a 14 carpelos, firmes, jugosos, dulces o ácidos (según la variedad) divididos por membranas de característico sabor amargo.

#### **4.2.3. Variedades de toronja (*C. x paradisi*) en México**

En México se cultiva una gran variedad de toronjas, de las que destacan entre sus principales características la tonalidad de su pulpa y el uso de su producto final. Entre las principales variedades de toronja en México están Red Blush, RB-Nucelar, Shambar, Marsh, Río Red, Henserson; la de mayor rendimiento es la variedad Red Blush también conocida como Ruby, Ruby Red, Red Marsh y Red Seedless, originada por mutación espontánea de la variedad Thompson, en Texas en 1931 (Cruz-Fernández, 2007).

El fruto de la variedad Red Blush tiene un diámetro de 95 a 100 mm (**Figura 1**), posee un espesor de cáscara de 7 mm, con tres semillas por fruto, color de pulpa rosado (Santinoni *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Toronja variedad Red Blush.

### **4.3. Limón (*Citrus x limon*)**

La clasificación botánica de las especies del género *Citrus* es muy difícil debido a la frecuente formación de híbridos e introducción de numerosos cultivares mediante polinización cruzada. Las variedades más antiguas, híbridos y cultivares, necesitan a menudo técnicas para identificar a *C. limon*. Como muchas otras especies de cítricos prolíficos, da surgimiento a numerosas variedades, cultivares e híbridos (Citrus page, 2020).

#### **4.3.1. Clasificación taxonómica del limón**

Basado en GBIF (2020);

**Reino:** Plantae; **División:** Tracheophyta; **Clase:** Magnoliopsida; **Orden:** Sapindales; **Familia:** Rutaceae; **Género:** *Citrus*; **Especie:** *Citrus x limon* (L.)

#### **4.3.2. Características botánicas de limón (*C. x limon*)**

Mabberley (2004), describe al limón *Citrus x limon* (L.):

**Árbol:** altura de 2.5 a 3 m; hojas perennes lanceoladas.

**Flor:** bisexuales, blancas con un tinte violeta en los bordes de los pétalos, reunidas en pequeños racimos o individualmente, crecen en las axilas de las hojas.

**Fruto:** alargado, ovalado, puntiagudo en forma de baya verde que se vuelve amarilla durante la maduración. La baya se rellena en el interior con una jugosa pulpa dividida en segmentos. El pericarpio está formado por un exocarpio delgado cubierto de cera, que es la parte exterior del mesocarpio. La parte interna del mesocarpio, también conocida como albedo, está formada por una

esponja (tejido de parénquima blanco). El endocarpio, o "pulpa de la fruta", se divide en segmentos por el tejido blanco del mesocarpio.

#### 4.3.3 Variedades de limón (*C. x limon*) en México

Los híbridos son producidos para obtener frutos con valiosas propiedades organolépticas e industriales, incluidos frutos sin semillas, alta jugosidad y el gusto requerido (Citrus page, 2020). A nivel nacional se producen tres especies de limón en México; mexicano, italiano y persa (SIAP, 2017).

En el caso del limón persa o también conocido como lima ácida Tahití, algunas variedades utilizadas en distintos países son; Bearss, Idemor y Pond (University of California Riverside, 2018). El limón persa (*C. latifolia*), es un híbrido entre lima mexicana (*C. aurantifolia* Sw.) y la cidra (*C. medica* L.) (Cortes, 1990). El fruto es de color verde oscuro, esférico-oblongo de cascara delgada, algunos con rugosidad (**Figura 2**), la pulpa es de color amarillo verdoso, muy jugosa y ácida (Jackson, 1991).



**Figura 2.** Limón Persa (*Citrus latifolia* L.)

#### 4.4. Naranja (*Citrus x sinensis*)

La naranja valencia o naranja dulce (*C. sinensis*), surgió de una hibridación entre retrocruzas de dos híbridos iniciales e independientes de pummelo-mandarino (Ibáñez *et al.*, 2015).

#### 4.4.1. Clasificación taxonómica de la naranja

Basado en GBIF (2020);

**Reino:** Plantae; **División:** Tracheophyta; **Clase:** Magnoliopsida; **Orden:** Sapindales; **Familia:** Rutaceae; **Género:** *Citrus*; **Especie:** *Citrus x sinensis*

#### 4.4.2. Características botánicas de la naranja (*C. x sinensis*)

Según lo descrito por Proloran, 1977; Webber, *et al.*, 2004; Reig Valor *et al.* 2020.

**Árbol:** es grande y prolífico, vigoroso de porte erecto, tiene follaje verde oscuro, coriáceo, oblongo a elíptico, brillante.

**Flor:** tiene racimos de flores blancas que florecen en primavera.

**Fruto:** está formado por un ovario simple de 8-10 carpelos soldados (segmentos) rodeados por una corteza resistente. Su forma es esférica, de tamaño mediano (5 a 12 cm. de diámetro), de piel colorada en la madurez. La pulpa está formada por vesículas, que contienen el zumo, unidas por un filamento vascular a las paredes dorsales de los segmentos.

#### 4.4.3. Variedades comerciales de naranja (*C. x sinensis*) en México

México produce principalmente variedades para el consumo en fresco en el mercado nacional y, en menor cantidad, para la industria. Las variedades más comunes son Navel y Valencia, la producción de esta última es la que predomina en el país (Gómez-Cruz, 1997).

Es importante que el fruto tenga las características como buen sabor, alto porcentaje de jugo, escasa cantidad de semilla, buen aspecto, coloración firme, facilidad para despegar la cáscara, maduración extra temprana o muy tardía, permanencia en el árbol sin desmerecer calidad, adaptación para consumo en fresco e industrializado (Bonfiglioli, 1990). En la (**Figura 3**) se observa el fruto de la variedad de naranja valencia.





**Figura 3.** Naranja Valencia (*Citrus sinensis*)

## **4.5 Principales enfermedades de origen biótico en cítrico**

### **4.5.1 Enfermedades causadas por bacterias**

Entre las principales enfermedades de origen biótico en cítricos, se describen algunas como el cancro asiático de los cítricos. Leduc *et al.* (2011), documentan el primer reporte en Senegal de la aparición de esta enfermedad ocasionada por la bacteria *Xanthomonas citri* pv. *citri* en toronja, la cual se manifiesta en diversos órganos de la planta ramas, tallos, tronco, fruto, en este último se observan lesiones corchosas, errumpentes, con bordes húmedos y márgenes cloróticos, lo que perjudica la calidad (SENASICA, 2019).

La enfermedad conocida como Huanglongbing o dragón amarillo, asociada a la bacteria "*Candidatus Liberibacter asiaticus*" (CLAs), transmitida por el psílido asiático de los cítricos, es de gran importancia económica en la producción de cítricos (Oliver *et al.*, 2020), esta bacteria actúa en la interrupción del transporte del floema lo que provoca frutos prematuros, caída, menor calidad de la fruta y la mortalidad del árbol (Oliver *et al.*, 2020).

### **4.5.2. Enfermedades causadas por virus**

Entre las enfermedades causadas por virus en cítricos se encuentra el *Citrus yellow vein clearing virus* (CYVCV), conocido como virus del aclaramiento de la vena amarilla de los cítricos, el cual puede afectar la calidad y rendimiento de distintas especies de cítricos (Liu *et al.*, 2020). Los cultivares de toronja son

extremadamente sensibles al *Citrus tristeza virus* (CTV) (Read y Pietersen, 2015), por lo que se le considera como una de las enfermedades provocada por virus de mayor importancia económica en los cítricos (Bar-Joseph *et al.*, 1989).

#### **4.5.3. Enfermedades causadas por nematodos**

Una de las especies de nematodos fitoparásitos obligados en cítricos es *Tylenchulus semipenetrans*, conocido como el nematodo de los cítricos (Pretorius y Le Roux, 2017).

#### **4.5.4. Enfermedades causadas por Oomycetes**

La enfermedad de gomosis de los cítricos ocasionada por *Phytophthora* spp. aparece generalmente en la base del tronco, cerca del área de injerto (Pérez *et al.*, 2019), el patógeno anilla el tallo y afecta la corteza de la raíz hasta descomponer las raíces fibrosas (Yan *et al.*, 2017), provoca clorosis, defoliación, menor crecimiento vegetativo y de fruto (Srivastava y Shirgure, 2018).

#### **4.5.5 Enfermedades causadas por hongos**

Las principales enfermedades en cítricos causadas por hongos se asocian a *Mycosphaerella citri* y *Lasioidiploida theobromae* (Zhao *et al.*, 2015; García-Martín *et al.*, 2018).

La mancha grasienta de los cítricos causada por *M. citri*, presenta como síntomas característicos, lesiones ligeramente elevadas con diferentes tonalidades en el envés de hojas maduras (Sáenz-Pérez *et al.*, 2019), en las primeras etapas de infección, el color inicia amarillo, posteriormente marrón en un avance intermedio y al final presenta necrosis o clorosis con márgenes aceitosos (Silva *et al.*, 2015).

La enfermedad podredumbre de cuello causada por *L. theobromae* tiene como síntomas característicos la pudrición de tallo, el ablandamiento de corteza en la periferia del botón, esto le ayuda a dispersarse en otros órganos vegetales, la superficie infectada toma una coloración marrón (Zhao *et al.*, 2016). El fruto se necrosa debajo de la cutícula y se momifica, en etapas más avanzadas el patógeno provoca la senescencia y la muerte descendente (Picos-Muñoz *et al.*, 2015).

El hongo *Diaporthe citri* causa pudrición en tallo y melanosis de frutos, gomosis en hojas jóvenes y brotes (Udayanga *et al.*, 2014), tiene un amplio rango de hospedantes (Timmer *et al.*, 2000).

Otra enfermedad importante en cítricos es la antracnosis asociada a *C. gloeosporioides* (Cruz-Laguna *et al.*, 2020), objeto de la presente investigación.

#### **4.6. Generalidades de *Colletotrichum gloeosporioides***

##### **4.6.1. Taxonomía de *C. gloeosporioides***

El género *Colletotrichum* spp. se considera como uno de los grupos de hongos fitopatógenos más importante en postcosecha (Dean *et al.*, 2012). Una de las especies más importantes que infecta frutales es *C. gloeosporioides* (Penzing) Penzing & Saccardo (Adaskaveg y Hartin 1997; Bernstein *et al.*, 1995; Cannon *et al.*, 2012; Dean *et al.*, 2012).

La especie de *C. gloeosporioides* fue descrita por primera vez en Pieńsk al suroeste de Polonia en el año 1882, apoyado en *Vermicularia gloeosporioides*, cuyo ejemplar tipo se aisló de cítricos en Italia (Orozco *et al.*, 2004; Damm *et al.*, 2012). En la actualidad el hongo *C. gloeosporioides* se agrupa en la siguiente clasificación taxonómica (Martín-Félix *et al.*, 2017).

**Reino:** Fungi; **Phylum:** Ascomycota; **Subphylum:** Pezizomycotina; **Clase:** Sordariomycetes; **Subclase:** Hypocreomycetidae; **Orden:** Glomerellales; **Familia:** Glomerellaceae; **Género:** *Colletotrichum*; **Especie:** *Colletotrichum gloeosporioides*.

##### **4.6.2. Caracterización morfológica**

Los estudios morfológicos para identificar distintas especies de *Colletotrichum* generalmente se basan en el uso de caracteres fenotípicos microscópicos y macroscópicos. Los caracteres microscópicos son la forma y tamaño conidial y apresorial, presencia o ausencia de setas y esclerocios (Behnia *et al.*, 2016). Los macroscópicos son la tasa de crecimiento, patrón de crecimiento, tipo de micelio y color de colonia, en medio de cultivo PDA (Villanueva *et al.*, 2005). *Colletotrichum gloeosporioides* posee un crecimiento *in vitro* lento, coloración gris y una masa micelial color naranja (Rodríguez *et al.*, 2009).

Existe una amplia variedad de características morfológicas que vuelve más complicado su estudio. La diferenciación morfológica entre especies es limitada, existe rara presencia de estado sexual, posee un alta variación de patogenicidad y morfología cultural (Cannott *et al.*, 2012; Johnson, 2018). Debido a su amplia diversidad fenotípica, para la separación de especies del complejo *C. gloeosporioides*, se utilizan estudios de genotipo (Weir *et al.*, 2012; Rampersad *et al.*, 2013; Behnia *et al.*, 2016).

#### **4.6.3. Caracterización molecular**

Para la diferenciación de especies dentro del complejo *C. gloeosporioides* se utilizan diversos marcadores moleculares. Weir *et al.* (2012) utilizaron *gs*, *cal* y *sod2*, también se han estudiado diferentes conjuntos de *loci* en complejos de especies y las diferenciación de especies dependen tanto *locus* como especie, no hay acuerdo entre los micólogos en el *locus* o *loci* para utilizar en la identificación (Martin-Félix *et al.*, 2017), tal es el caso de las especies en el complejo *C. gloeosporioides*, que pueden identificarse con una combinación de secuencias *ApMat* y *gs* (Liu *et al.* 2015).

#### **4.6.4 Ciclo de vida de *C. gloeosporioides***

El hongo *C. gloeosporioides*, conocido en su estado anamorfo imperfecto, ocurre en gran variedad de hospedantes en los que produce acérvulos dentro del tejido (Gautam, 2014). Anteriormente se le denominaba, en su estado sexual o teleomorfo (perfecto) *Glomerella cingulata* (Gautam, 2014). Es un fitopatógeno latente que se puede encontrar como endófito, epífito o saprófito (Lima *et al.*, 2011; McGovern *et al.*, 2012).

La epidemia de *C. gloeosporioides* se ve favorecida por altas temperaturas (28- 32 °C), humedad relativa entre 80% a 95%, y precipitación anual por encima de 1000 mm, con frecuentes e intensas lluvias, alta nubosidad y humedad constante que incrementa los periodos del punto de rocío en los diferentes órganos vegetales. La enfermedad se intensifica cuando el cultivo se establece en altas densidades y alta humedad del suelo (Páez, 1995; Freeman *et al.*, 1996; Talhinhos *et al.*, 2005).

Este hongo prefiere un ambiente cálido y húmedo para propagarse de manera uniforme y efectiva, invade principalmente tejidos dañados o debilitados,

produce varias estructuras especializadas durante el proceso de infección, estas pueden ser conidios, acérvulos, setas y apresorios, los cuales tienen origen durante la interacción del hospedante y el patógeno (Gautam, 2014).

En el tejido de la planta se forma un número de acérvulos y conidios, los cuales pueden extenderse por períodos relativamente cortos, también a grandes distancias por medio de salpicaduras de lluvia o riego, donde la infección se puede dar en diversos tejidos. La infección generalmente depende de la formación de apresorios, los cuales le permiten al hongo adherirse a la cutícula del hospedante (Gautam, 2014). En la **Figura 4** se observa el inicio de la etapa de infección hasta la diseminación de la misma.



**Figura 4.** Etapas de infección de *C. gloeosporioides*. A) Adhesión y Germinación, B) Penetración, C) Colonización y D) Reproducción. Tomada de Rojo-Báez *et al.*, 2017.

Se ha demostrado que el desenverdeamiento en el fruto claramente incrementa la incidencia de antracnosis, porque el etileno estimula la germinación de conidios, la formación y germinación de apresorios (Brown, 1992).

Los acérvulos son cuerpos asexuales producidos durante el proceso de infección en el tejido del hospedante, esta estructura posee forma de matraz con un pequeño cojín en la parte inferior, en la cual se forman conidióforos cortos y abarrotados que pueden observarse en la superficie de plantas, las setas son generalmente de color marrón largo y emergen de los acérvulos (Cannon *et al.*, 2012).

Todo el proceso de infección, incluida la formación de conidios, acérvulos, setas y apresorios, resulta en necrosis tisular (Gautam, 2014). La madera muerta y los restos vegetales se consideran fuentes primarias potenciales de inóculo (Gautam, 2014). Es importante conocer el ciclo de vida del patógeno para el diseño de estrategias de manejo de la enfermedad, y evitar su diseminación.

#### 4.6.5. Agente causal de la antracnosis

La antracnosis es una enfermedad de origen fúngico que ocasiona la muerte celular, provoca necrosis en frutos, además afecta otros tejidos como tallos, hojas y flores (Caires *et al.*, 2014; Silva *et al.*, 2017).

Actualmente la enfermedad de antracnosis en cítricos se asocia al género *Colletotrichum* spp. (Damm *et al.* 2012; Weir *et al.* 2012). Se ha reportado la presencia de antracnosis en toronja asociado a *C. gloeosporioides* (Cruz-Laguna *et al.*, 2020), donde se describen algunos síntomas característicos en frutos, como lesiones de color marrón claro de distintos tamaños cubriendo el 50% de la superficie, al avance de la enfermedad se observan lesiones con hifas aéreas grises (**Figura 5**).



**Figura 5.** Antracnosis asociada a *C. gloeosporioides* en fruto de toronja (*C. paradisi*). Imagen tomada de Cruz-Laguna *et al.*, 2020.

La antracnosis se presenta en dos fases: la fase biotrófica, donde el patógeno se alimenta de células vivas del hospedante, y la fase necrotrófica tardía, en la que se alimenta de células muertas producidas en la primera fase, sin causar la muerte del tejido vegetal (Bailey *et al.*, 1992).

En la fase biotrófica, el patógeno restringe la función de enzimas de la planta que degradan las paredes celulares del mismo, esto impide que el hospedante reconozca a su huésped (Centis *et al.*, 1997), lo que limita la respuesta de defensa. En la fase necrotrófica se manifiestan los síntomas de antracnosis (Centis *et al.*, 1997; Perfect *et al.*, 1999).

## **4.7 Manejo de la enfermedad de antracnosis**

### **4.7.1 Métodos de control**

A través de los años se ha intentado una gran variedad de métodos de manejo integrado para combatir *Colletotrichum* spp., agente causal de antracnosis, pero el control químico sigue siendo el principal método para tratar esta enfermedad (Dowling *et al.*, 2020).

### **4.7.2 Métodos de control cultural**

Varias prácticas culturales son empleadas para el manejo de la enfermedad causada por *Colletotrichum* spp., las cuales buscan ajustar las condiciones para disminuir la producción de inóculo y diseminación (Dowling *et al.*, 2020). Cabe señalar que la reducción de la enfermedad en etapa de postcosecha estará en función de la aplicación de estas prácticas de manejo.

Los métodos de control cultural implican la generación y uso de material de plantación sano, riego limitado por salpicaduras de lluvia y por aspersion, ajuste de nutrientes del suelo, manejo de las malezas y uso de cultivares con susceptibilidad limitada a la enfermedad (Maas, 1998; Coelho *et al.*, 2008; Freeman, 2008; Walter *et al.*, 2008). Para la mayoría de cultivos frutales se recomienda eliminar frutos enfermos, momificados y tejido vegetativo sintomático mediante podas (Feil *et al.*, 2003; Sutton *et al.*, 2014; Wilcox *et al.*, 2015; Stensvand *et al.*, 2017).

### **4.7.3 Métodos de control físico**

Los métodos de control físico involucran tratamientos de modificación del ambiente favorable para el patógeno, como cambios de temperatura y presión atmosférica; tal es el caso del efecto del tratamiento térmico de agua caliente en fruto postcosecha (Xueping *et al.*, 2013) y el uso de contenedores de atmósferas modificadas (Karabulut y Baykal, 2004). Se ha evaluado también, el efecto de reducción *in vitro* de la supervivencia de conidios de *C. gloeosporioides*, con la aplicación de un tratamiento fotodinámico antimicrobiano como una alternativa convencional de fungicida (Menezas *et al.*, 2014).

### **4.7.4 Métodos de control químico**

En los métodos de control químico son comúnmente empleados los fungicidas de protección multisitio, mancozed, thiram, ziram, captan y

clorotalonil, que históricamente han proporcionado una eficacia de moderada a buena contra las enfermedades en plantas, que incluyen a las ocasionadas por *Colletotrichum* spp. (Dowling *et al.*, 2020), pero se ha restringido el uso de algunos fungicidas químicos debido a estrictas regulaciones de exportación (Dowling *et al.*, 2020). Actualmente solo se permiten los grupos químicos, de acción monositio, metil benzamidazol carbomato (MBC; FRAC 1), inhibidores de desmetilación (DMI; FRAC 3), inhibidores de succinato deshidrogenasa (SDHI; FRAC 11), fenilpirrol (PP; FRAC 12), polioxinas (FRAC 19) y fluazinam (FRAC 9), recomendados en las guías de aspersion de Estado Unidos (Dowling *et al.*, 2020).

También el uso continuo de fungicidas inhibidores externos de quinonas (Qol) conocidos como “estrobilurinas”, que actúan en la interferencia de la respiración mitocondrial y se aplican comúnmente para el control de *Colletotrichum* spp. (Piccirillo *et al.*, 2018), ha ocasionado resistencia, atribuida a mutaciones en el gen del citocromo b (CYTB), que previene la unión del fungicida (Ma y Michailides, 2005). Debido a este fenómeno, se debe considerar el uso de métodos alternativos que reduzcan la frecuencia de aplicaciones de fungicidas químicos.

#### **4.7.5 Métodos de control biológico**

##### **4.7.5.1 Aplicación de agentes de control biológico**

Los métodos de control biológico involucran el uso de organismos vivos y derivados de ellos, que ejercen mecanismos de competencia por espacio o nutrientes, antagonismo, antibiosis, inhibición sobre el patógeno, tal es el caso de evaluación de cepas de *Trichoderma* aisladas de la rizosfera de árboles de cítricos para el control de *C. gloeosporioides* (Ferreira *et al.*, 2020). Se ha demostrado que el uso de la levadura *Pichinia membranaefaciens* inhibe el crecimiento de *C. gloeosporioides* *in vitro* e *in vivo* (Zhou *et al.*, 2016). Numerosos microorganismos han sido probados contra *C. gloeosporioides* incluyendo cepas avirulentas de *Colletotrichum* spp., y también el uso de algunas bacterias como *Bacillus subtilis* y *Streptomyces lydicus* (Conway *et al.*, 2004; Freeman *et al.*, 2004; Kim y Hwang, 2007; Chalfoun *et al.*, 2011; Salazar *et al.*, 2013).



#### **4.7.5.2 Aplicación de extractos vegetales**

Las plantas son fuentes valiosas de moléculas biológicamente activas, que poseen propiedades antifúngicas, las cuales deben ser sometidas a pruebas *in vivo* para evaluar la eficacia en el control de enfermedades en diversos cultivos de interés agrícola (Gurjar *et al.*, 2012).

Las plantas tienen una capacidad ilimitada para sintetizar metabolitos secundarios, de los cuales la mayoría pertenecen al grupo de los fenoles o sus derivados sustituidos con oxígeno. Se clasifican subclases importantes en este grupo, que incluyen: fenoles, ácidos fenólicos, quinonas, flavonas, flavonoides, flavonoles, taninos y cumarinas, estos compuestos exhiben un efecto antimicrobiano y funcionan como parte esencial del mecanismo de defensa de las plantas contra fitopatógenos (Gurjar *et al.*, 2012).

### **4.8 Malezas con potencial antifúngico**

#### **4.8.1 Uso de extractos de malezas con propiedades antifúngicas**

Diversos trabajos han reportado la actividad antifúngica de extractos obtenidos de malezas contra hongos fitopatógenos (Qasem y Abu-Blan, 1995,1996; Thembo *et al.*, 2010; Matías *et al.*, 2020). Se ha documentado el potencial efecto antifúngico de las especies de malezas de *Anagallis arvensis*, *Chenopodium murale*, *Inula viscosa*, *Solanum nigrum*, *Ranunculus asiaticus* contra los hongos fitopatógenos *Penicillium digitatum*, *Sclerotinia sclerotiorum*, *Verticillium dahliae* (Qasem y Abu-Blan, 1995). El efecto antifúngico es variable entre los distintos extractos de malezas, esta diferencia se puede dar por el tamaño de la planta, constituyentes químicos, hábitat y etapa fenológica del espécimen (Qasem y Abu-Blan, 1995).

Se ha documentado que existe una estable y efectiva inhibición frente a distintos aislados del hongo *Fusarium* spp. con extractos obtenidos de las especies de malezas *Vigna unguiculata* y *Amaranthus spinosus* (Thembo *et al.*, 2012). También se ha reportado una actividad del 50% de inhibición de crecimiento de *Alternaria alternata* con el uso del extracto acuoso obtenido de *Lantara camara* (Mushatq *et al.*, 2012). Así como la actividad antifúngica de extractos de *D. metel* frente al hongo *C. gloeosporioides* (Karim *et al.*, 2017).

Hernández-Soto *et al.* (2020) reportaron que el extracto acuoso de *Argemone mexicana* a 2000 ppm, inhiben al 27% el crecimiento *in vitro* de *S. sclerotiorum*. De igual manera el estudio de Bayaso *et al.*, 2013 reporta que el extracto acuoso al 100% de *Ricinus communis*, ejerce un control del 59% de inhibición *in vitro* de *A. solani*.

Rosas-Burgos *et al.* (2009), reportaron que el extracto metanólico al 70% de *Ambrosia confertiflora* exhibe un 40.1% de inhibición *in vitro* de *Aspergillus parasiticus*. El extracto acuoso a 1600 y 2000  $\mu\text{g } 100 \text{ mL}^{-1}$  de *D. innoxia* ejerció un 94% de inhibición *in vitro* contra *S. sclerotiorum* (Matias *et al.*, 2020).

Estos estudios revelan el potencial efecto antifúngico que poseen algunas especies de arvenses o comúnmente conocidas como malezas, este podría ser aprovechado para contribuir al diseño de productos biorracionales con acción fungicida.

#### **4.8.2 Compuestos bioactivos antimicrobianos provenientes de extractos vegetales**

Los fenoles simples y el ácido fenólico son fitoquímicos bioactivos que consisten en un solo anillo fenólico sustituido, la toxicidad fenólica para los microorganismos se debe a los sitios y el número de grupo hidroxilo presentes en el compuesto fenólico.

Las quinonas son compuestos muy reactivos con dos sustituciones de cetonas en los anillos aromáticos, mientras que las flavonas, flavonoides y flavonoles son de estructura fenólica con un grupo carbonilo, sintetizados por plantas en respuesta a infección por fitopatógenos y resultan en la inhibición *in vitro* con amplio espectro (Gurjar *et al.*, 2012).

Los taninos son sustancias fenólicas poliméricas que poseen propiedad astringente, los cuales son solubles en agua, alcohol y acetona (Gurjar *et al.*, 2012). Las cumarinas son sustancias fenólicas compuestas por anillos de benceno y  $\alpha$ -pirona fusionados. Distintas partes especializadas de las plantas, como raíces, tallos, hojas, flores, frutos y semillas, son ampliamente utilizadas en la preparación de compuestos para el control de distintos fitopatógenos (Gurjar *et al.*, 2012).

El **Cuadro 1** muestra los grupos de compuestos fitoquímicos con el respectivo mecanismo de acción antimicrobiano.

**Cuadro 1.** Modo de acción de fitoquímicos, tomado de Gurjar *et al.*, 2012.

<b>Clase</b>	<b>Mecanismo</b>
Fenólicos simples	Disrupción de membrana
Ácidos fénolicos	Inactivación enzimática
Terpenoides	Disrupción de membrana
Alcaloides	Se intercala en la pared celular
Flavonoides	Unión a adhesinas
Cumarinas	Interacción con DNA eucariótico
Lectinas y polipéptidos	Formación de puentes disulfuro

#### **4.9 Malezas en la región norte del estado de Sinaloa**

De acuerdo a lo descrito por Baker (1974), las plantas catalogadas como malezas, son especies que crecen en hábitats alterados. Se cree que estas plantas poseen una alta capacidad de dispersión en el tiempo-espacio y una amplia plasticidad fenotípica (Baker 1974; Espinosa-García and Sarukhán 1997; Radosevich y Holt 1984). Estas características pueden ser una ventaja adaptativa para su invasión en diferentes regiones, en el caso de la región norte del estado de Sinaloa se identifican algunas especies como malezas, estas mismas presentes en áreas de cultivo agrícola.

##### **4.9.1 Estafiate (*Ambrosia confertiflora* DC.)**

###### **4.9.1.2 Distribución**

Esta especie es considerada nativa en México y se ha registrado su distribución en Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila., Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Estado

de México, Nuevo León, Querétaro, San Luís Potosí, Sonora, Tamaulipas, Zacatecas y Sinaloa (Villaseñor y Espinosa, 1998).

#### **4.9.1.2 Características botánicas**

Basada en Correll y Johnston (1970); Cronquist *et al.* (1994); Nash y Williams (1976); Payne (1964); Rzedowski y Rzedowski (2001); Villaseñor (1989).

**Hábito y forma de vida:** Planta monoica, herbácea perenne, erecta, generalmente crece en colonias.

**Tamaño:** Hasta de 2 m de alto, aunque por lo común mucho más baja.

**Tallo:** Por lo general ramificado, con pelos rectos, agudos, erectos o recostados.

**Hojas:** Alternas, pecíolos hasta de 15 cm de largo, lámina lanceolada a ovada en contorno general, hasta de 16 cm de largo, base prolongada hacia el pecíolo, 1 a 4 veces dividida (pinnatipartida), los segmentos lineares a oblongos, agudos a atenuados en el ápice, con pelos rectos, agudos y recostados, abundantes o escasos en ambas caras.

**Frutos y semillas:** El fruto es un aquenio, con una sola semilla, está completamente encerrado en el involucre, éste de 2 a 4 (raramente 5) mm de diámetro, glanduloso-pubescente, la base alargada y en el ápice un pico solitario, en la superficie (raramente 0) 6 a 20 espinas ganchudas de 1 a 2 mm de largo.

#### **4.9.1.3 Información taxonómica**

Basado en CONABIO (2021);

**Reino:** *Plantae*; **Subreino:** *Tracheobionta* (plantas vasculares); **Superdivisión:** *Spermatophyta* (plantas con semillas); **División:** *Magnoliophyta* (plantas con flor); **Clase:** *Magnoliopsida* (dicotiledóneas); **Subclase:** *Asteridae*; **Orden:** *Asterales*; **Familia:** *Asteraceae*; **Género:** *Ambrosia*; **Especie:** *Ambrosia confertiflora*.

#### **4.9.2 Cardo santo (*Argemone mexicana* L.)**

##### **4.9.2.1 Distribución**

Es una especie nativa de México y se ha registrado en Aguascalientes, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, Querétaro, Quintana

Roo, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán (Villaseñor y Espinosa, 1998).

#### **4.9.2.2 Características botánicas**

De acuerdo a lo descrito por Vibrans (2009);

**Hábito y forma de vida:** Hierba anual robusta

**Tamaño:** mide de 80 cm a 1 m de altura;

**Tallo:** es verde-azulado, glabro, glauco, espinoso.

**Hojas:** verde-azuladas, sésiles, glaucas con líneas azul brillante sobre las venas principales, abrazadoras que miden hasta 20 cm de longitud, pinnatipartidas con las divisiones dentado espinosas.

**Flor:** flores grandes solitarias de 4 a 7 cm de diámetro, rodeadas de algunas hojas reducidas y sésiles; pétalos de color amarillo brillante o algunas veces amarillo pálido.

**Frutos y semillas:** fruto capsular, oblongo ampliamente elíptico de 24 a 45 mm de largo por 12 a 20 mm de ancho. El fruto es una cápsula con espinas y sus semillas son redondas y negras.

#### **4.9.2.3 Información taxonómica**

De acuerdo Vibrans (2009);

**Reino:** *Plantae*, **Phylum:** *Magnoliophyta*, **Clase:** *Magnoliopsida*, **Orden:** *Papverales*, **Familia:** *Papaveraceae*, **Género:** *Argemone*, **Especie:** *Argemone mexicana* (L.), 1753.

#### **4.9.3 Girasol (*Helianthus annuus* L.)**

##### **4.9.3.1 Distribución**

El girasol es una especie nativa en México y está registrada en casi todos los estados de la república. Se registra en Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Campeche, Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Durango, Guanajuato, Guerrero, Jalisco, Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Nuevo León, Oaxaca, Puebla, San Luís Potosí, Sonora, Tamaulipas, Veracruz, Yucatán, Zacatecas y Sinaloa (Villaseñor y Espinosa, 1998).

#### 4.9.3.2 Características botánicas

Basada en Rzedowski y Rzedowski (2001).

**Hábito y forma de vida:** Planta anual.

**Tamaño:** De hasta 3 m de alto.

**Tallo:** Erecto simple o ramificado, por lo general toscamente áspero.

**Hojas:** En su mayoría alternas, con pecíolos de hasta 20 cm de largo, lámina ovada a triangular-ovada o anchamente lanceolada, hasta 45 cm de largo y 35 cm de ancho, obtusa a acuminada en el ápice, toscamente aserrada a subentera en el margen, cuneado a acorazonada en la base, por lo común escábrida (áspera) hispida en ambas caras, trinervada.

**Flores:** Cabezuelas solitarias o agrupadas por varias en el extremo de los tallos; involucro hemisférico, de más de 2 cm de diámetro, sus brácteas  $\pm 25$  (o más en las formas cultivadas) ovadas o anchamente lanceoladas, acuminadas en el ápice, casi siempre hispidas o hirsutas; receptáculo plano, páleas lanceoladas, profundamente 3-cuspidadas; flores liguladas 8 o más, sus láminas oblongas u oblanceoladas, amarillas a anaranjadas, hasta 5 cm de largo; flores del disco en general más de 200, sus corolas a menudo oscuras en la parte apical,  $\pm 7$  mm de largo.

**Frutos y semillas:** Aquenios oblongo ovoides, algo comprimidos, 3.5 a 5.5 (16) mm de largo, grisáceo, a menudo moteado; vilano de dos escamas lanceoladas, caducas.

#### 4.9.3.3 Información taxonómica

Basado en CONABIO (2021);

**Reino:** *Plantae*; **Subreino:** *Tracheobionta* (plantas vasculares); **Superdivisión:** *Spermatophyta* (plantas con semillas); **División:** *Magnoliophyta* (plantas con flor); **Clase:** *Magnoliopsida* (dicotiledóneas); **Subclase:** *Asteridae*; **Orden:** *Asterales*; **Familia:** *Asteraceae*; **Género:** *Helianthus*; **Especie:** *Helianthus annuus*.

#### 4.9.4 Higuera (*Ricinus communis* L.)

##### 4.9.4.1 Distribución

Es una especie exótica en México, y se registra en los estados de Chiapas, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Guanajuato, Guerrero, Jalisco,

Estado de México, Michoacán, Morelos, Nayarit, Oaxaca, Sinaloa, Sonora, Tabasco, Tamaulipas, Tlaxcala, Veracruz, Yucatán (Villaseñor y Espinosa, 1998).

#### **4.9.4.2 Características botánicas**

Basado en Rzedowski y Rzedowski (2001).

**Hábito y forma de vida:** Planta herbácea alta, a veces arbustiva, de color verde claro a azul-grisáceo, en ocasiones rojiza.

**Tamaño:** Hasta de 6 m de alto.

**Tallo:** Engrosado, ramificado.

**Hojas:** Lámina casi orbicular, de 10 a 60 cm de diámetro, profundamente palmatilobada, las divisiones ovado-oblongas a lanceoladas, agudas o acuminadas, borde irregularmente dentado-glanduloso; pecíolo tan largo o más largo que la lámina: glándulas entre la lámina y el pecíolo.

**Flores:** las masculinas con un perianto de 6 a 12 mm de largo, las flores femeninas de 4 a 8 mm de largo, ovario densamente cubierto por largos tubérculos blandos, que parecen pelos gruesos.

**Frutos y semillas:** El fruto es una cápsula subglobosa, de 1.5 a 2.5 cm de largo, con espinas cortas y gruesas (equinado); semillas elipsoides, algo aplanadas, de 10 a 17 mm de largo, lisas, brillantes, frecuentemente jaspeadas de café y gris, conspicuamente carunculadas.

#### **4.9.4.3 Información taxonómica**

Basado en CONABIO (2021).

**Reino:** *Plantae*; **Subreino:** *Tracheobionta* (plantas vasculares); **Superdivisión:** *Spermatophyta* (plantas con semillas); **División:** *Magnoliophyta* (plantas con flor); **Clase:** *Magnoliopsida* (dicotiledóneas); **Subclase:** *Rosidae*; **Orden:** *Euphorbiales*; **Familia:** *Euphorbiaceae*; **Género:** *Ricinus*; **Especie:** *Ricinus communis*.

#### **4.9.5 Toloache (*Datura discolor* Bernh.)**

##### **4.9.5.1 Distribución**

Symon y Haegi (1991) consideran que todas las especies de *Datura* son nativas de América, México es un importante centro de diversidad del género.

Por otra parte, se reporta la distribución de la especie *D. discolor* a lo largo de la costa del pacífico desde Baja California hasta Oaxaca (Luna-Cavazos y Bye, 2011).

#### **4.9.5.2 Características botánicas**

De acuerdo con Matuda, 1952;

**Hábitos y forma de vida:** Hierba.

**Altura:** de 60-80 cm de altura, ramosa.

**Hojas:** son pecioladas; limbos ovales, inequiláteros, bruscamente agudos; base truncada o redondeada.

**Flor:** es erecta, con pedúnculo robusto; cáliz tubiforme, 5-lobado en el ápice; corola en forma de trompeta, blanca, manchada de color purpúreo pálido; ápice del limbo con 10-dientes; de 5-6 cm. de diámetro, tubo de 8-13 cm. de longitud.

**Fruto:** pedunculado, globoso, pequeño, inclinado a un lado, pericarpio espinoso, no muy tupido.

**Semilla:** semillas negras.

#### **4.9.5.3 Información taxonómica**

Basado en GBIF (2020);

**Reino:** *Plantae*; **División:** *Tracheophyta*; **Clase:** *Magnoliopsida*; **Orden:** *Solanales*; **Familia:** *Solanaceae*; **Género:** *Datura*; **Especie:** *Datura discolor*.

#### **4.9.6 Bledo (*Amaranthus palmeri* S. Watson)**

##### **4.9.6.1 Distribución**

Es considerada una especie nativa de México, y está reportada en los estados de Aguascalientes, Baja California Norte, Baja California Sur, Chihuahua, Coahuila, Colima, Distrito Federal, Durango, Estado de México, Guerrero, Jalisco, Michoacán, Morelos, Nuevo León, Oaxaca, Sinaloa, Sonora, Tamaulipas, Veracruz y Zacatecas (Rzedowski y Rzedowski, 2001; Villaseñor y Espinosa, 1998).



#### 4.9.6.2 Características botánicas

Basada en Rzedowski y Rzedowski (2001).

**Hábito y forma de vida:** Planta dioica, anual o a veces perenne, erecta, glabra (sin ningún tipo de pelos).

**Tamaño:** Hasta de 1.5 (3) m de alto.

**Tallo:** con rayas longitudinales, verde a amarillo, café o rojizo, con frecuencia profusamente ramificados desde la base.

**Hojas:** alternas, láminas foliares rómbicas, ovadas a rómbico-lanceoladas, de 1.5 a 10 (17) cm de largo por 1 a 4 (8) cm de ancho; ápice agudo a acuminado con una espina fina en la punta; base redondeada a cuneada; nervación prominente en el envés, a veces algo pubescente; pecíolos delgados, de 1 a 5 (10) cm de largo.

**Inflorescencia:** Unisexuales, en forma de espigas terminales densas, erectas o más o menos flexuosas (onduladas) o arqueadas, de 8 a 30 cm de largo y 0.7 a 1.5 cm de diámetro, así como en forma de glomérulos axilares, brácteas más largas que las flores, ovadas a lineares o angostamente triangulares, espinosas en la punta.

**Flores:** son poco vistosas; las masculinas con 5 tépalos angostamente triangulares, con punta rígida, desiguales, los externos de 2.5 a 4 (5) mm de largo, los internos de 2 a 3 (4) mm de largo; flores femeninas con 5 tépalos estrecha o ampliamente espatulados, carinado (con rebordes prominentes), terminan en punta aguda y rígida con una extensión del nervio medio, a veces teñidos con rojo, desiguales, los externos de 2.5 a 4 (5) mm de largo, los internos de 2 a 3 (4) mm de largo; estigmas 2 o en ocasiones 3.

**Frutos y semillas:** fruto subgloboso, rugoso, se abre transversalmente, de 1.5 mm de longitud; semilla lenticular (redonda y comprimida), algo alargada, de 1 a 1.4 mm de diámetro, de color café-rojizo oscuro, brillante.

#### 4.9.6.3 Información taxonómica

Basado en CONABIO (2021).

**Reino:** *Plantae*; **Subreino:** *Traqueobionta* (plantas vasculares); **Superdivisión:** *Spermatophyta* (plantas con semillas); **División:** *Magnoliophyta* (plantas con flor); **Clase:** *Magnoliopsida* (dicotiledóneas); **Subclase:** *Caryophyllidae*; **Orden:**

*Caryophyllales*; **Familia:** *Amaranthaceae*; **Género:** *Amaranthus*; **Especie:** *Amaranthus palmeri*.

## **V. HIPÓTESIS**

-Al menos un extracto acuoso de las malezas estafiate (*Ambrosia confertiflora*), cardo santo (*Argemone mexicana*), girasol (*Helianthus annuus*), higuera (*Ricinus communis*), toloache (*Datura discolor*) o bledo (*Amaranthus palmeri*) inhiben un 50% el crecimiento micelial del fitopatógeno *C. gloeosporioides* *in vitro* y en frutos de cítricos.

## **VI. OBJETIVOS**

### **VI.1 OBJETIVO GENERAL**

Evaluar los efectos de extractos acuosos de las malezas estafiate (*Ambrosia confertiflora*), cardo santo (*Argemone mexicana*), girasol (*Helianthus annuus*), higuerilla (*Ricinus communis*), toloache (*Datura discolor*) y bleado (*Amaranthus palmeri*), en la inhibición de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro* y en frutos de cítricos.

### **VI.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Evaluar el efecto de extractos acuosos de malezas en la inhibición micelial de *Colletotrichum gloeosporioides in vitro*.
2. Evaluar efecto de extracto acuoso de *Datura discolor* en la inhibición de *C. gloeosporioides* en frutos de cítricos.
3. Cuantificar inóculo de *Colletotrichum gloeosporioides*, en frutos de cítricos tratados con extractos, por la técnica q-PCR.
4. Evaluar la viabilidad *in vitro* del extracto acuoso de *D. discolor* en la inhibición de *C. gloeosporioides*.

## **VII. MATERIALES Y MÉTODOS**

### **7.1 Recolecta de especies de malezas**

Se recolectó material vegetal (principalmente hojas) de las malezas estafiate (E1), cardo santo (E2), girasol (E3), higuera (E4), toloache (E5) y bleo (E6) en el municipio de Ahome, Sinaloa. Se registró la etapa fenológica de cada especie y la temperatura del sitio, cada muestra se trasladó al Laboratorio de Biotecnología y Biología Molecular de la Universidad Autónoma de Occidente Unidad Los Mochis, para la posterior identificación molecular y elaboración de extractos.

### **7.2 Identificación molecular de especies de malezas**

#### **7.2.1 Extracción de DNA de tejido de malezas**

Se realizó la extracción de DNA genómico de cada una de las malezas, por el método de CTAB (Doyle, 1990). Se adicionó 500 µL de solución buffer CTAB (Tris 100 mM pH 8, 20 mM de EDTA pH 8, NaCl 1.4 M, 2% CTAB, 2-mercapto al 0.2%) a ~ 50 mg de tejido, se mezcló con vórtex por 10 s e incubó a 30 min a 65 °C. Posteriormente, se agregó 250 µL de cloroformo, se pasó nuevamente por vórtex durante 10 s y se centrifugó a 13,000 g durante 10 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se agregó 0.7 V de isopropanol, se mezcló por inversión, de cuatro a cinco veces, y se incubó a -20 °C durante 10 min. Para sedimentar el ADN, se centrifugó a 13,000 g durante 10 min, se decantó el sobrenadante. Para la limpieza, se agregó 500 µL de etanol al 70%, y centrifugó a 13,000 g por 5 min, se decantó de nuevo el sobrenadante. Para la evaporación de etanol, los tubos se colocaron sobre papel absorbente, finalmente el ADN se diluyó en 50 µL de agua libre de nucleasas.

#### **7.2.2 Amplificación por PCR punto final**

Se realizaron diluciones 1:10 de las extracciones de ADN, 1 µl de la dilución se empleó como templado para la amplificación de un fragmento de ~700 pb de ADN ribosomal por PCR, con los oligos ITS1 (TCCGTAGGTGAACCTGCGG)/ ITS4 (TCCTCCGCTTATTGATATGC) (White *et al.*, 1990). Se realizaron reacciones que contenían, 2.5 µl de Buffer 10x, 0.75 µl de MgCl<sub>2</sub> (50 mM), 1 µl de DNTPs (10 mM), 1 µl de cada uno de los oligos (10

$\mu\text{M}$ ), 0.5 U de la enzima *Taq* polimerasa (Invitrogen®), 1  $\mu\text{l}$  de ADN de muestra y agua ultrapura para un volumen final de 25  $\mu\text{l}$ . Se estableció un programa: 94 °C por 5 minutos, 35 ciclos (95 °C, 60 °C y 72 °C, durante 40 segundos) y 72 °C durante 5 minutos. La amplificación de los productos de PCR se visualizó por electroforesis (40 minutos a 80 volts) en gel de agarosa al 2%. Los productos amplificados se enviaron a purificación y secuenciación a Macrogen-Korea.

### 7.2.3 Análisis filogenético

La edición de secuencias de cada especie de maleza se realizó en el software BioEdit versión 7.0.5.3 (Hall, 1999), las secuencias editadas se compararon con secuencias depositadas en el GenBank utilizando el algoritmo BLASTn; 6 para estafiate (E1), 21 para cardo santo (E2) (Schwarzbach y Kadereit, 1999), 25 para girasol (E3) (Schilling *et al.*, 1998), 9 para higuera (E4) (Enan *et al.*, 2012), 14 para toloache (E5) (Dupin y Smith, 2018) y 27 para bleo (E6) (Waselkov *et al.*, 2018), como grupo externo *Parthenium hysterophorus*, *Arctomeconh umilis*, *Phoebanthus tenuifolius*, *Mercurialis annua*, *Brugmansia arborea* y *Chamissoa altissima*, respectivamente para cada una de las malezas mencionadas.

Las secuencias se alinearon en MUSCLE (Edgar, 2004), y el árbol filogenético se realizó en MEGAX (Kumar *et al.*, 2018), con el método estadístico de Máxima Verosimilitud, con el modelo de GTR+G+I, en E1, E2, y E5, GTR+G en E3, GTR+G en E4 y GTR en E6, todos los *gaps* se consideraron en el análisis y la robustez de la topología del árbol filogenético se evaluó con 1000 réplicas bootstrap. Finalmente, el filograma fue editado en el software FigTree versión 1.4.0.

### 7.3 Obtención de extractos acuosos de malezas

Para la obtención de extractos acuosos, se deshidrató el tejido foliar de cada muestra de maleza, en una cámara de secado, por aproximadamente 19 horas a 60°C. Posteriormente se molieron las hojas, se pesó 4 g y se disolvió en 40 ml de agua destilada estéril, para quedar a una concentración de 1:10 p/v. Posteriormente se calentaron a 120°C y se mantuvieron en ebullición por 10 minutos. Finalmente se centrifugaron a 4500 rpm durante 10 minutos y por último se recuperó el sobrenadante (Zakaria *et al.*, 2020, modificado).

#### **7.4 Evaluación *in vitro* de extractos acuosos de malezas contra *C. gloeosporioides***

Se proporcionó el aislado TMC-1 de *C. gloeosporioides* obtenido de toronja previamente caracterizado morfológica y molecularmente por Pérez-Mora *et al.*, 2020. Se preparó medio papa dextrosa agar (PDA), donde se diluyeron los extractos acuosos con las concentraciones (1%, 2% y 4%) en 50 ml, como control se utilizó medio PDA sin extractos vegetales. Se vertió en placas Petri de 60 mm de diámetro, después de solidificar el medio PDA se colocó, en el centro de las placas, un disco de PDA de 5 mm de diámetro con crecimiento micelial del hongo, se estableció un control químico con el fungicida comercial Carbendazim®. Se tomó registro del crecimiento polar y ecuatorial de la colonia cada 24 horas, con un vernier caliper (Stainless Hardened). El registro se detuvo hasta que el micelio cubrió la caja del control. Se evaluó el efecto inhibitorio por medio de la fórmula de porcentaje de inhibición de crecimiento (GIP) (Elwakil *et al.* 2009).

$$\text{GIP} = \frac{\text{Crecimiento del control} - \text{Crecimiento del tratamiento}}{\text{Crecimiento del control}} \times 100$$

#### **7.5 Evaluación *in vivo* de extractos acuosos de malezas contra *C. gloeosporioides***

##### **7.5.1 Preservación de aislado fúngico y conteo de conidios**

Se preservó el aislado TMC-1 de *C. gloeosporioides*, para ello se realizó una suspensión de conidios en agua destilada estéril y se almacenó a -20°C (López *et al.*, 2002). Posteriormente se sembró en medio PDA y a partir de un cultivo de diez días se obtuvo una suspensión conidial en agua destilada estéril y se realizó la cuantificación, para estimar la cantidad de conidios por ml, con un hemocitómetro.

##### **7.5.2 Prueba de patogenicidad del aislado de *C. gloeosporioides* en distintos hospedantes**

Se confirmó la patogenicidad del aislado TMC-1, de acuerdo a los postulados de Koch, se inoculó en frutos de toronja, limón persa y naranja valencia. Los frutos se desinfestaron previamente; se lavaron con jabón neutro, se enjuagaron con agua de la llave, se les agregó etanol al 70% durante 3

minutos, se mantuvieron en inmersión con NaCl al 1% durante 5 minutos, por último se enjuagaron con agua destilada estéril. Posteriormente se realizaron tres heridas en cada fruto con un picadiente estéril y se inoculó 0.5 ml de suspensión conidial con  $1 \times 10^6$  conidios por ml. Los frutos inoculados se colocaron en una cámara húmeda de plástico e incubaron a 28 °C y 95% de humedad relativa (Zakarias *et al.*, 2020). El experimento se realizó dos veces.

### **7.5.3 Evaluación *in vivo* de extractos acuosos de malezas contra *C. gloeosporioides***

Se evaluaron frutos de limón persa, naranja valencia y toronja Red blush cosechados sanos, con tamaño uniforme, color comparables. Cada fruto se desinfectó e inoculó de la misma manera que en la prueba de patogenicidad. Los frutos se protegieron en cámaras húmedas y después de 15 horas de incubación, se asperjaron en la superficie con extracto acuoso, en las concentraciones 1%, 2% y 4%, se utilizó el fungicida Carbendazim<sup>®</sup>, como control químico, mientras que los frutos control se aplicó agua destilada estéril (Koomen y Jeffries, 1993). Se realizaron 2 aplicaciones con intervalo de 7 días cada una, donde se registró la medición superficial y profundidad de lesión en cada fruto por medio de un calibrador digital TRUPER<sup>®</sup> modelo CALDI-6MP. Se utilizaron 5 réplicas por tratamiento y el experimento se realizó dos veces.

## **7.6 Cuantificación de *C. gloeosporioides* por medio de la técnica q-PCR**

### **7.6.1 Extracción de ADN de tejido de cítricos infectado con *C. gloeosporioides***

Se tomó muestra de tejido dañado del fruto realizando cortes con un bisturí en las áreas donde se indujo lesión en cada fruto, se consideró un área de 1 cm<sup>3</sup>. Posteriormente se extrajo el ADN genómico por el método de CTAB. Se agregó 4 ml del buffer a la muestra y se maceró perfectamente, en mortero con pistilo, se tomó 2 ml del macerado de cada muestra y se incubó en 65° C por 10 minutos, seguido se centrifugó las muestras a 10,000 rpm durante 5 minutos, posteriormente se transfirió el sobrenadante (~1,500 µl). Después se agregó 500 µl de cloroformo y nuevamente se centrifugó a 10,000 rpm durante 10 min. Los pasos siguientes se realizaron conforme a lo descrito para la extracción de ADN de maleza. El ADN se cuantificó en un NanoDrop One Spectrophotometer

Thermo Scientific®. Se realizaron muestras compuestas (*pool*), de cada unidad experimental se consideró las 3 lesiones como una sola muestra, y a ésta como una réplica biológica.

### 7.6.2 Amplificación por q-PCR

La amplificación se realizó en el termociclador CFX96® (Bio-rad); el programa establecido fue 95°C durante 3 minutos y 50 ciclos de 95 °C y 60 °C, ambas temperaturas durante 30 seg. Las mezclas de reacción contenían, para cada pozo o tubo, 10 µL de Supermix (SsoAdvanced Universal Probe; Bio-Rad, cat no 1725281), 6 µL de agua libre de nucleasas, 1 µL a 2 µM de cada uno de los oligos/sonda (**Cuadro 2**) y 1 µL a 10 ng de ADN, se incluyó un control negativo y un control de muestra sana en cada corrida de qPCR. Se realizaron dos réplicas técnicas por tres réplicas biológicas por cada tratamiento.

Para evaluar la calidad de las extracciones de ADN y las mezclas de reacción, se utilizó como control endógeno la amplificación con los oligos COXfpr (**Cuadro 2**), diseñado en base al gen del citocromo oxidasa mitocondrial de los cítricos (Hu *et al.*, 2013).

Se realizó una curva de concentración conocida, de 0.01 a 100 ng, con ADN de *C. gloeosporioides*.

**Cuadro 2.** Oligonucleótidos utilizados para la cuantificación por q-PCR

Oligo	Secuencia (5´-3´)	Amplicón	Referencia
ColTqF3	GCTTGGTGTTGGGGCCCTAC	127 pb, ITS	Rahman et al., 2019
ColTqR1	GGTTTTACGGCAAGAGTCCCT	<i>C. gloeosporioides</i>	
ColTqP1	[FAM]CCCTCCCGGAGCCTCCTTTGCGT A[BHQ]		
COXf	GTATGCCACGTCGCATTCCAGA	68 pb, COX	Hu et al., 2013
COXr	GCCAAAAGTCTAAGGGCATTTC	Cítricos	



### **7.7 Pruebas *in vitro* de viabilidad de extracto acuoso**

Se realizó una prueba de viabilidad del extracto acuoso con la concentración de mayor efectividad en ensayos *in vitro*, al 4%, en un periodo de 3 meses. El montaje se realizó de la misma manera que se indicó en las pruebas *in vitro*.

### **7.8 Análisis estadístico**

En los ensayos *in vitro* se consideró un diseño experimental con arreglo completamente al azar. Los datos se analizaron por medio de la prueba Kruskal Wallis y una prueba de Conover  $\alpha = 0,05$  en el software InfoStat versión estudiantil, cada tratamiento fue evaluado con tres réplicas.

Para los ensayos en fruto (*in vivo*), el diseño experimental se distribuyó en un arreglo completamente al azar. Donde en la variable de profundidad de lesión los datos se transformaron en logarítmicos, se analizó por ANOVA y una prueba Tukey ( $p > 0,05$ ) en el programa SAS versión 9.4, a excepción de los datos obtenidos en la segunda aplicación en las variables de profundidad de lesión en frutos de toronja y lesión superficial en naranja valencia y limón persa donde se analizaron por Kruskal Wallis y una prueba Conover ( $p > 0.05$ ) en el software InfoStat versión estudiantil.

En las pruebas de viabilidad del extracto, el experimento se realizó con 4 réplicas por tratamiento y los datos obtenidos se analizaron estadísticamente por una prueba de Friedman y una prueba de comparación de rangos Conover ( $p < 0.05$ ) en el software InfoStat versión estudiantil. Cada experimento se replicó una vez.

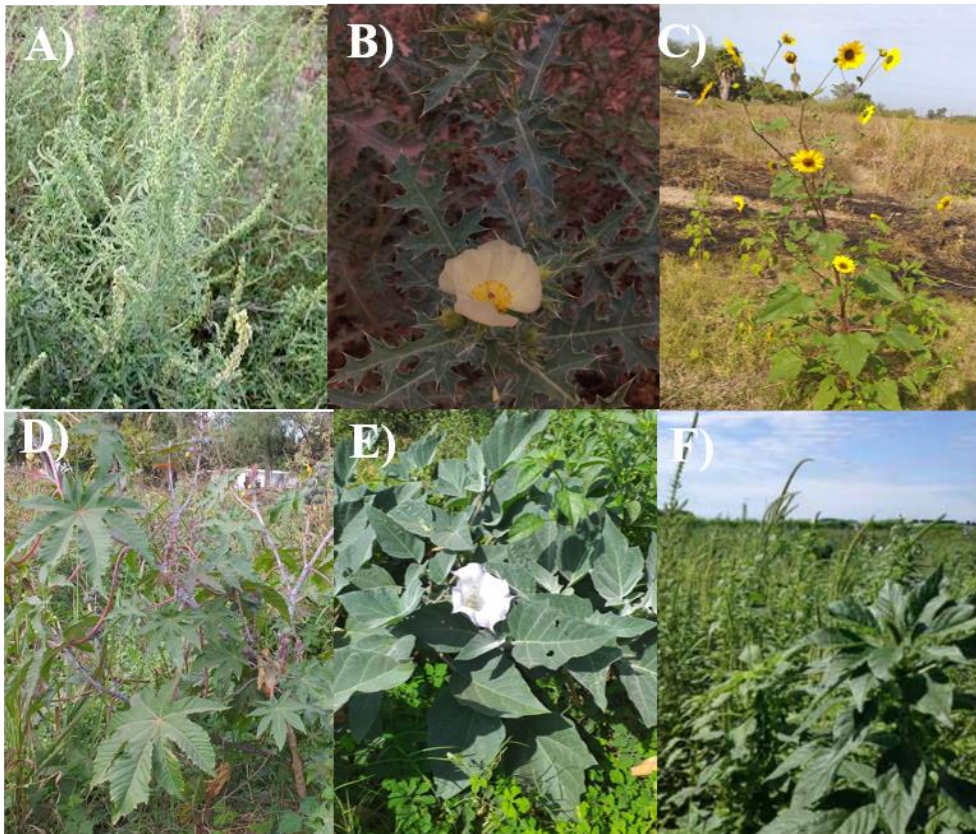
## VIII. RESULTADOS

### 8.1 Recolecta de especímenes

El **Cuadro 3** muestra los sitios, con georreferencia, donde se recolectaron cada una de las malezas evaluadas en este estudio (**Figura 6**), todas en el Municipio de Ahome, Sinaloa. Muestra también las variables, temperatura (que oscilaron de 15 a 25°C) y etapa fenológica de la maleza, registradas al momento de la colecta.

**Cuadro 3.** Datos de muestreo de malezas

Clave/Maleza	Etapa fenológica	Sitio de colecta	Coordenadas	Temperatura (°C)
E1/ Estafiate	Floración	San Miguel	25°55'32"N 108°55'46"O	15
E2/ Cardo santo	Vegetativa (Hoja nueva)	San Miguel	25°54'53"N 109°12'11"O	15
E3/ Girasol	Floración	San Miguel	25°55'35"N 108°55'48"O	15
E4/ Higuerilla	Vegetativa (Hoja nueva)	E Porvenir	25°55'35" N 108°55'45" O	15
E5/ Toloache	Floración	San Miguel	25° 55'01" N 109°02'08"O	27
E6/ Bledo	Pre-floración	El Porvenir	25°55'33" N 108°55'45"O	15



**Figura 6.** Especies catalogadas como malezas. A) Ejemplar 1, *Ambrosia confertiflora*, B) E2, *Argemone mexicana*; C) E3, *Helianthus annuus*, D) E4 *Ricinus communis*; E) E5 *Datura discolor*; y F) E6 *Amaranthus palmeri*.

## 8.2 Identificación molecular de las especies de malezas

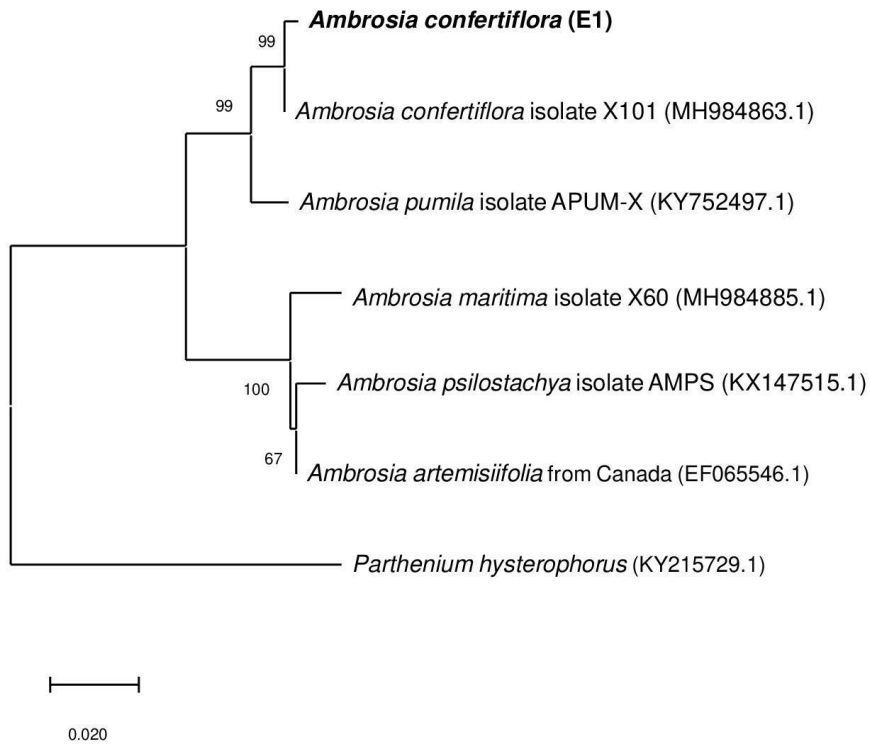
La comparación, de las secuencias de malezas obtenidas, con las depositadas en GenBank se muestra en el **Cuadro 4**. El estafiate (E1) comparte un porcentaje de identidad de 99.56 con *Ambrosia confertiflora* (MH984863.1), el cardo santo (E2) un 99.40 con *Argemone mexicana* (MH768272.1), el girasol (E3) un 99.56 con *Helianthus annuus* (KF767534.1), la higuierilla (E4) 99.85 con *Ricinus communis* (MN257690.1), mientras que el toloache (E5) y bledo (E6) un 100 por ciento *Datura discolor* (JX467605.1) y *Amaranthus palmeri* (KY968865.1), respectivamente.

El análisis filogenético de la secuencia ITS, de cada una de las malezas indica que el estafiate (E1) pertenece a *Ambrosia confertiflora* DC, el cardo santo (E2) a *Argemone mexicana* L. (E3), el girasol a *Helianthus annuus* L., la higuierilla

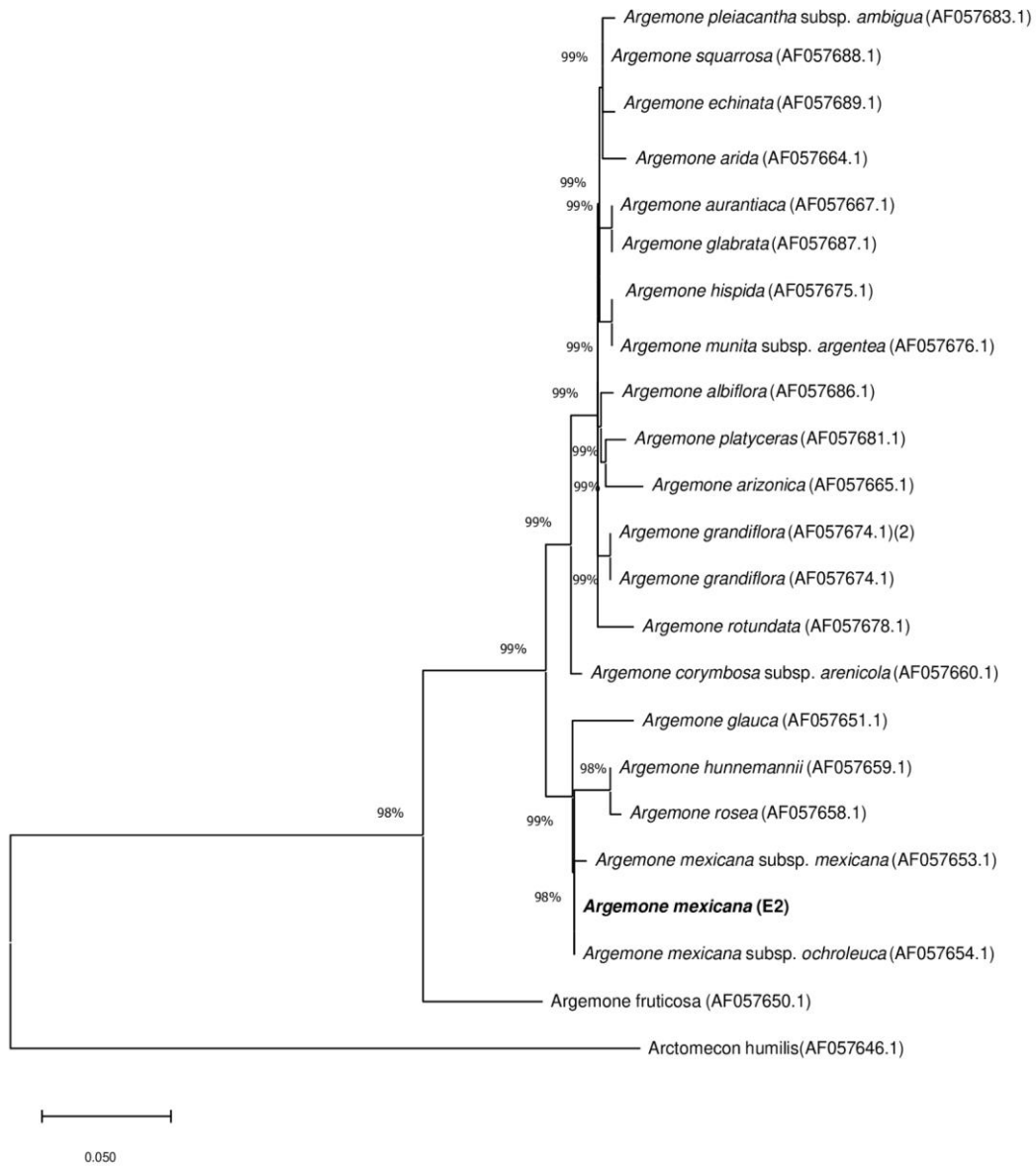
(E4) a *Ricinus communis* L., el toloache (E5) a *Datura discolor* Bern. y el bleado a (E6) *Amaranthus palmeri* S. Watson, todos en clados bien soportados con valores *bootstrap* de 99, 98, 99, 98, 100 y 97, respectivamente (**Figuras 7-12**).

**Cuadro 4.** Comparación de las secuencias de malezas con secuencias depositadas en el GenBank

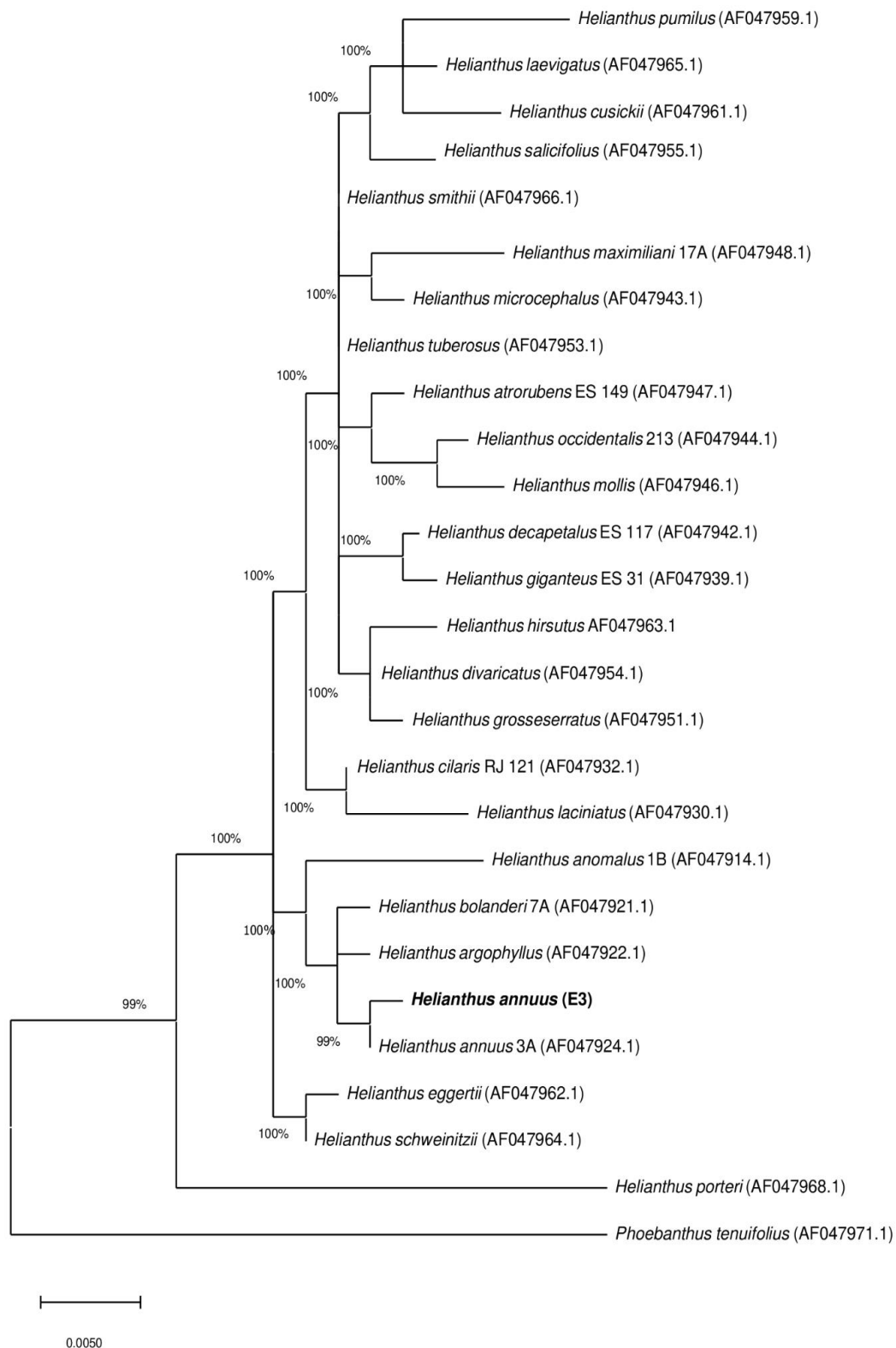
Clave/ Maleza	Especie (Número de Acceso)	Cobertura (%)	Valor E	Identidad (%)
E1/ Estafiate	<i>Ambrosia confertiflora</i> (MH984863.1)	100	0.0	99.56
E2/ Cardo santo	<i>Argemone mexicana</i> (MH768272.1)	99	0.0	99.40
E3/ Girasol	<i>Helianthus annuus</i> (KF767534.1)	100	0.0	99.56
E4/ Higuerilla	<i>Ricinus communis</i> (MN257690.1)	100	0.0	99.85
E5/ Toloache	<i>Datura discolor</i> (JX467605.1)	100	0.0	100.00
E6 Bledo	<i>Amaranthus palmeri</i> (KY968865.1)	99	0.0	100.00



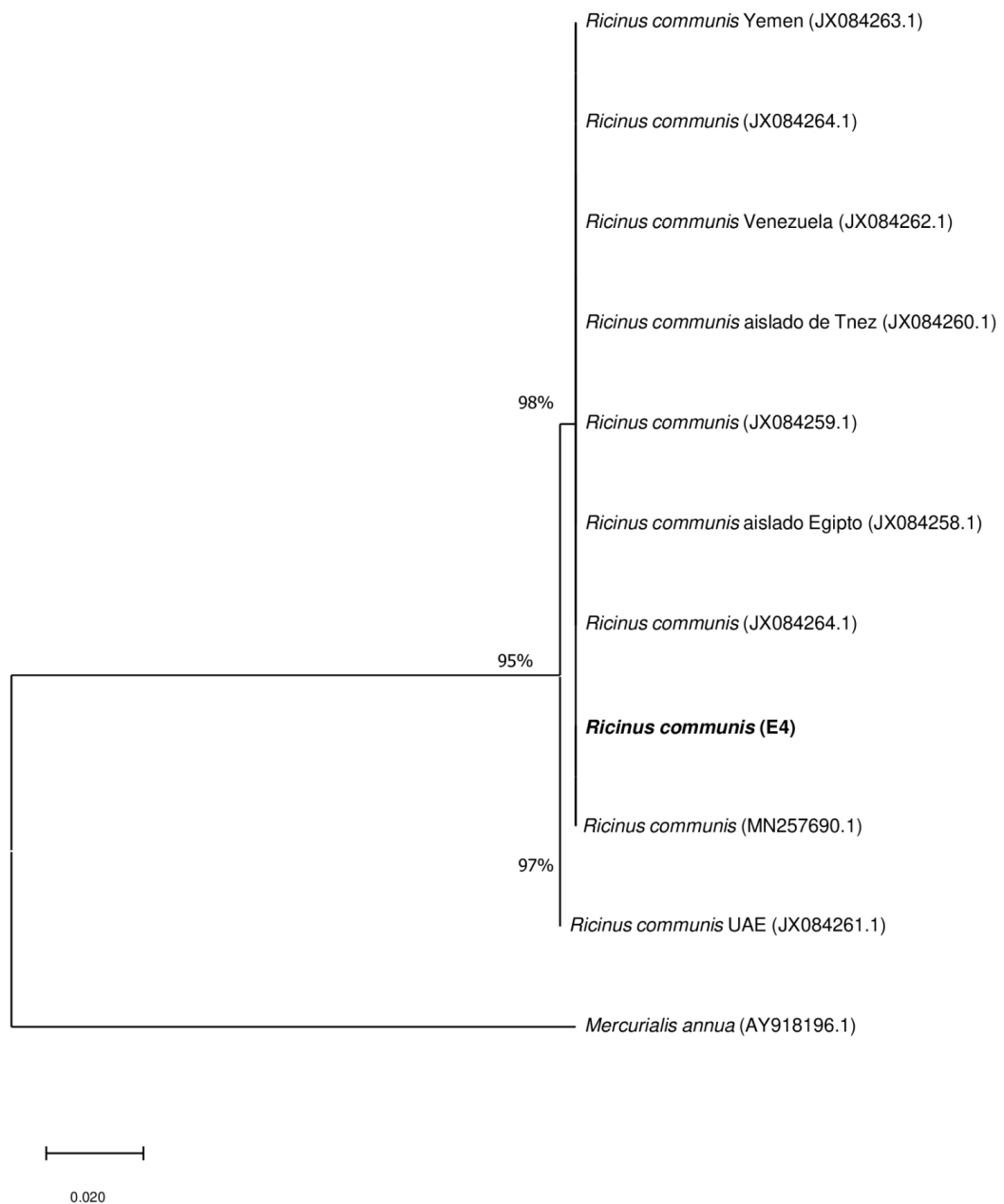
**Figura 7.** Árbol filogenético del espaciador interno transcrito (ITS), inferido por Máxima Verosimilitud en MEGA X. La escala representa el promedio de sustituciones por sitio. Se representan los valores Bootstrap sobre las ramas, cerca de los internodos. La especie encontrada en este estudio se encuentra marcada en negrita (*Ambrosia confertiflora*).



**Figura 8.** Árbol filogenético del espaciador interno transcrito (ITS), inferido por Máxima Verosimilitud en MEGA X. La escala representa el promedio de sustituciones por sitio. Se representan los valores Bootstrap sobre las ramas, cerca de los internodos. La especie encontrada en este estudio se encuentra marcada en negrita (*Argemone mexicana*).

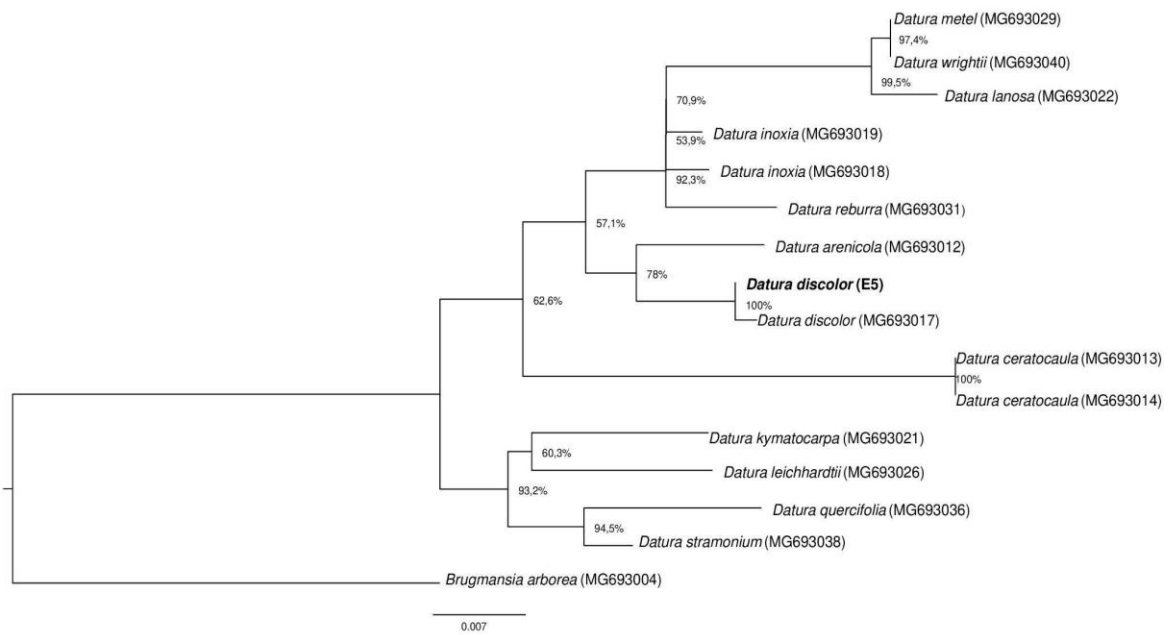


**Figura 9.** Árbol filogenético del espaciador interno transcrito (ITS), inferido por Máxima Verosimilitud en MEGA X. La escala representa el promedio de sustituciones por sitio. Se representan los valores Bootstrap sobre las ramas, cerca de los internodos. La especie encontrada en este estudio se encuentra marcada en negrita (*Helianthus annuus*).

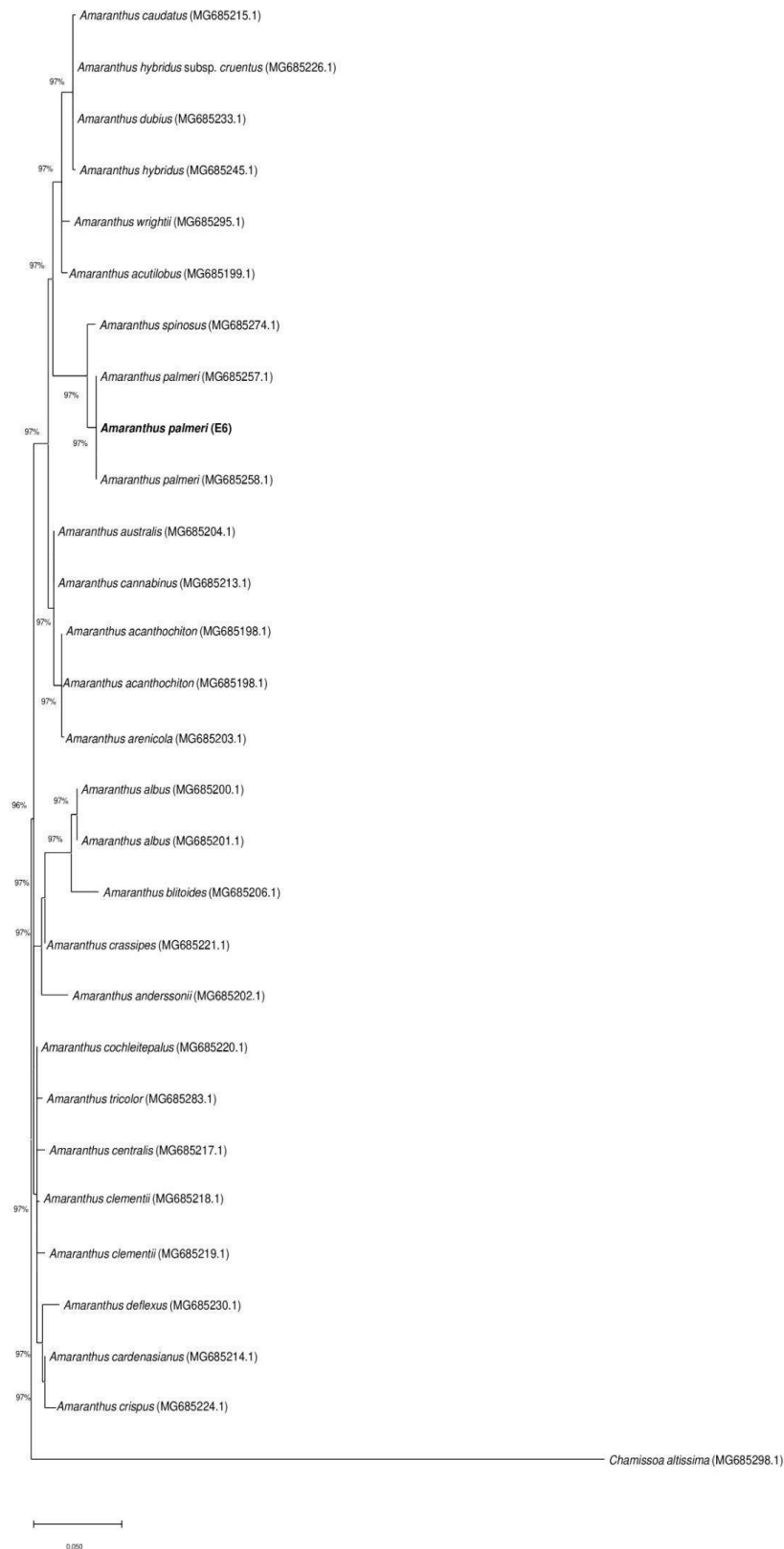


**Figura 10.** Árbol filogenético del espaciador interno transcrito (ITS), inferido por Máxima Verosimilitud en MEGA X. La escala representa el promedio de sustituciones por sitio. Se representan los valores Bootstrap sobre las ramas, cerca de los internodos. La especie encontrada en este estudio se encuentra marcada en negritas (*Ricinus communis*).





**Figura 11.** Árbol filogenético del espaciador interno transcrito (ITS), inferido por Máxima Verosimilitud en MEGA X. La escala representa el promedio de sustituciones por sitio. Se representan los valores Bootstrap sobre las ramas, cerca de los internodos. La especie encontrada en este estudio se encuentra marcada en negritas (*Datura discolor*).



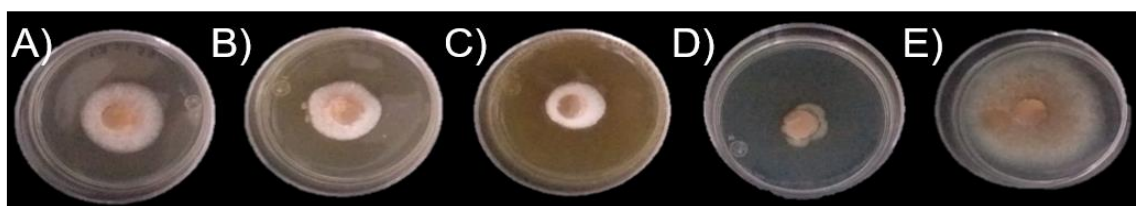
**Figura 12.** Árbol filogenético del espaciador interno transcrito (ITS), inferido por Máxima Verosimilitud en MEGA X. La escala representa el promedio de sustituciones por sitio. Se representan los valores Bootstrap sobre las ramas, cerca de los internodos. La especie se marca en negrita (*Amaranthus palmeri*).

Cabe señalar que la identificación realizada se basó en la caracterización molecular, pero podría complementarse con la identificación botánica basada en características taxonómicas de cada uno de los ejemplares evaluados en este trabajo.

### 8.3 Evaluación *in vitro* de extractos acuosos de malezas contra *C. gloeosporioides*

Los resultados de los experimentos *in vitro* revelaron que únicamente el extracto acuoso de toloache (*Datura discolor*), a diferentes concentraciones (1, 2 y 4%), redujo significativamente, el crecimiento de *C. gloeosporioides*, con porcentajes de inhibición a partir del 50% (51.65, 59.91 y 72.62%, respectivamente), la concentración al 4%, no mostró diferencia con el control químico, carbendazim® (85.57%) **Figura 13**.

Por otro lado, no existen diferencias significativas en el porcentaje de reducción de crecimiento del patógeno, con los extractos acuosos de *A. confertiflora*, *A. mexicana*, *H. annuus*, *R. communis* y *A. palmeri*, en ninguna de las concentraciones evaluadas, 1, 2 y 4% (datos no mostrados). Por lo cual se descartaron del estudio para la evaluación *in vivo*, donde solo se evaluó el extracto que ofreció la mayor inhibición.

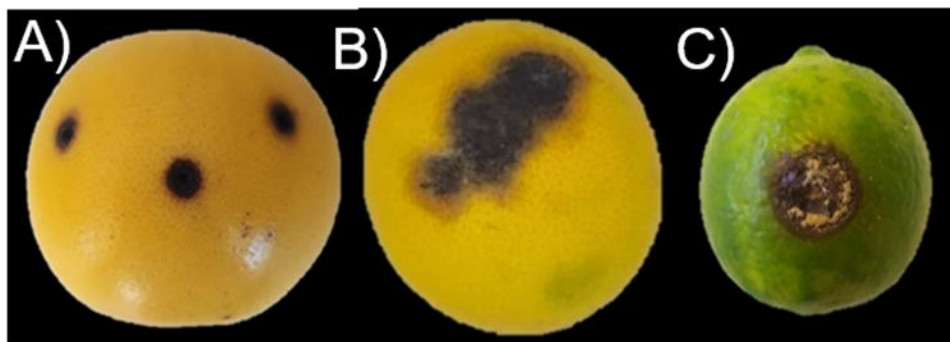


**Figura 13.** Efecto de los extractos acuosos de *D. discolor* en crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides*. A) Concentración 1%, B) 2%, C) 4%, D) Carbendazim®, E) Control.

#### 8.4. Evaluación de extracto acuoso de la maleza *D. discolor* contra *C. gloeosporioides* en cítricos

##### 8.4.1 Pruebas de patogenicidad del aislado de *C. gloeosporioides*

Se confirmó la patogenicidad del aislado TMC-1 de *C. gloeosporioides* en frutos de toronja, naranja valencia y limón persa, (**Figura 14**). Se observaron síntomas característicos de la antracnosis en cítricos, lesiones regulares e irregulares, necróticas con márgenes café claro y color naranja.



**Figura 14.** Antracnosis en cítricos causada por *C. gloeosporioides*.

A) Toronja, B) Naranja valencia, C) Limón persa.

##### 8.4.2 Evaluación de extracto acuoso de la maleza *D. discolor* contra *C. gloeosporioides* en toronja

En los frutos de toronja no se observó diferencia significativa en el tamaño de lesión superficial en la aplicación 1 ( $P < 0.1092$ ), mientras que la segunda aplicación (15 días post inoculación) con el extracto al 4% incrementó el desarrollo de lesiones ( $P < 0.0001$ ) (**Cuadro 5** y **Figura 15-A**).

**Cuadro 5.** Efecto de extractos acuosos de *D. discolor* contra *C. gloeosporioides* en frutos de toronja

Tratamientos	Tamaño de lesión superficial en fruto (mm)	
	Aplicación 1	Aplicación 2
<i>D. discolor</i> 1%	1.86a	2.43abc
<i>D. discolor</i> 2%	2.55a	3.12ab

<i>D. discolor</i> 4%	2.22a	3.49a
Carbendazim®	1.90a	2.37abc
Control (+)	2.48a	2.29bc
Control (-)	1.61a	1.52c

Medias con letra común no son significativamente diferentes (Tukey,  $p > 0.05$ ).

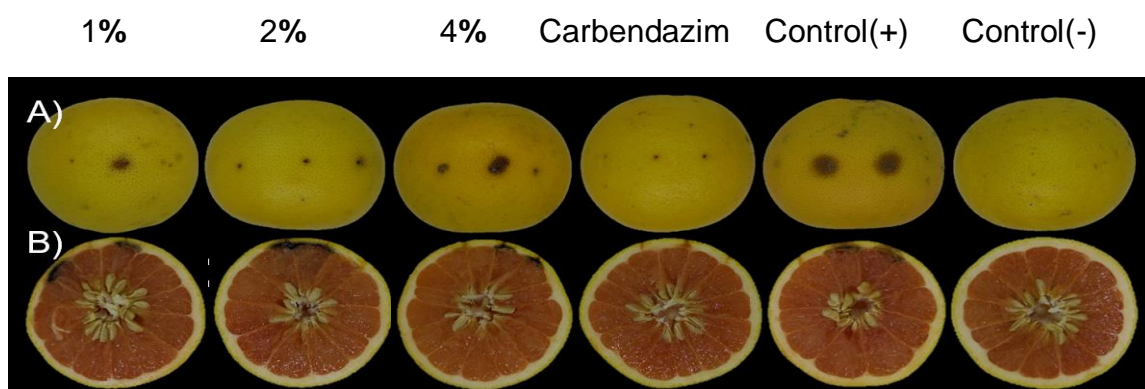
De la misma manera, los resultados de la profundidad de lesión indican que no existe diferencia significativa en ninguna de las dosis evaluadas en la efectividad de la reducción de lesión causada por *C. gloeosporioides* (**Cuadro 6** y **Figura 15-B**).

**Cuadro 6.** Efecto de extractos acuosos de *D. discolor* contra *C. gloeosporioides* en frutos de toronja

Tratamientos	Profundidad de lesión en fruto (mm)	
	Aplicación 1	Aplicación 2
<i>D. discolor</i> 1%	5.71a	13.91b
<i>D. discolor</i> 2%	6.64a	11.66b
<i>D. discolor</i> 4%	6.31a	9.08ab
Carbendazim®	6.21a	0a
Control (+)	6.64a	12.09b
Control (-)	0b	0a

Medias con letra común no son significativamente diferentes (Tukey,  $p > 0.05$ ).

Aplicación 1 datos transformados log, Aplicación 2 (Conover,  $p > 0.05$ )



**Figura 15.** Efecto de la segunda aplicación (a los 15 días post inoculación) de extractos acuoso de *D. discolor* en frutos de toronja. A) Lesión superficial, B) Profundidad de lesión, Control (+) inoculado con *C. gloeosporioides*, Control sin inocular (-).

De acuerdo a estos resultados, bajo las condiciones descritas, las concentraciones del extracto acuoso de *D. discolor* no son efectivas en frutos de toronja.

#### 8.4.3 Evaluación de extracto acuoso de la maleza *D. discolor* contra *C. gloeosporioides* de naranja valencia

En frutos de naranja valencia, las lesiones superficiales, ocasionadas por *C. gloeosporioides*, son significativamente diferentes en la dosis al 4%, respecto al control ( $P < 0.0018$ ) tanto en la aplicación 1 como en la aplicación 2 ( $P < 0.0003$ ) (Cuadro 7 y Figura 16-A). Pero no en la profundidad, aplicación ( $p < 0.0006$ ) y aplicación 2 ( $p < 0.2374$ ) (Cuadro 8 y Figura 16-B).

**Cuadro 7.** Efecto de extractos acuosos de *D. discolor* contra *C. gloeosporioides* en frutos de naranja valencia

Tratamientos	Tamaño de lesión superficial en fruto (mm)	
	Aplicación 1	Aplicación 2
<i>D. discolor</i> 1%	1.75abc	1.57bcd

<i>D. discolor</i> 2%	1.82ab	1.81cd
<i>D. discolor</i> 4%	1.55bc	1.39abc
Carbendazim®	1.32c	1.53bcd
Control (+)	2.03 <sup>a</sup>	2.49d
Control (-)	1.42bc	1.18 <sup>a</sup>

---

Aplicación 1 (Tukey,  $p > 0.05$ ), Aplicación 2 (Conover,  $p > 0.05$ )

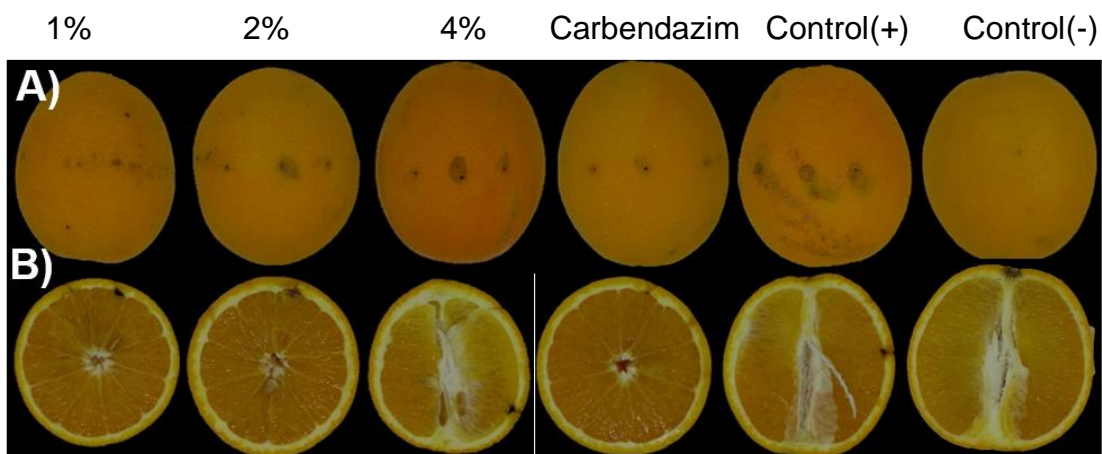
Lo que indica que el extracto acuoso no presentó buen efecto en naranja valencia.

**Cuadro 8.** Efecto de extractos acuosos de *D. discolor* contra *C. gloeosporioides* en frutos de naranja valencia

Tratamientos	Profundidad de lesión en fruto (mm)	
	Aplicación 1	Aplicación 2
<i>D. discolor</i> 1%	3.00a	1.05a
<i>D. discolor</i> 2%	3.33a	2.93a
<i>D. discolor</i> 4%	2.86a	3.56a
Carbendazim®	3.42a	2.05a
Control (+)	4.04a	2.37a
Control (-)	0b	0a

---

Medias con letra común no son significativamente diferentes (Tukey,  $p > 0.05$ )  
Aplicación 1 y 2 datos transformados log



**Figura 16.** Efecto de la segunda aplicación (a los 15 días post inoculación) de extractos acuosos de *D. discolor* en frutos de naranja valencia. Control (+) inoculado con *C. gloeosporioides*, Control (-); sin inocular.

En general, estos resultados sugieren que no existe efecto de reducción de la infección ocasionada por el fitopatógeno en postcosecha de naranja valencia, con las dos aplicaciones de las distintas dosis del extracto acuoso de *D. discolor*.

#### 8.4.4 Evaluación de extracto acuoso de la maleza *D. discolor* contra *C. gloeosporioides* en limón persa

En la aplicación 1 de extractos acuosos de *D. discolor*, no se observó diferencia significativa en las lesiones en frutos de limón persa, en ninguno de los tratamientos ( $P < 0.2757$ ). Sin embargo, las lesiones ocasionadas por *C. gloeosporioides* se redujeron con la segunda aplicación, en la dosis al 4% ( $P < 0.0016$ ) (**Cuadro 9** y **Figura 17-A**). Ésto sugiere que el extracto acuoso de *D. discolor* al 4%, tiene el potencial de inhibir al patógeno en frutos de limón persa.

**Cuadro 9.** Efecto de extractos acuosos de *D. discolor* contra *C. gloeosporioides* en frutos de limón persa

Tratamientos	Tamaño de lesión superficial en fruto (mm)	
	Aplicación 1	Aplicación 2



<i>D. discolor</i> 1%	2.56a	3.06cd
<i>D. discolor</i> 2%	4.23a	2.71bcd
<i>D. discolor</i> 4%	2.48a	2.13a
Carbendazim®	2.30a	2.12ab
Control (+)	3.07a	4.14d
Control (-)	2.30a	2.26a

---

Medias con letra común no son significativamente diferentes

Aplicación 1 (Tukey,  $p > 0.05$ )

Aplicación 2 (Conover,  $p > 0.05$ )

Por otro lado, se obtuvo una reducción significativa de la profundidad de lesión en fruto de limón persa con la segunda aplicación del extracto acuoso en la dosis 4% ( $p < .0001$ ) (**Cuadro 10 y Figura 12-B**), resultado consistente en la lesión superficial del fruto ( $P < 0.0016$ ) (**Cuadro 9**), esto sugiere que dicho extracto tiene el potencial para el manejo de antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en postcosecha de limón persa.

**Cuadro 10.** Efecto de extracto acuoso de *D. discolor* contra *C. gloeosporioides* en frutos de limón persa

Tratamientos	Profundidad de lesión en fruto (mm)	
	Aplicación 1	Aplicación 2
<i>D. discolor</i> 1%	3.72a	4.78ab
<i>D. discolor</i> 2%	4.16a	5.55ab
<i>D. discolor</i> 4%	3.90a	2.87b

Carbendazim®	2.12ab	3.96b
Control (+)	4.65a	9.42a
Control (-)	0b	0c

Medias con letra común no son significativamente diferentes (Tukey,  $p > 0.05$ )

Aplicación 1 y 2 datos transformados log

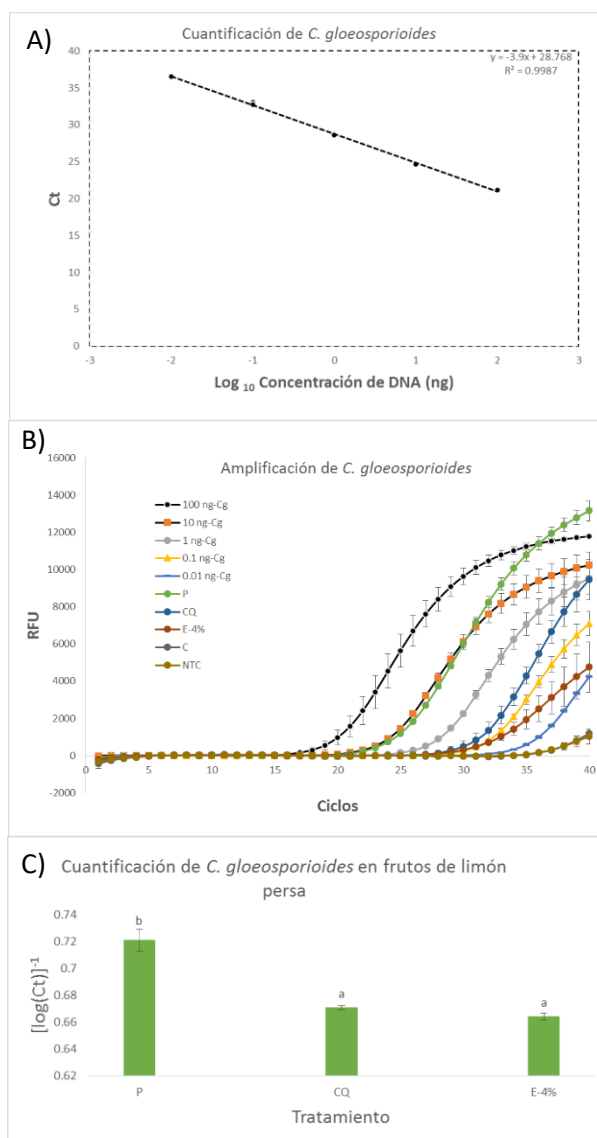


**Figura 17.** Efecto de la segunda aplicación (a los 15 días post inoculación) de extractos acuosos de *D. discolor* en frutos de limón persa. Control (+) inoculado con *C. gloeosporioides*, Control (-); sin inocular.

#### 8.4.5 Cuantificación de *C. gloeosporioides* en frutos de limón persa tratados con extracto de *D. discolor* al 4%

Se utilizó un método molecular cuantitativo, un ensayo de PCR en tiempo real (q-PCR) de alta sensibilidad, se empleó una sonda específica para la detección y cuantificación de la especie *C. gloeosporioides* en base al ADN, para estimar y corroborar los resultados observados en el tratamiento de limón persa con el extracto al 4%. Los resultados muestran una tendencia similar; en la amplificación medida en unidades de fluorescencia (RFU) (**Figura 18-A**), con respecto a una curva de concentración de 0.01 a 100 ng de ADN del patógeno (**Figura 18-B**), se observa que la curva de la muestra de fruto con el patógeno (P) es similar a la amplificación de 10 ng de *C. gloeosporioides* (10 ng-Cg) mientras que las de las muestras de fruto tratadas con el control químico (CQ) y

la de frutos tratadas con el extracto de *D. discolor* al 4% (E-4%), muestran amplificación similar a la de 0.01 ng de *C. gloeosporioides* (0.01 ng-Cg). La estimación de moléculas de patógeno indica menor cantidad en los tratamientos CQ y E-4% (**Figura 18-C**).



**Figura 18. Detección específica de *C. gloeosporioides*, por q-PCR con los oligos ColTqF3, ColTqR1 y ColTqP1.** A) Regresión lineal entre el valor logarítmico de la cantidad inicial de ADN del patógeno y el valor logarítmico recíproco del ciclo umbral (Ct). B) Curvas de amplificación de los diferentes tratamientos; muestras (no frutos) con la cantidad especificada de ADN del patógeno en ng (0.01 a 100 ng-Cg), fruto con el patógeno (P), tratado con control químico (CQ), tratado con extracto de *D. discolor* al 4% (E-4%), fruto control sin patógeno (C), muestra sin templado (NTC). C) Estimación de la cantidad de moléculas del patógeno en los tratamientos especificados de frutos de limón persa.

### 8.5 Pruebas *in vitro* de viabilidad de extracto acuoso de *Datura discolor*

Con la finalidad de determinar el efecto del tiempo en la viabilidad del extracto de *D. discolor*, se realizaron experimentos *in vitro*, de manera mensual, con el extracto acuoso a la concentración de mayor efectividad (4%). Se observa que el extracto mantiene la capacidad de reducir el crecimiento de *C. gloeosporioides*, por un periodo de alrededor de 3 meses posteriores a la preparación (**Cuadro 11**), pero no con la misma efectividad. Es decir, en reciente preparación inhibió un 72.62% del crecimiento, como se mencionó con anterioridad, y un 24.38, 23.37 y 27.95% al 1, 2 y 3 meses respectivamente.

**Cuadro 11.** Porcentaje de inhibición micelial de *C. gloeosporioides* con el extracto acuoso de *D. discolor* al 4%, en un periodo de 3 meses

Tratamiento	Periodos de evaluación		
	Mes 1	Mes 2	Mes 3
Extracto de <i>D. discolor</i> al 4%	24.38a	23.37a	27.95a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes Conover,  $p > 0.05$  (Conover, 1999)

## IX. DISCUSIÓN

En este trabajo se evaluó, por primera vez, la factibilidad del uso de extractos de especies vegetales, consideradas como malezas presentes en los cultivos agrícolas de la región norte de Sinaloa, para el control de la antracnosis en cítricos causada por *C. gloeosporioides*.

### 9.1 Identificación molecular de especies de malezas

Se recolectó e identificó a nivel especie, cada una de las malezas estudiadas, con base a la región ITS del ADN ribosomal. Diferentes estudios han descrito, a través del tiempo, el uso de esta región para el análisis filogenético de distintos géneros de plantas (Schilling *et al.*, 1998; Schwarzbach y Kadereit, 1999; Enan *et al.*, 2012; Cheng *et al.*, 2016; Dupin y Smith, 2018; Waselkov *et al.*, 2018), los oligos más utilizados son ITS1-ITS4 (White *et al.*, 1990) que

originalmente se diseñaron para la identificación de hongos (Cheng *et al.*, 2016). Sin embargo, esta región ha sido ampliamente estudiada en la sistemática molecular de plantas para resolver la identificación a niveles de género y especie, esto por su alta resolución de relaciones inter e intraespecíficas (Staggemeier *et al.*, 2015; Yuan *et al.*, 2015).

Aquí se describe la identificación molecular de las especies *Ambrosia confertiflora*, *Argemone mexicana*, *Helianthus annuus*, *Ricinus communis*, *Datura discolor* y *Amaranthus palmeri* en el norte del estado de Sinaloa, México, donde son consideradas malezas. Estos hallazgos son similares a lo reportado por Rzedowski y Rzedowski, 2001; Villaseñor y Espinosa, 1998; Luna-Cavazos y Bye, 2011, quienes describen la distribución de estas especies de plantas en distintos estados de México.

A nuestro conocimiento, se identificaron por primera vez de manera molecular aquí en la región a las especies de malezas anteriormente mencionadas. La identificación molecular de *Amaranthus palmeri* se reportó recientemente por Verdugo-Navarrete *et al.* (2021), en la región norte del estado de Sinaloa, similar a lo descrito en el presente estudio.

Se desconoce la utilidad de estas especies en los agroecosistemas, por ello se sugiere su aprovechamiento para la elaboración de productos eficaces en el manejo de hongos fitopatógenos de interés agrícola.

## **9.2 Efecto antifúngico *in vitro* de extractos de malezas contra *C. gloeosporioides***

La eficacia de extractos acuosos en la inhibición micelial de *C. gloeosporioides*, se demostró con extractos provenientes de hojas de *Datura discolor* en la dosis 4%, con un resultado de 72.62%, cercano a la eficacia obtenida del fungicida comercial Carbendazim® (85.57%). Hallazgos similares reportan Karim *et al.* (2017), donde señalan una reducción máxima de 80% del crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides*, con el uso de extractos etanólicos de semillas de *D. metel*, en la dosis 1.5%, a su vez también los resultados obtenidos en este estudio contrastan con lo reportado por los autores, quienes no observaron efecto antifúngico del extracto metanólico de hojas de *D. metel*. Esto podría explicarse por la variabilidad de constituyentes fitoquímicos, distribución

geográfica y la etapa fenológica del espécimen (Qasem y Abu-Blan, 1995), sin embargo, no se descarta que son distintos métodos de extracción y especies de dónde proviene el extracto.

Existe amplia evidencia sobre el potencial antifúngico de especies del género *Datura* contra diversos hongos fitopatógenos incluido *C. gloeosporioides* en distintos hospedantes (Alemu *et al.*, 2014; Villacís-Aldaz *et al.*, 2017; Ummuhan, 2017; Matías *et al.*, 2020), pero a nuestro conocimiento este es el primero con *D. discolor*. Esta propiedad antifúngica se atribuye a su composición química, principalmente metabolitos secundarios con actividad biológica (Karim *et al.*, 2017; Matías *et al.*, 2020), a su vez estos afectan estructuras celulares del hongo y poseen múltiples mecanismos de acción que aún no se conocen con exactitud.

Estudios previos han explorado la presencia de posibles compuestos bioactivos de extractos vegetales que puedan cumplir un papel importante en el control de hongos fitopatógenos. Zakaria *et al.* (2020), reportan una alta cantidad de ácido elálgico de extracto de *Plantago sinaica*, asociado a posibles cambios ultraestructurales en las hifas de *C. gloeosporioides*. Karim *et al.* (2017) demostraron que extractos metanólicos de *D. metel*, contienen ácido n-hexadecanoico, fitol, ácido octadecanoico, ácido oleico, o-xileno y ciclohexanol, y sugieren que alguna de las moléculas puede estar potencialmente asociadas a la inhibición *in vitro* sobre *C. gloeosporioides*.

Es probable que el extracto acuoso de *D. discolor* contenga moléculas con potencial antifúngico, pero no se analizó en este estudio. Por lo que se recomienda futuros estudios para la caracterización de metabolitos presentes en *D. discolor* y sus efectos en la inhibición del hongo.

### **9.3 Efecto antifúngico del extracto acuoso de *D. discolor* para el manejo de antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en postcosecha de cítricos**

#### **9.3.1 Patogenicidad del aislado de *C. gloeosporioides***

Se observó en los resultados de este estudio la capacidad patogénica de un aislado de *C. gloeosporioides* en postcosecha de cítricos, este hallazgo es

consistente con previos trabajos que reportan la presencia del fitopatógeno causando antracnosis en cítricos (McGovern *et al.*, 2012; Aiello *et al.*, 2015; Guarnaccia *et al.*, 2017; Douanla-Meli & Unger, 2017; Abbas *et al.*, 2019; Perez-Mora *et al.*, 2020; Cruz-Laguna *et al.*, 2020; Wang *et al.*, 2021). El aislado de *C. gloeosporioides* evaluado en esta investigación fue obtenido originalmente causando antracnosis en toronja en Sinaloa, México (Perez-Mora *et al.*, 2020), coincide con lo documentado por Cruz-Laguna *et al.*, 2020 quienes identificaron al fitopatógeno como el agente causal de antracnosis en toronja (*Citrus paradisi*) en huertos de traspatio en Guerrero, México.

Por otro lado también se confirmó que este aislado puede causar antracnosis en frutos de limón persa (*C. aurantifolia*) y naranja valencia (*C. sinensis*). De acuerdo a los reportes de Timmer *et al.*, 1998 y Douanla-Meli & Unger, 2017, describen a *C. gloeosporioides* en los hospedantes; *C. sinensis* y *C. limon* en países de América del Sur, parte de África, Asia y Europa. Esta enfermedad es importante, porque este fitopatógeno se encuentra ampliamente distribuido en diferentes regiones productoras de cítricos en el mundo incluido nuestro país.

### **9.3.2 Efecto *in vivo* antifúngico del extracto acuoso de *D. discolor***

Se observó la reducción de antracnosis causada por *C. gloeosporioides* en frutos de limón persa (*C. aurantifolia*) con la aplicación del tratamiento al 4%, estos resultados coinciden con lo reportado por Ademe *et al.* (2013), quienes indican la reducción de la antracnosis causada por este fitopatógeno en frutos de papaya con la aplicación del extracto acuoso de *Echinops* sp. al 25%. También otro estudio documentado por Alemu *et al.* (2014), mostró el efecto antifúngico de los extractos acuosos de *Ruta chapalensis*, *D. stramonium* y *Eucalyptus globulus*, estos dos últimos al 50%, redujeron la incidencia de antracnosis en frutos de mango. Los autores señalan que el uso de extractos botánicos en el manejo de la antracnosis podría ser la alternativa ideal al uso de fungicidas sintéticos.

Por otro lado, diversas investigaciones indican la efectividad de extractos vegetales en la inhibición *in vitro* de *Colletotrichum* spp. (Bazie *et al.*, 2014; Karim *et al.*, 2017; Hernández-Ceja *et al.*, 2021), sin embargo, no todos los extractos

son efectivos en pruebas *in vivo*, donde pocos logran el control de la enfermedad. Esto es complejo de explicarse por la interacción con múltiples factores como el ambiente, la respuesta del hospedante, el fitopatógeno y el mecanismo de acción del extracto (Nxumalo *et al.*, 2021).

Se ha intentado dilucidar dichos mecanismos, de acuerdo con el estudio de Meskin *et al.* (2002), quienes describen diferentes mecanismos de acción a través por el cual los fitoquímicos pueden ejercer actividad antimicrobiana, tal como la inhibición de la actividad de enzimas y toxinas, daño de la membrana, supresión de factores de virulencia, inhibición de la síntesis de proteínas, cabe señalar que aún se carece de estudios que puedan dar a conocer con certeza estos procesos.

En este trabajo la efectividad del extracto acuoso al 4% estuvo en función de las variables evaluadas y adicionalmente a la detección de la cantidad de inóculo del hongo por medio de la prueba q-PCR, utilizando los oligonucleótidos descritos por Rahman *et al.* (2019).

Se recomienda futuras investigaciones para explorar la efectividad de extractos de origen botánico, obtenidos principalmente de otras malezas. Estos resultados indican un primer reporte de la actividad antifúngica del extracto acuoso de *D. discolor* contra *C. gloeosporioides*, para el manejo de antracnosis en postcosecha de limón persa, se sugieren estudios posteriores para aislar y caracterizar los compuestos bioactivos involucrados con esta propiedad.

#### **9.4 Pruebas de viabilidad de extractos acuosos de *D. discolor***

Los resultados en este estudio confirman que se mantuvo el efecto inhibitorio de los extractos acuosos de *D. discolor* sobre el crecimiento *in vitro* de *C. gloeosporioides*, hasta por 3 meses. También se observó una actividad de protección en frutos de limón persa después de 15 días de inoculación con *C. gloeosporioides*, empleando dos aplicaciones de extractos acuosos al 4%, con una frecuencia de aplicación de 7 días.

Esto es similar a lo descrito en el estudio de Martinez *et al.* (2019), quienes revelan el efecto antifúngico de compuestos aislados de *Brosimum rubescens*, donde el extracto soluble en diclorometano y 7-demetilsuberosina, mostró una



capacidad protectora después de 15 días de inoculación con *C. gloeosporioides* en frutos de mango y en frutos de papaya después de 7 días de almacenamiento.

El conocer el efecto de inhibición del extracto acuoso a través del tiempo, permite inferir su viabilidad y a su vez también proporciona información técnica útil para el uso y aplicación eficiente del extracto en el manejo de la antracnosis.

## **X.CONCLUSIÓN**

En la presente investigación se aporta información relevante para el manejo de la antracnosis a base de métodos de control biológico, a su vez estos mismos contribuyen en el desarrollo de estrategias amigables con el ambiente y la salud humana, basadas principalmente en fuentes de origen botánico, tal como la especie *Datura discolor* identificada en este estudio, está es catalogada como una maleza presente en los cultivos agrícolas de la región.

El toloache (*D. discolor*) podría tener un papel importante como potencial fuente de compuestos antifúngicos, es por ello que se sugieren posteriores trabajos para el aislamiento y caracterización de estos, donde se evalúen diferentes tejidos vegetales de esta especie, debido a que en este trabajo solamente se estudió en hojas. Esto abriría camino en la elaboración de productos biorracionales que puedan ser útiles en el manejo de enfermedades de interés agrícola.

## XI. BIBLIOGRAFÍA

- Abbas, M. H., Anum, H.H., Ahsem, M.A., Nabeel saleem, M., Mohsin, S., Hussain, S., Umar, M., Tafheem, F. (2019). Assessment of the potential for disease development of *Colletotrichum* spp. in different species of citrus fruits. *Nature and Science* ;17(1) 88-95 pp. doi:10.7537/marsnsj170119.12.
- Adaskaveg, J. E., and Hartin, R. J. (1997). Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* 87: 979-987. doi: 10.1094 / PHYTO.1997.87.9.979.
- Ademe, A., Ayalew, A., Woldetsadik, K. (2013). Evaluation of antifungal activity of plant extracts against papaya anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *J Plant Pathol Microb* 4: 207. doi:10.4172/2157-7471.1000207
- Aiello, D., Carrieri, R., Guarnaccia, V., Vitale, A., Lahoz, E., Polizzi, G. (2015). Characterization and pathogenicity of *Colletotrichum gloeosporioides* and *C. karstii* causing preharvest disease on *Citrus sinensis* in Italy. *J. Phytopathol.* 163, 168–177. <https://doi.org/10.1111/jph.12299>
- Alemu, K., Ayalew, A., Woldetsadik, K. (2014). Evaluation of antifungal activity of botanicals for postharvest management of mango anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*). *International Journal of Life Sciences* 8 (1): 1-6. DOI: <https://doi.org/10.3126/ijls.v8i1.9957>
- Augustin, J. M., Kuzina, V., Andersen, S. B., and Bak, S. (2011). Molecular activities, biosynthesis and evolution of triterpenoid saponins. *Phytochemistry* 72 (6), 435–457. doi: 10.1016/j.phytochem.2011.01.015
- Baker, H. G. (1974). The evolution of weeds. *Annu. Rev. Ecol. Syst.* 5:1–24.
- Bailey, J., O`Connell, R., Pring, R., & Nash, C. (1992). Infection strategies of *Colletotrichum* Species.: *Colletotrichum: Biology, Pathology and Control* (Bailey JA y Jeger MJ,Eds.). CAB International Wallingford, 88-120.
- Bar-Joseph, M., Marcus, R., & Lee, R. F. (1989). The continuous challenge of Citrus tristeza virus control. *Annual Review of Phytopathology*, 27, 291–316 p. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.27.090189.001451>

- Bayaso, I., Nahunnaro, H., Gwary, D.M. (2013). Effects of aqueous extract of *Ricinus communis* on radial growth of *Alternaria solani*. African Journal of Agricultural Research 8 (37): 4541-4545 p. DOI: [10.5897 / AJAR11.259](https://doi.org/10.5897/AJAR11.259)
- Bazie, S., Ayalew, A., Woldetsadik, K. (2014). Antifungal activity of some plant extracts against (*Colletotrichum Musae*) the cause of postharvest banana anthracnose. Plant Pathol Microb. 5 (2): 4 p. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000226>
- Behnia, M., Javan-Nikkhahn, M., Aminian, H., Razavi, M., Alizadeh, A. (2016). Population structure and sexual fertility of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* from Citrus in Northern Iran. J. Agr. Sci. Tech. Vol. 18: 561-573 p.
- Bernstein, B., Zehr, E., Dean, R.A., Shabi, A. (1995). Characteristic of *Colletotrichum* from peach, apple, pecan, and other hosts. Plant Dis. 79:478.
- Bonfiglioli O, y M., M. (1990). El injerto en los árboles frutales, segunda Edición. Ediciones Ceeae, España p.p 5, 31.
- Brown, G.E. (1992). Factors affecting the occurrence of anthracnose on Florida citrus fruit. Proc. Int. Soc. Citricult. 3, 1044–1048.
- Caires, N., Pinho, D., Souza JSC, S. M., Lisboa, D., Pereira, O., & Furtada, G. (2014). First report of anthracnose on pepper fruit caused by *Colletotrichum scovillei* in Brazil. Plant Dis, 98-1437. <https://doi.org/10.1094/PDIS-04-14-0426-PDN>
- Campbell, C.W. (1991). Tahiti lime production in Florida. University of Florida. Florida Cooperative Service. EUA.
- Cannon, P.F., Damm, U., Johnston, P.R., Weir, B.S. (2012). *Colletotrichum* - current status and future directions. Stud Mycol 73: 181-213. <https://doi.org/10.3114/sim0014>
- Centis, S., Guillas, N., & Sejalón, M. (1997). Esquerré-Tugayé. Endopolygalacturonase Genes from *Colletotrichum*: Cloning of *clpg2* and Comparison of its Expression to that of *clpg1* During Saprophytic and

Parasitic Growth of the Fungus. *Molecular Plant Microbe Interactions*, 10, 769-775. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1997.10.6.769>

Chalfoun, N.R., Castagnaro, A.P., Díaz Ricci, J.C. (2011). Induced resistance activated by a culture filtrate derived from an avirulent pathogen as a mechanism of biological control of anthracnose in strawberry. *Biol. Control*. 58: 319-329. <https://doi.org/10.1016/j.biocontrol.2011.05.007>

Cheng, T., Xu, Ch., Lei, L., Li, Ch., Zhang, Y., Zhou, S. (2016). Barcoding the kingdom Plantae: new PCR primers for ITS regions of plants with improved universality and specificity. *Molecular Ecology Resources* 16, 138–149 p. <https://doi.org/10.1111/1755-0998.12438>

Citrus Page. Available online: <http://citruspages.free.fr> (Acceso el 30 de noviembre del 2020)

Coelho, M. V. S., Palma, F. R., Café-Filho, A. C. (2008). Management of strawberry anthracnose by choice of irrigation system, mulching material, and host resistance. *Int J. Pest Manage.* 54: 347:354. <https://doi.org/10.1080/09670870802419610>

CONABIO(2021).<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/asteraceae/ambrosia-confertiflora/fichas/ficha.htm> (Consultado el 17 de Julio, 2021)

Conway, W.S., Leverentz, B., Janisiewicz, W.J., Blodgett, A.B., Saftner, R.A., Camp, M.J. (2004). Integrating heat treatment, biocontrol, and sodium bicarbonate to reduce postharvest decay of apple caused by *Colletotrichum acutatum* and *Penicillium expansum*. *Postharvest Biol. Technol.* 34: 11-20. <https://doi.org/10.1016/j.postharvbio.2004.05.011>

Correll, D. S. y Johnston, M. C. (1970). *Manual of the Vascular Plants of Texas*. Texas Research Foundation. Renner, TX.

Cortes, M. (1990). *Fruticultura general*. Ed. Limusa. México.

Cronquist, A., Holmgren, A. H., Holmgren, N. H., Reveal, J. L., Holmgren, P. K. (eds.).(1994). *Vascular Plants of the Intermountain West*. Intermountain Flora 5: 1-496.

- Cruz-Fernández, M. (2007). Variedades de toronja para suelos arcillo limosos de la Huasteca Potosina. INIFAP-CIRNE. Campo Experimental San Luis. Sitio de negocios Huichihuayán. Folleto para productores núm. 10. San Luis Potosí, México. 22 p.
- Cruz-Laguna, B., Ortega-Acosta, S.A., Reyes-García, G., Toribio-Jiménez, J., Juárez-López, P., Guillén-Sánchez, D., Damián-Nava, A., Romero-Ramírez, Y., Palemón-Alberto F. (2020). *Colletotrichum gloeosporioides* causes anthracnose on grapefruit (*Citrus paradisi*) in Mexico. Australasian Plant Disease 15: 31. <https://doi.org/10.1007/s13314-020-00401-z>
- da Cruz Cabral, L., Fernández Pinto, V., and Patriarca, A. (2013). Application of plant derived compounds to control fungal spoilage and mycotoxin production in foods. Int. J. Food Microbiol. 166 (1), 1–14. doi: 10.1016/j.ijfoodmicro.2013.05.026
- Damm, U., Cannon, P.F., Woudenberg, J.H.C., Crous, P.W. (2012). The *Colletotrichum acutatum* species complex. Stud Mycol 73:37–113 p. DOI: 10.3114/sim0010
- Das, K., Tiwari, R.K., Shrivastava, D.K. (2010). Techniques for evaluation of medicinal plant products as antimicrobial agent: Current methods and future trends. Journal of Medicinal Plants Research, 4(2): 104-111. <https://doi.org/10.5897/JMPR09.030>
- Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu P. D., et al., (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. Mol. Plant Pathol. 13: 414-430. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00783.x>
- Doyle, J.J. (1990). Isolation of plant DNA from fresh tissue. Focus 12: 13–15.
- Douanla-Meli, C, Unger, J.-G. (2017). Phylogenetic study of the *Colletotrichum* species on imported citrus fruits uncovers a low diversity and a new species in the *C. gigasporum* complex, Fungal Biology, doi: 10.1016/j.funbio.2017.06.003.

- Dowling, M., Peres, N., Villani, S., Schnabel, G. (2020). Managing *Colletotrichum* on fruit crops: A “complex” challenge. *Plant Disease* 104: 2301-2316 p. <https://doi.org/10.1094/PDIS-11-19-2378-FE>
- Dupin, J., Smith, S. D. (2018). Phylogenetics of *Datureae* (*Solanaceae*), including description of the new genus *Trompettia* and re-circumscription of the tribe. *Taxon* 67 (2): 359-375 p. <https://doi.org/10.12705/672.6>
- Edgar, R.C. (2004). MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32: 1792-1797. <https://doi.org/10.1093/nar/gkh340>
- Elwakil, M.A., Awadallah, O.A., El-Rafai, I.M., El-Metwally, M.A., Mohammed, M.S. (2009). The use of bread yeast as a biocontrol agent for controlling seed-borne fungi of faba bean. *Plant Pathology Journal* 8 (4): 133-143 p. DOI: [10.3923 / ppj.2009.133.143](https://doi.org/10.3923/ppj.2009.133.143)
- Espinosa-Garcia, F. J. and J. Sarukhán. (1997). *Manual de malezas del Valle de México*. México, D.F. México: Universidad Nacional Autónoma de México/Fondo de Cultura Económica. 407 p.
- FAS (2019). <https://www.fas.usda.gov/data/citrus-world-markets-and-trade>. Acceso el 13 de Agosto del 2020
- FAS (2020). <https://usda.library.cornell.edu/concern/publications/w66343603?locale=en>. Acceso el 29 de Mayo del 2021.
- Feil, W.S., Butler, E.E., Duniway, J.M. and Gluber, W.D. (2003). The effects of moisture and temperature on the survival of *Colletotrichum acutatum* on strawberry residue in soil. *Can. J. Plant Pathol.* 25: 362-370 p. DOI: 10.1080 / 07060660309507091
- Ferreira, F.V., Herrmann- Andrade, A.M., Calabrese, C.D., Bello, F., Vázquez, D., Musumecí, M.A. (2020). Effectiveness of *Trichoderma* strains isolated from the rhizosphere of citrus tree to control *Alternaria alternata*, *Colletotrichum gloeosporioides* and *Penicillium digitatum* A21 resistant to pyrimethanil in post-harvest oranges (*Citrus sinensis* L. (Osbeck)). *Journal of Applied Microbiology*. DOI: 10.1111/jam.14657

- Field, B., Jordán, F., and Osbourn, A. (2006). First encounters—deployment of defence-related natural products by plants. *New Phytol.* 172 (2), 193–207. doi: 10.1111/j.1469-8137.2006.01863.x
- Freeman, S., Katan, T., & Shabi, E. (1996). Characterization of *Colletotricum gloeosporioides* isolates from avocado and almond fruits with molecular and pathogenicity test. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 62(3), 14-20 p. doi: 10.1128 / aem.62.3.1014-1020.1996.
- Freeman, S. (2008). Management, survival strategies, and host range of *Colletotrichum acutatum* on strawberry. *HortScience* 43: 66-68. DOI: 10.21273 / HORTSCI.43.1.66
- Freeman, S., Minz, D., Kolesnik, I., Bardul, O., Zveibil, A., Maymon, M., *et al.*, (2004). *Trichoderma* biocontrol of *Colletotrichum acutatum* and *Botrytis cinérea* and survival in strawberry. *Eur. J. Plant Pathol.* 110: 361-370.
- García-Martin, J. F., Olmo, M., García, J. M. (2018). Effect of ozone treatment on postharvest disease and quality of different citrus varieties at laboratory and at industrial facility. *Postharvest Biol. Technol.* 137(3):77-85. doi: 10.1016/j.postharvbio.2017.11.015.
- GBIF. <https://www.gbif.org/es/dataset/fa8ab13c-52ed-4754-b838-aeff74c79718> (Consultado en Noviembre, 2020)
- Gruiz, K. (1996). Fungitoxic activity of saponins: practical use and fundamental principles. *Adv. Exp. Med. Biol.* 404, 527–534. doi: 10.1007/978-1-4899-1367-8\_43
- Gómez-Cruz, M.A., Barrera-Gonzalez, A., García-Chavez, L.R., Echánova-Huacuja, F., Steffen-Riedemann, C. (1997). La agroindustria de naranja en México. Universidad Autónoma de Chapingo. 181 p.
- Guatum, A.J. (2014). *Colletotrichum gloeosporioides*: Biology, Pathogenicity and Management in India. *J Plant Physiol Pathol*, 2: 2-11 p. DOI: [10.4172 / 2329-955X.1000125](https://doi.org/10.4172/2329-955X.1000125)

- Guarnaccia, V., Groenewald, J.Z., Polizzi, G., Crous, P.W. (2017). High species diversity in *Colletotrichum* associated with citrus diseases in Europe. *Persoonia* (39): 32-50 p. <https://doi.org/10.3767/persoonia.2017.39.02De>
- Gurjar M.S., Ali S., Akhtar M., Singh K. S. (2012). Efficacy of plant extracts in plant disease management. *Agricultural Sciences*. 3 (3): 425-433 p. doi:10.4236/as.2012.33050.
- Hall, T.A. (1999). BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symp. Ser.* 41:95-98.
- Hernández-Ceja, A., Loeza-Lara, P.D., Espinosa-García, F.J., García-Rodríguez, Y.M., Medina-Medrano, J.R, Gutiérrez-Hernández, Ceja-Torres, L.F. (2021). *In vitro* antifungal activity of plant extracts on pathogenic fungi of blueberry (*Vaccinium* sp.). *Plants*. 10, 852 p. DOI: 10.3390 / plantas10050852
- Hernández-Soto, I., Prieto-Méndez, J., Madariaga-Navarrete, A., Campos-Montiel, R.G., Jiménez Alvarado, R., Hernández-Fuentes, A.D. (2020). Biological activity *in vitro* of the aqueous extract of *Argemone mexicana* L. in a phytopathogenic fungus: *Sclerotinia sclerotiorum*. *Boletín de Ciencias Agropecuarias del ICAP*, Vol. 6, No. 12: 12-14 p.
- Hu, H., Davis, M. J., and Bransky, R. H. (2013). Quantification of live *Candidatus Liberibacter asiaticus* populations using real-time PCR and propidium monoazide. *Plant Dis.* 97 (9): 1158-1167 p. DOI: [10.1094 / PDIS-09-12-0880-RE](https://doi.org/10.1094 / PDIS-09-12-0880-RE)
- Ibáñez, V., García-Usach, A., Carbonell-Caballero, J.,Alonso, R., Terol, J.,Dopazo, J.,Talon. (2015). El origen de las especies cultivadas de cítricos. *Levante agrícola* 2° trimestre. 4 p.
- Jackson, L.K. (1991). *Citrus Growing in Florida*. University of Florida Press. Gainesville, Florida.293 p.
- Johnson, K. A. (2018). Characterization and fungicide efficacy of North Carolina *Colletotrichum* populations causing *Glomerella* leaf spot and fruit rot on



Apple. M. S. thesis, North Carolina State University, Raleigh, NC.  
<http://www.lib.ncsu.edu/resolver/1840.20/36308>

- Karabulut, O.A., Baykal, N. (2004). Integrated control of postharvest diseases of peaches with a yeast antagonist, hot water and modified atmosphere packaging. *Crop Protection* 23, 431–435 p. DOI: 10.1016 / j.cropro.2003.09.012
- Karim, M., Jabeen, K., Iqbal S., Javaid, A. (2017). Bioefficacy of a common weed *Datura metel* against *Colletotrichum gloeosporioides*. *Planta Daninha* 35. <http://dx.doi.org/10.1590/s0100-83582017350100040>
- Kim, B.S., Hwang, B.K. (2007). Microbial fungicides in the control of plant diseases. *J. Phytopathol.* 155: 641-653. 10.1111 / j.1439-0434.2007.01314.x
- Kumar, S., Stecher, G., Li, M., Knyaz, C., and Tamura, K. (2018). MEGA X: Molecular evolutionary genetics analysis across computing platforms. *Mol. Biol. Evol.* 35:1547-1549 p. doi: 10.1093 / molbev / msy096.
- Leduc, A., Vernière, C., Boyer, C., Vital, K., Pruvost, O., Niang, Y., Rey, Y.J. (2011). First report of *Xanthomonas citri* pv. *citri* Pathotype a causing Asiatic citrus canker on grapefruit and mexican lime in Senegal. *Plant Disease* 95 (10):1311-1311p. <https://doi.org/10.1094/PDIS-03-11-0217>
- Liu, C., Liu, H., Hurts, J., Timko, M.P., Zhou, C.h. (2020). Recent advances on *Citrus yellow vein clearing virus* in Citrus. *Horticultural Plant Journal* 6 (4): 223-230 p. DOI: 10.1016/j.hpj.2020.05.001
- Lui, F., Weir, B.S., Damm, U., et al. (2015). Unravelling *Colletotrichum* species associated with *Camellia*: employing *ApMat* and GS loci to resolve species in the *C. gloeosporioides* complex. *Persoonia* 35: 63-86 p. doi: 10.3767 / 003158515X687597
- Lima, W.G., Spósito, M.B., Amorim, L., Gonçalves, F.P., de Filho, P.A.M. (2011). *Colletotrichum gloeosporioides*, a new causal agent of citrus post-bloom fruit drop. *Eur J Plant Pathol* 131(1):157–165 p. DOI 10.1007/s10658-011-9795-1

- Luna-Cavazos, M. Bye, R. (2011). Phylogeographic analysis of the genus *Datura* (*Solanaceae*) in continental Mexico. *Revista Mexicana de Biodiversidad* 82: 977-988 pp. <http://dx.doi.org/10.22201/ib.20078706e.2011.3.720>.
- Maas, J. L. (1998). *Compendium of strawberry diseases*, 2nd Ed. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.
- Mabberley, D.J. (2004). Citrus (*Rutaceae*): A review of recent advances in etymology, systematics and medical applications. *Blumea J. Plant Taxon. Plant Geogr*, 49, 481–498. DOI: [10.3767 / 000651904X484432](https://doi.org/10.3767/000651904X484432)
- Mahmud, T.M.M., Eryani-Raqeeb, A., Omar, S.R.S., Zaki, A.R.M., Al Eryani, A. (2008). Effects of different concentrations and applications of calcium on storage life and physicochemical characteristics of papaya (*Carica papaya* L.). *Am J Agric Biol Sci*. 3(3):526–533. DOI: <https://doi.org/10.3844/ajabssp.2008.526.533>
- Matias, R., Fernandes, V., Correa, B.O., Pereira, S.R., Morbeck, A.K. (2020). Phytochemistry and antifungal potential of *Datura innoxia* Mill. on soil phytopathogen control. *Biosci. J., Uberlandia* 36 (3): 691-701p. <http://dx.doi.org/10.14393/BJ-v36n3a2020-47881>
- Martínez, J., Gomez, A., Ramirez, C., Gil, J., Durango, D.(2019). Controlling anthracnose by means of extracts, and their major constituents, from *Brosimum rubescens* Taub. *Biotechnology Reports* 25. e0045: 8 p. <https://doi.org/10.1016/j.btre.2019.e00405>
- Martin-Felix, Y., Groenewald, J.Z., Cai, L., Chen, Q., Marincowitz, S., Barnes, I. K., Benchs, Braun, U., Camporesi, E., Damm, U., Beer, Z.W., Dissanayake, A., Edwards, J., Giraldo, A., Hernandez-Restrepo, M., Hyde, K.D., Jayawardena, R.S., Lombard, L., Luangsa-ard, Mctaggar, A.R., Rossman, A.Y., Sandoval-Denis, M., Shen, M., Shivas, R.G., Tan, Y.P., van der Linde, Wingfield, M.J., Wood, A.R., Zhang, J.Q., Zhang, Y., Crous, P.V. (2017). Genera of phytopathogenic fungi: GOPHY 1. *Studies In Mycology* 86: 99–216. <https://doi.org/10.1016/j.simyco.2017.04.002>
- Matuda, E. (1952).El género *Datura* en México. *Boletín de la Sociedad Botánica de México* 14: 1-13 p. DOI: [10.17129/botsoci.975](https://doi.org/10.17129/botsoci.975)

- Matušinský, P., Zouhar, M., Pavela, R., and Nový, P. (2015). Antifungal effect of five essential oils against important pathogenic fungi of cereals. *Ind. Crops Prod.* 67, 208–215. doi: 10.1016/j.indcrop.2015.01.022
- Maya-Ambía, C. J. (2017). Cítricos mexicanos en el mercado Japonés: experiencias y oportunidades para Sinaloa. *Méx. cuenca pac.* Vol. 6 no. 16 DOI: <https://doi.org/10.32870/mycp.v6i16.523>
- Ma, Z., Michailides, T.J. (2005). Advances in understanding molecular mechanisms of fungicide resistance and molecular detection of resistant genotypes in phytopathogenic fungi. *Crop prot.*24: 853-863. DOI: 10.1016 / j.cropro.2005.01.011
- McGovern, R.J., Seijo, T.E., Hendricks, K., Roberts, P.D. (2012) New report of *Colletotrichum gloeosporioides* causing postbloom fruit drop on citrus in Bermuda. *Canadian Journal of Plant Pathology* 34(2):187–194 p. <https://doi.org/10.1080/07060661.2012.670137>
- Menezes, H.D., Rodrigues, G.B., Teixeira, S.P., Massola, N.S., Bachmann, L., Wainwright, M., Braga, G.U. (2014). *In vitro* photodynamic inactivation of plant-pathogenic fungi *Colletotrichum acutatum* and *Colletotrichum gloeosporioides* with novel phenothiazinium photosensitizers. *Journals ASMorg*
- Meskin, M.S., Bidlack, W.R., Davies, A.J., Omaye, S.T. (2002). *Phytochemicals in nutrition and health*; CRC Press: Boca Raton, FL, USA ; 224 p.
- Morrissey, J. P., and Osbourn, A. E. (1999). Fungal resistance to plant antibiotics as a mechanism of pathogenesis. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 63 (3), 708–724. (80):1623-1632 p. doi: 10.1128 / MMBR.63.3.708-724.1999.
- Mushatq, S., Haider M.S. Ali, A., Javed, S., Khokhar, I., Mukhtar I. (2012). *In vitro* comparative screening of antibacterial and antifungal activities of some common weeds extracts. *Pak. J. Weed Sci. Res.* 18 (1): 15-25.
- Nash, D. L. y L. O. Williams (eds.). (1976). *Flora of Guatemala, Compositae. Part XII.* *Fieldiana Botany* 24: 96-97.

- Nxumalo, K.A., Aremu, A.O., Fawole, O.A. (2021). Potentials of medicinal plant extracts as an alternative to synthetic chemicals in postharvest protection and preservation of horticultural crops: A review. *Sustainability* 13, 33p. <https://doi.org/10.3390/su13115897>
- Oliver, J.E., Ali, M.E., Walihullah, S., Price, J., Warren, J., Jacobs, J., Hoppers, A., Evans, R., Dowdy, M., Curry, S. (2020). Huanglongbing, Caused by ‘*Candidatus Liberibacter asiaticus*,’ Detected in New Locations Across Southern and Coastal Georgia. *Plant Health Progress* 21:31–35 DOI: 10.1094/PHP-09-19-0064-S
- Orozco, M.G.M., Guzman, S., Farias, J., & Timmer, L. (2004). Crecimiento y cambios morfológicos de *Colletotrichum acutatum* Simmonds, agente causal de la antracnosis del limón mexicano (*Citrus aurantifolia* Christm. Swingle) incubado en diferentes medios de cultivo sólidos y líquidos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 22, 423-428.
- Páez, A. (1995). Comportamiento de variedades de mango a la antracnosis. *Fit. Col.* 19(1): 25-30.
- Payne, W. W. (1964). A re-evaluation of the genus *Ambrosia*. *Journal of the Arnold Arboretum* 45: 401-430.
- Pérez, C.A., Hernández, E. O., Drouaillet, B. E., Poot, W.A., Delgado, R., Rodríguez, R. (2019). Principales enfermedades en cítricos. *Rev. Mex. de Ciencias Agrícolas* 10 (7): 1653-1665 p. <https://dialnet.unirioja.es/servlet/articulo?codigo=7152662>
- Pérez-Mora, J.L., Mora-Romero, G.A., Beltrán-Peña, H., García- León, E., Lima, N.B., Camacho-Tapia, M., Tovar-Pedraza, J.M. (2020). First Report of *Colletotrichum siamense* and *C. gloeosporioides* causing anthracnose of *Citrus* spp. in México. *Plant Diseases*. Published online <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-20-1743-PDN>
- Peres, N. A. R., Souza, N. L., Peever, T. L., and Timmer, L. W. (2004). Benomyl sensitivity of isolates of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from citrus. *Plant Dis.* 88:125-130 p. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2004.88.2.125>

- Perfect, S., Hughes, H., O'Connell, R., & Gree, J. (1999). A model genus for studies on pathology and fungal-plant interactions. *Fungal Genet Biol.*, 27, 186-198. <https://doi.org/10.1006/fgbi.1999.1143>
- Picos-Muñoz, P. A., García-Estrada, R. S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A. and Allende-Molar, R. (2015). *Lasiodiplodia theobromae* en cultivos agrícolas de México: Taxonomía, hospedantes, diversidad y control. *Rev. Mex. Fitopatol.* 33(1):54-74. doi: 10.1007/s13225-014-0279-4.
- Piccirillo G., Carrieri R., Polizzi G., Azzaro A., Lahoz E., Fernández-Ortuño D., Vitale A. (2018). *In vitro* and *in vivo* activity of QoI fungicides against *Colletotrichum gloeosporioides* causing fruit anthracnose in *Citrus sinensis*. *Scientia Horticulturae* 236: 90-95 p. DOI: 10.1016/j.scienta.2018.03.044
- Praloran, J.C. (1977). Los agrios. Primera edición Ed. Blume. España, pag 483.
- Pretorius M.C., Le Roux H.F. (2017). Nematology in South Africa: A view from the 21st century (pp.311-324) DOI: 10.1007/978-3-319-44210-5\_13
- Prusky, D. (1996) Pathogen quiescence in postharvest diseases. *Annu. Rev. Phytopathol.* 34, 413–434.
- Qasem, J.R., Abu-Blan, H.A. (1995). Antifungal activity of aqueous extracts from some common weed species. *Ann. Appl. Biol.* 127: 215- 219.
- Qasem, J.R., Abu-Blan, H.A. (1996). Fungicidal activity of some common weed extracts againsts different plant pathogenic fungi. *Journal Phytopathology* 144: 157-161.
- Radosevich, S. R. and. Holt, J. S. (1984). *Weed ecology. Implications for vegetation management.* New York: Wiley-Interscience. 265 p.
- Rampersad, S. N., Perez-Brito, D., Torres-Calzada, C., Tapia-Tussell, R. and Corrington, C. V. (2013). Genetic Structure and Demographic History of *Colletotrichum gloeosporioides sensu lato* and *C. truncatum* Isolates from Trinidad and Mexico. *BMC Evol. Biol.*, 13: 130.

- Rahman, M., Islam, T., Schewegel, R., Louws, F.J. (2019). Simultaneous detection of *Colletotrichum acutatum* and *C. gloeosporioides* from quiescently infected strawberry foliage by Real-Time PCR based on high resolution Melt curve analysis. American Journal of Plant Sciences 10. 382-401 <http://www.scirp.org/journal/ajps>
- Read, D.A., Pietersen, G. (2015). Genotypic diversity of *Citrus tristeza virus* within red grapefruit, in a field trial site in South Africa. Eur J Plant Pathol.142 :531–545 p. DOI 10.1007/s10658-015-0631-x
- Reig Valor, C., Mesejo Conejos, C., Agusti Fonfria, M. (2020). Citricultura 3a ed. s.l., Editorial Paraninfo. 510 p.
- Rodríguez, S., Gonzáles, J., & Mayek, N. (2009). La infección de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz, y Sacc. en aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos bioquímicos y genéticos. Revista Mexicana de Fitopatología, Ciudad Obregón, 27(1), 53-63.
- Rajo-Báez, I., Álvarez-Rodríguez, B., García-Estrada, R.S., León-Félix, J., Sañudo-Barajas, A., Allende-Molar, R. (2017). Situación actual de *Colletotrichums* spp. en México: Taxonomía, caracterización, patogénesis y control. Rev. Mex. de Fitopatología, 35 (3): 549-570 p. <https://doi.org/10.18781/r.mex.fit.1703-9>
- Rosas-Burgos, E.C., Cortez-Rocha, M.O., Cinco-Moroyoqui, F.J., Robles-Zepeda, R.E., López-Cervantes, J., Sánchez-Machado, D.I., Lares-Villa, F. (2009). Antifungal activity *in vitro* of *Baccharis glutinosa* and *Ambrosia confertiflora* extracts on *Aspergillus flavus*, *Aspergillus parasiticus* and *Fusarium verticillioides*. World J Microbiol Biotechnol 25:2257–2261 p. DOI 10.1007/s11274-009-0116-1
- Rosa-Hernández, M., Wong-Paz, J.E., Muñoz-Márquez D.B., Carrillo-Inungaray, M.L., Sánchez-González J.M. (2016). Compuestos fenólicos bioactivos de la toronja (*Citrus paradisi*) y su importancia en la industria farmacéutica y alimentaria. Rev Mex Cienc Farm 47 (2): 22-35 p.

- Rzedowski, G. C. de y J. Rzedowski. (2001). Flora fanerogámica del Valle de México. 2a ed. Instituto de Ecología y Comisión Nacional para el Conocimiento y Uso de la Biodiversidad. Pátzcuaro, Michoacán, México.
- Salazar, S.M., Grellet, C.F. Chalfoun, N.R., Castagnaro, A.P., Díaz Ricci, J.C. (2013). Avirulent strain of *Colletotrichum* induces a systemic resistance in strawberry. Eur. J. Plant Pathol. Dordr. 135: 877-888.
- Sandoval-Denis, M. Lombard, L., Crous, P.W.(2019). Back to the roots: a reappraisal of *Neocosmospora*. *Persoonia* 43 90 - 185 p.  
DOI: <https://doi.org/10.3767/persoonia.2019.43.04>
- Santinoni, L. A., Silva, N. R., Córdoba, L.Z. (2012). Descripción de cultivares de pomelo (*Citrus paradisi* Macf.). Informe técnico, Estación Experimental Agropecuaria Catamarca.
- Sáenz-Pérez, C.A., Osorio-Hernández, E., Estrada-Drouaillet, B., Poot-Poot, W.A., Delgado-Martínez, R., Rodríguez-Herrera, R. (2019). Principales enfermedades en cítricos. Rev. Mex. de Ciencias Agrícolas 10 (7): 1653-1665 p. DOI: <https://doi.org/10.29312/remexca.v10i7.1827>
- Schilling, E., Randal C., Noyes, R.D., Rieseberg L.H. (1998). Phylogenetic Relationships in *Helianthus* (Asteraceae) Based on Nuclear Ribosomal DNA Internal Transcribed Spacer Region Sequence Data. Systematic Botany, 23 (2) :177-187 pp.
- Schwarzbach, A.E., Kadereit, J.W. (1999). Phylogeny of prickly poppies, *Argemone* (Papaveraceae) and the evolution of morphological and alkaloid characters based on ITS nrDNA sequence variation. Plant Syst. Evol. 218: 257-279 p.
- SENASICA. (2011). Cancro de los cítricos *Xanthomonas citri*. Ficha técnica No. 33.
- SIAP. (2017). Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. Atlas Agroalimentarios. Primera (Ed). México, DF.
- SIAP (2020) <https://nube.siap.gob.mx/cierreagricola/>. Acceso el 29 de Mayo del 2021.

- Silva, S. X. B., Soares, A. C. F., Almeida, D. O., Santos, H. P. and Laranjeira, F. F. (2015). Temporal patterns of citrus greasy spot-induced defoliation of sweet orange cultivars in Brazil. *Annals Appl. Biol.* 167(1):55-62. doi: 10.1111/aab.12208.
- Silva, J., Chaves, T., & Da Silva, A. (2017). Molecular and morpho-cultural characterization of *Colletotrichum* spp. associated with anthracnose on *Capsicum* spp. in northeastern Brazil. *Tropical Plant Pathology*, 42-315.
- Symon, D. and L. A. R. Haegi. (1991). *Datura* (*Solanaceae*) is a new world genus. In *Solanaceae* III: taxonomy, chemistry, evolution, J. G. Hawkes, R. N. Lester, M. Nee and N. Estrada (eds.). Academic Press, London. p. 197-210.
- Sreij, R., Dargel, C., Schweins, R., Prevost, S., Dattani, R., and Hellweg, T. (2019). Aescin-cholesterol complexes in DMPC model membranes: a DSC and temperature-dependent scattering study. *Sci. Rep.* 9 (1), 5542. doi: 10.1038/s41598-019-41865-z
- Srivastava, A. K. y Shirgure, P. S. (2018). Nutrient diagnostics and fertilizer prescription in Citrus: a perspective analysis. *J. Eco-friendly Agric.* 13(2):1-17.
- Staggemeier, V.G., Diniz-Filho, J.A., Forest, F., Lucas, E. (2015). Phylogenetic analysis in *Myrcia* section *Aulomyrcia* and inferences on plant diversity in the Atlantic rainforest. *Annals of Botany*, 115, 747–761.
- Stensvand, A., Børve, J., Talgø, V. (2017). Overwintering diseased plant parts and newly infected flowers and fruit as sources of inoculum for *Colletotrichum acutatum* in sour cherry. *Plant Dis.* 101: 1207-1213.
- Sutton, T.B., Aldwinckle, H.S., Agnello, A.M., Walgenbach, J.F. (2014). *Compendium of apple and pear diseases and pest.* American Phytopathological Society, St.Paul, MN.
- Talhinhas, P., Sreenivasaprasad, S, Olivera, H., Molecular, & Phenotypic. (2005). analyses reveal association of diverse *Colletotrichum acutatum* groups and a low level of *C. gloeosporioides* with olive anthracnose. *Applied and Environmental Microbiology*, Washington, 71(6), 2987-2998.



- Thembo, K.M., Vismer H.F., Nyazema N.Z., Gelderblom W.C.A., Katerere D.R. (2010). Antifungal activity of four weedy plant extracts against selected mycotoxigenic fungi. *Journal Applied Microbiology* 109: 1479-1486.
- Teshima, Y., Ikeda, T., Imada, K., Sasaki, K., El-Sayed, M. A., Shigyo, M., et al. (2013). Identification and biological activity of antifungal saponins from shallot (*Allium cepa* L. Aggregatum group). *J. Agric. Food Chem.* 61 (31), 7440–7445. doi: 10.1021/jf401720q
- Timmer, L. W., Brown, G. E., and Zitko, S. E. (1998). The role of *Colletotrichum* spp. in postharvest anthracnose of citrus and survival of *C. acutatum* on fruit. *Plant Dis.* 82:415-418.
- Timmer, L.W., Garnsey, S.M., Graham, J.H. (2000). Compendium of citrus diseases. 2nd edn. St Paul, MN: American Phytopathological Society Press.
- Trdá, L., Janda, M., Macková, D., Pospíchalová, R., Dobrev P.I., Burketová, L., Matušinský, P. (2019). Dual mode of the saponin aescin in plant protection: antifungal agent and plant defense elicitor. *Front. Plant Sci.* 10: 14 p. doi: 10.3389/fpls.2019.01448
- Udayanga D., Castlebury L.A., Rossman A.Y., Hyde K.D. (2014). Species limits in Diaporthe: molecular re-assessment of *D. citri*, *D. cytosporrella*, *D. foeniculina* and *D. rudis*. *Persoonia* 32: 83–101.
- University of California Riverside (UCR). (2018). Citrus variety collection. Tahiti lime *Citrus latifolia* (Yu. Tanaka) Tanaka. Riverside, EE. UU.: UCR. Recuperado de <https://citrusvariety.ucr.edu/citrus/tahiti.html>.
- Verdugo-Navarrete, C., Maldonado-Mendoza, I.E., Castro-Martínez, C., Leyva-Madrugal, K.Y., Martínez- Álvarez, J.C. (2021). Selection of rhizobacteria isolates with bioherbicide potential against Palmer amaranth (*Amaranthus palmeri* S. Wats.). *Brazilian Journal of Microbiology*. <https://doi.org/10.1007/s42770-021-00514-2>
- Vibrans, H. 2009. Malezas de México. CONABIO. *Argemone mexicana*. Consultado en julio de 2021 en:

<http://www.conabio.gob.mx/malezasdemexico/papaveraceae/argemone mexicana/fichas/ficha.htm>

- Villanueva, R., Hernández, A., Yáñez, M., Téliz, O., Mora, A., Cárdenas, E., & Castañeda, Á. (2005). Caracterización e identificación de *Colletotrichum fragariae* en frutos de chirimoya. *Agrociencia*, 39 (1).
- Villaseñor, J. L. (1989). Manual para la identificación de las *Compositae* de la Península de Yucatán y Tabasco. Rancho Santa Ana Botanic Garden Technical Report 4. Claremont, CA.
- Villaseñor Ríos, J. L. y F. J. Espinosa García. (1998). Catálogo de malezas de México. Universidad Nacional Autónoma de México. Consejo Nacional Consultivo Fitosanitario. Fondo de Cultura Económica. México, D.F.
- Villacís-Aldaz, L. A., León-Gordon, O., Santana-Mayorga, R., Mangui-Tobar, J., Carranza, G., Pazmiño-Miranda, P. (2017). Antifungal (*in vitro*) activity of plant extracts for the control of anthracnose (*Colletotrichum acutatum*). *J Selva Andina Biosph.*; 5 (1) :59-64 p.
- Walter, M., Braithwaite, B., Smith, B.J., Langford, G.I. (2008). Nutrient nitrogen management for disease control strawberry. *N. Z. Plant Prot.* 61: 70-79.
- Wang, W., de Silva, D., Moslemi, A., Edwards K., Ades, P.K., Crous, P.W., Taylor W.J. (2021). *Colletotrichum* species causing anthracnose of citrus in Australia. *Journal of Fungi* 7 (47): 24 p. <https://doi.org/10.3390/jof7010047>
- Waselkov, K.E., Boleda, A. S., Olsen, K.M. (2018). A phylogeny of the genus *Amaranthus* (*Amaranthaceae*) based on several low-copy. *Systematic Botany*, 43 (2): 439–458 pp.
- Webber, Herbert, J., Reuther, Walter and Lawton. (2004). "The citrus industry". Riverside, California: University of California Division of Agricultural Sciences
- Weir, B.S., Johnston, P.R., Damm, U. (2012). The *Colletotrichum gloeosporioides* species complex. *Studies in Mycology* 73: 115–180 p. DOI: 10.3114 / sim0011

- White, T.J., Bruns, T., Lee, S., Taylor, J. (1990). Amplification and direct sequencing of fungal ribosomal RNA genes for phylogenetics. *PCR Protocols: A Guide to Methods and Applications*, 18, 315–322.
- Wilcox, W.F., Gluber, W. D., Uyemoto, J.K. (2015). *Compendium of grape diseases, disorders, and pest*. American Phytopathological Society, St, Paul, MN.
- Wolters, B. (1966). On antimicrobial activity of plant steroids and triterpenes. *Planta Med.* 14, 392–399. doi: 10.1055/s-0028-1100066
- Xueping, L., Xiaoyang, Zhu., Nan, Z., Danwen, F., Jun, L., Wen, Ch., Weixin, Ch. (2013). *Postharvest Biology and Tecnology* 86: 437-446.
- Yan, H. X., Zhong, Y., Jiang, B., Zhou, B. R., Wu, B. and Zhong, G. G. (2017). Guanggan (*Citrus reticulata*) shows strong resistance to *Phytophthora nicotianae*. *Scientia Horticulturae.* 225 (12):141-149. doi: 10.1016/j.scienta.2017.06.068.
- Yuan QJ, Zhang B, Jiang D et al. (2015) Identification of species and materia medica within *Angelica* L. (*Umbelliferae*) based on phylogeny inferred from DNA barcodes. *Molecular Ecology Resources*, 15, 358–371.
- Zakaria, A., Baka, M., Mohamed, M., Mousa, A. (2020). *In vitro* and *in vivo*, biocontrol activity of extracts prepared from Egyptian indigenous medicinal plants for the management of anthracnose of mango fruits. *Archives of Phytopathology and Plant Protection.* 16 p. <https://doi.org/10.1080/03235408.2020.1794308>.
- Zhao, W., Gottwald, T., Bai, J. H., McCollum, G., Irely, M., Plotto, A. and Baldwin, E. (2016). Correlation of *Diplodia* (*Lasiodiplodia theobromae*) infection, huanglongbing, ethylene production, fruit removal force and pre-harvest fruit drop. *Sci. Hort.* 212(15):162-170. doi:10.1016/j.scienta.2016.09.032.
- Zhou, Y., Zhang, L., Zeng, K. (2016). Efficacy of *Pichia membranaefaciens* combined with chitosan against *Colletotrichum gloeosporioides* in citrus fruits and possible modes of action. *Biological control* (96) : 39-47 p.