



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO
PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES

EVALUACION DE EXTRACTOS DE HOJAS DE VID SILVESTRE
(*Vitis spp.*) SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.

TESIS

QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES

PRESENTA

ISELA APOLONIO RODRIGUEZ

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, estado de México, de Noviembre 2020.



UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DEL ESTADO DE MÉXICO

**PROGRAMA DE DOCTORADO EN CIENCIAS AGROPECUARIAS Y
RECURSOS NATURALES**

EVALUACION DE EXTRACTOS DE HOJAS DE VID SILVESTRE

(*Vitis* spp.) SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.

TESIS

**QUE PARA OBTENER EL GRADO DE DOCTORA EN CIENCIAS
AGROPECUARIAS Y RECURSOS NATURALES**

PRESENTA

ISELA APOLONIO RODRIGUEZ

COMITÉ DE TUTORES

Dr. OMAR FRANCO MORA. Tutor Académico

Dra. MARTHA LIDYA SALGADO SICLAN. Tutor Adjunto

Dr. JESÚS GAUDENCIO AQUINO MARTINEZ Tutor Adjunto

El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, estado de México, Noviembre de 2020.

CONTENIDO

DEDICATORIA	I
AGRADECIMIENTOS	II
RESUMEN.....	V
ABSTRACT.....	IX
1. INTRODUCCIÓN.....	1
2. REVISIÓN DE LITERATURA	4
2.1 Importancia <i>Botrytis cinerea</i> como hongo fitopatógeno	4
2.1.2 Clasificación taxonómica	4
2.1.3. Morfología.....	6
2.1.4. Sintomatología	6
2.1.5. Ciclo Biológico de <i>B. cinerea</i>	7
2.2. Proceso de infección de <i>B. cinerea</i>	9
2.2.1. Adhesión y germinación de esporas.....	9
2.2.2. Penetración	9
2.2.3. Infección	10
2.2.4. Dispersión.....	11
2.2.5. Sobrevivencia	11
2.3. Mecanismos patogénicos de <i>B. cinerea</i> en poscosecha.....	12
2.3.1. Rol de especies oxígeno reactivas (EOR).....	12
2.3.2. Proteínas extracelulares.....	12
2.4. Factores que afectan la patogenicidad de <i>B. cinerea</i>	13
2.4.1. pH	13
2.4.2. Luz	13
2.4.3. Temperatura.....	14
2.5. Madurez de frutos de fresa y su interacción con <i>B. cinerea</i>	14
2.6. Control de <i>B. cinerea</i>	15
2.6.1. Control químico.....	15

2.6.2. Fitoalexinas	16
2.6.3. Propiedades fúngicas de compuestos fenólicos	16
2.6.4. Control con extractos vegetales	17
2.7. La vid silvestre en México	18
2.7.1. Potencial farmacológico de la vid silvestre	18
3. MATERIALES Y MÉTODOS	20
3.1. Evaluación <i>in vitro</i>	20
3.1.1. Cepa fúngica	20
3.1.2. Obtención de extractos vegetales	21
3.1.3. Identificación de polifenoles	22
3.1.4. Actividad antifúngica	22
3.2. Evaluación <i>in vivo</i>	24
3.2.1. Material vegetal e inoculación	24
3.2.2 Evaluación poscosecha	25
3.3. Análisis estadístico.....	26
4. RESULTADOS	26
4.1 Inhibición <i>in vitro</i> de <i>Botrytis cinerea</i> con extractos de hojas de vid silvestre (<i>Vitis</i> spp.....	28
4.2. Extractos de hojas de vid silvestre (<i>Vitis</i> spp.) retrasan el decaimiento postcosecha por <i>Botrytis cinerea</i> en fresa.	43
5. DISCUSIÓN GENERAL.....	56
6. CONCLUSIONES GENERALES	60
7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	62
8. ANEXOS.....	79

RESUMEN

EVALUACION DE EXTRACTOS DE HOJAS DE VID SILVESTRE

(*Vitis* spp.) SOBRE EL CRECIMIENTO DE *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.

Isela Apolonio Rodríguez. Programa de Doctorado en Ciencias Agropecuarias y Recursos Naturales. Universidad Autónoma del Estado de México. Comité de Tutores: Dr. Omar Franco Mora, Tutor Académico; Dr. Jesús Gaudencio Aquino Martínez, Tutor Adjunto y Dra. Martha Lidya Salgado Siclán: Tutor Adjunto.

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario “El Cerrillo”, El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. C.P. 50200. Tel (722) 2965531.

Botrytis cinerea, agente causal del moho gris, es un patógeno que ataca a un amplio número de especies cultivadas, ocasionando pérdidas económicas importantes en campo y en poscosecha. Para su control, el uso de extractos vegetales con propiedades antifúngicas representa una alternativa amigable con el ambiente y la salud humana. En este sentido, la vid silvestre (*Vitis* spp.), con especies nativas presentes en México, posee compuestos fenólicos con potencial como agentes de control natural a enfermedades de plantas. El objetivo de este trabajo fue “Evaluar la actividad antifúngica de extractos de hojas de vid silvestre en el control de *B. cinerea*”. Para ello, se evaluó *in vitro* e *in vivo* la actividad antifúngica contra *B. cinerea* de extractos de hojas de las accesiones de vid silvestre, (1) P-178, originaria de Hueytamalco, Puebla, (2) E-200, originaria de Tejupilco y (3) TN-4, originaria de Tenancingo; provenientes del banco de germoplasma de vid silvestre en Zumpahuacán, México. En la evaluación *in vivo*, extractos de hojas de vid silvestre (EHVS) fueron evaluados a dosis de 6, 8 y 12% v/v. Comparativamente, se empleó resveratrol (RVS) (60, 90, 120 µg/mL), extracto de cítricos (EC) (3, 5 y 8% v/v) y cyprodinil + fludioxonil (SW) (500, 800 y 1000 µg/mL). Para conocer la efectividad de los EHVS sobre *B. cinerea*

se determinó el porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM), inhibición de la germinación conidial (IGC) e inhibición de la esporulación (IE) en cada tratamiento. Además se determinó el contenido de polifenoles presentes en cada una de las accesiones de vid silvestre.

SW inhibió el crecimiento micelial (ICM), esporulación (IE) y germinación conidial (IGC) en 88.9, 85.5 y 93.7% con respecto al control, respectivamente. RVS presentó el segundo mejor resultado. Todos los EHVS tuvieron acción inhibitoria, especialmente P-178 al 12% tuvo 72, 75 y 62% de inhibición de ICM, IE e IGC, respectivamente. Todas las concentraciones de EHVS de las tres accesiones presentaron ICM. P-178 12% mostró mayor ICM, superior al 70% en relación al control.

Como resultado de la determinación del contenido de polifenoles con propiedades antifungicas, en los EHVS de las tres accesiones se reportó la presencia de ácido gálico y ácido ferúlico, mientras que en P-178 se reportó la presencia de resveratrol. P-178 al 12% tuvo 19.9 mg/mL de compuestos fenólicos, RVS 1.7 mg/mL, ácido gálico 3.8 mg/mL y ácido ferúlico 2.5 mg/mL. La presencia de estos polifenoles en las accesiones de vid silvestre podría explicar el efecto inhibitorio de los EHVS sobre el desarrollo de *B. cinerea*.

La prueba *in vivo*, consistió en la evaluación de extractos de hojas frescas de vid silvestre mexicana contra *Botrytis cinerea* en fresa (*Fragaria × ananassa* (Duchesne ex Weston) Duchesne ex Rozier). Frutos de fresa 'Festival' se sumergieron 3 minutos en solución de extractos de hojas (7.2% w/v) de vid silvestre 'P-178', 'TN-4' o 'E-200', resveratrol (0.450 g L⁻¹), ácido gálico (0.450 g L⁻¹) y agua destilada (control). Cada fruto fue inoculado con 1 × 10⁶ conidias de *B. cinerea*, y posteriormente almacenado a 19°C y 70% de humedad relativa.

La evaluación poscosecha consistió en el análisis visual diario de cada uno de los tratamientos para determinar la presencia o ausencia de *B. cinerea*. Cada día, se contabilizaron todos los frutos enfermos presentes en cada repetición, así se determinó el porcentaje de frutos con síntomas de la enfermedad. De los frutos sin síntomas, se seleccionaron 10 para determinar la tasa de pérdida de peso fresco, contenido de sólidos solubles totales, acidez titulable y firmeza del fruto.

Como resultado de la incidencia de *B. cinerea* en frutos de fresa en poscosecha, se observó que cuatro días después de la inoculación (DDI) de estos, más del 50% de los frutos del control desarrollaron síntomas de la enfermedad y 6 DDI; todos los frutos control presentaron la enfermedad. Contrariamente, 8 DDI, menos del 25% de los frutos tratados con RVS desarrollaron la enfermedad, y alrededor del 40% de los frutos tratados con ácido gálico, extractos de hojas de las accesiones 'P-178' y 'E-200' presentaron síntomas de la enfermedad.

En relación a la calidad poscosecha de los frutos, durante los primeros 3 DDI la pérdida de peso del fruto fue similar en todos los tratamientos. Además, en los días 4 y 5 DDI la pérdida de peso de frutos en el control fue mayor comparada con la del resto de los tratamientos. RVS limitó el ablandamiento de las bayas, es decir, las bayas tratadas con RVS perdieron menos de 1 N de la firmeza inicial de la pulpa durante 8 días de almacenamiento, mientras que los frutos control perdieron aproximadamente 2.5 N durante los primeros 5 DDI. También, durante los primeros 5 días de almacenamiento la firmeza en las bayas tratadas con extractos de hojas de vid silvestre y ácido gálico fue entre 0.5 y 1 N menor que la de los frutos tratados con RVS y alrededor de 1.5 N sobre los frutos del control. La aplicación de extractos vegetales no afectó comercialmente el contenido de sólidos solubles totales; en los frutos control el contenido de SST fue de 8° Brix, en 5 días de almacenamiento, en el resto

de los tratamientos el valor máximo alcanzado fue de 7.5° Brix. En acidez titulable no hubo diferencias entre tratamientos.

Los resultados obtenidos en la prueba *in vitro* e *in vivo* sugieren la factibilidad de aplicar los extractos de hojas de vid silvestre de México para reducir la incidencia e infección de *B. cinerea*. Asimismo, estos extractos parecen ser una alternativa de bajo costo para mejorar la conservación poscosecha de la fresa, especialmente reduciendo el ablandamiento de la fruta.

Palabras clave: actividad fúngica, enfermedad poscosecha, compuestos fenólicos, resveratrol, calidad de fruta.

ABSTRACT

EVALUATION OF EXTRACTS OF WILD GRAPEVINE (*Vitis* spp.) LEAVES ON GROWTH OF *Botrytis cinerea* Pers.:Fr.

Isela Apolonio Rodríguez. Ph. D Program in Agriculture and Natural Resources. Universidad Autónoma del Estado de México. Ph D. Omar Franco Mora: Academic Advisor, Ph. D. Jesús Gaudencio Aquino Martínez: Member of the academic committee and Dra. Martha Lidya Salgado Siclán: Member of the academic committee.

Centro de Investigación y Estudios Avanzados en Fitomejoramiento. Facultad de Ciencias Agrícolas. Universidad Autónoma del Estado de México. Centro Universitario "El Cerrillo", El Cerrillo Piedras Blancas, Toluca, Estado de México. C.P. 50200. Tel (722) 2965529.

Botrytis cinerea, causal agent of gray mold, is a pathogen that attacks a large number of cultivated species, it causes significant economic losses in the field and postharvest. For its control, the use of plant extracts with antifungal properties represents an eco-friendly alternative as well as for human health. In this sense, the wild grapevine (*Vitis* spp.) grows naturally in Mexico, that plant has phenolic compounds with potential as disease control agents. The objective of this work was to "Evaluate the antifungal potential of wild grapevine leaf extracts on *B. cinerea* development". For this, the antifungal activity of leaf extracts of the wild grapevine accessions, (1) P-178, originally from Hueytamalco, Puebla, (2) E-200, originally from Tejupilco and (3) TN-4, originally from Tenancingo; all coming from the wild grape germplasm bank of Zumpahuacán, Mexico, were evaluated *in vitro* and *in vivo*. In the *in vivo* evaluation, wild grapevine leaf extracts (EHVS) were evaluated at doses of 6, 8 and 12% v / v. Comparatively, resveratrol (RVS) (60, 90, 120 µg / mL), citrus extract (EC) (3, 5 and 8% v / v) and cyprodinil + fludioxonil (SW) (500, 800 and 1000 µg / mL) were used.

In order to know the effectiveness of EHVS on *B. cinerea*, the percentage of mycelial growth inhibition (ICM), inhibition of conidial germination (IGC) and inhibition of sporulation (IE) in each treatment were determined. In addition, the content of polyphenols present in each of the accessions of wild grapevine was determined.

SW inhibited mycelial growth (ICM), sporulation (IE) and conidial germination (IGC) in 88.9, 85.5 and 93.7%, respectively. RVS presented the second best result. All EHVS had inhibitory action; especially, P-178 at 12% had 72, 75 and 62% of ICM, IE and IGC, respectively. All concentrations of EHVS of the three accessions presented ICM. P-178 12% presented higher ICM, higher than 70% in relation to control. EC inhibited no more than 25% mycelial growth.

As a result of the determination of the content of polyphenols with antifungal properties, in the EHVS of the three accessions the presence of gallic acid and ferulic acid was reported, whereas in P-178 the presence of resveratrol was reported. P-178 at 12% had 19.9 mg/mL of phenolic compounds, RVS 1.7 mg/mL, gallic acid 3.8 mg/mL and ferulic acid 2.5 mg/mL. The presence of these polyphenols in wild grapevines accessions could explain the inhibitory effect of EHVS on the development of *B. cinerea*.

The *in vivo* test consisted in the evaluation of fresh leaf extracts of Mexican wild grapevine against *Botrytis cinerea* in strawberries. 'Festival' strawberry fruits were immersed 3 minutes in a solution of leaf extracts (7.2% w/v) of wild grapevine 'P-178', 'TN-4' or 'E-200', resveratrol (0.450 g/L), gallic acid (0.450 g/L) and distilled water (control). Each fruit was inoculated with 1×10^6 conidia of *B. cinerea*, and subsequently stored at 19 °C and 70% of relative humidity.

The postharvest evaluation consisted of the daily visual analysis of each of the treatments to determine the presence or absence of *B. cinerea*. Each day, diseased fruit were counted to determine the percentage of fruits with symptoms of the disease. From the rest of the fruits without symptoms, 10 fruits were selected to determine the rate of fresh weight loss, total soluble solids content, titratable acidity and firmness.

As a result of the incidence of *B. cinerea* in postharvest strawberry fruits, it was observed that four days after inoculation (DAI), more than 50% of the control fruits developed symptoms of the disease, and 6 DAI all the control fruits presented the disease. In contrast, 8 DAI, less than 25% of the fruits treated with RVS developed the disease, and about 40% of the fruits treated with gallic acid, EHVS 'P-178' and 'E-200' presented symptoms of the disease.

In relation to the post-harvest quality of the fruits, during the first 3 DAI the weight loss of the fruit was similar in all treatments, also on day 4 and 5 DAI, the weight loss of fruits in the control was higher compared to the rest of the treatments. RVS limited the softening of the berries, that is, the berries treated with RVS lost less than 1 N of the initial firmness of the flesh during 8 days of storage, while the control fruits lost approximately 2.5 N during the first 5 DAI. In addition, during the first 5 day, the firmness in berries treated with EHVS and gallic acid was between 0.5 and 1 N less than those fruits treated with RVS and about 1.5 N over control fruits. Dipping in plant extracts had not affected strawberry commercial content of total soluble solids. In the control fruits the content of SST was 8 ° Brix, in 5 days of storage, in the rest of the treatments the maximum value reached was 7.5 ° Brix. In titratable acidity there were no differences among treatments.

The results obtained in the *in vitro* and *in vivo* test suggest the reliability of applying the EHVS of Mexico to reduce the dispersion and effective infection of *B. cinerea*. In addition, these extracts seem to be a low cost alternative to improve postharvest preservation of the strawberry, especially reducing the softening of the fruit.

Key words: Fungal activity, postharvest disease, phenolic compounds, resveratrol, fruit quality.

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Concentración de compuestos fenólicos en medio de cultivo avena agar adicionado con extractos de hoja de vid silvestre (<i>Vitis</i> spp).....	34
Cuadro 2. Actividad inhibitoria de diferentes tratamientos sobre crecimiento micelial (ICM), esporulación (IE) y germinación de la espora (IGC) de <i>Botrytis cinerea</i> <i>in vitro</i>	38

INDICE DE FIGURAS

Figura1. Aislado de <i>Botrytis cinerea</i> obtenido a partir de frutos de <i>Capsicum annuum</i>	35
Figura.2. Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en medio avena agar a los 8 días de la inoculación a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$	35
Figura. 3. Efecto de los extractos de hojas frescas de accesiones de vides silvestres de México, resveratrol y ácido gálico en la incidencia de <i>Botrytis cinerea</i> inoculada en fresa almacenada a 19°C y 70% de H. R	52
Figura.4. Efecto de los extractos de hoja fresca de accesiones de vides silvestres mexicanas, resveratrol o ácido gálico en el peso del fruto durante la vida postcosecha de fresa inoculada con <i>Botrytis cinerea</i>	54
Figura.5. Efecto de los extractos de hoja frescas de vides silvestres mexicanas, resveratrol o ácido gálico en el contenido de sólidos solubles totales durante la vida postcosecha de fresa inoculada con <i>Botrytis cinerea</i>	57

1. INTRODUCCIÓN

Botrytis cinerea Pers.: Fr. (Teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana* Whetzel.), agente causal de la pudrición gris, ataca un amplio rango de plantas en todo el mundo, ocasionado pérdidas económicas importantes en campo y en poscosecha (Piesik *et al.*, 2015). El método más empleado para el control de esta enfermedad es la aplicación de fungicidas sintéticos; sin embargo, algunos grupos de fungicidas, particularmente benzimidazoles y dicarboximidias han desencadenado el desarrollo de resistencia del patógeno (Panebianco *et al.*, 2015). Además, múltiples aplicaciones de los diferentes tratamientos de control químico en frutas y hortalizas pueden generar problemas a la salud del personal de campo agrícola y al consumidor, detención de exportaciones por residuos de plaguicidas, daños al ambiente y efectos perjudiciales a organismos benéficos para la agricultura (Yadav *et al.*, 2015). Por consiguiente, es necesario reemplazar el uso de sustancias tóxicas por alternativas naturales amigables con el ambiente y la salud humana (Enríquez-Guevara *et al.*, 2010).

Una de las diversas alternativas en el manejo integrado de enfermedades, es el uso de extractos vegetales de plantas, alternativas que han sido foco de estudios alrededor del mundo (Gholamnezhad, 2019). Estos productos además de ser económicos han demostrado ser eficaces para el control de enfermedades, por lo que se consideran candidatos para su uso como biopesticidas (Senhaji *et al.*, 2014). En este sentido, se ha reportado la actividad antifúngica de extractos de plantas de *Vitis*. Particularmente, un extracto de 800 ppm de zarcillos de *V. vinifera* inhibió completamente el crecimiento *in vitro* de *B. cinerea* (Fraternale *et al.*, 2015); en extractos de cáscara de una mezcla de tres cultivares chilenos de *V. vinifera* se reportó la mayor actividad antifúngica de ácido p-coumarico (98.5 µg/mL) y kaempferol (100.9 µg/mL) contra *B. cinerea* (Mendoza *et al.*, 2013). La capacidad

antifúngica de extractos del género *Vitis* está relacionada con la presencia de diversos compuestos con actividad antimicrobiana y antifúngica como rutin, quercetina, miricetina, ácido elágico, resveratrol, ácido p-coumarico, ácido cafeico y ácidos caftáricos entre otros (Schnee *et al.*, 2013). Asimismo, el resveratrol (RVS), compuesto presente en varios órganos de plantas *Vitis*, y su síntesis han sido relacionados con el incremento de la resistencia de las plantas contra *B. cinerea* (Salgado *et al.*, 2015). La característica de resistencia está relacionada con la metilación de grupos hidroxifenol de RVS (Adrian y Jeandet *et al.*, 2012). Además, diversos autores demuestran la efectividad de RVS sobre la inhibición de crecimiento micelial y germinación conidial de *B. cinerea* (Caruso *et al.*, 2011; Adrian y Jeandet, 2012; Salgado *et al.*, 2015).

México es centro de origen y dispersión del género *Vitis*, a la fecha se ha reportado la presencia de 28 especies silvestres. Actualmente, en la localidad de Zumpahucán, Estado de México existe un banco de germoplasma donde se han establecido varias accesiones de vides silvestres de esta región y de otros estados del centro de México (Sabás-Chávez *et al.*, 2016). Particularmente, la hoja de las especies silvestres de vid en el centro de México (*Vitis* spp.), al igual que la hojas de *V. vinifera*, presenta cantidades importantes de compuestos fenólicos (Franco *et al.*, 2012). Tobar-Reyes *et al.* (2009) menciona que de resveratrol se puede encontrar de 0.04 a 39.5 µg/g de peso fresco; además, reportó la presencia de ácido gálico, rutín y ácido cafeico. La presencia de compuestos fenólicos en hojas de vid silvestre indica el potencial como agentes de control natural de enfermedades en vegetales.

El presente trabajo de investigación se plantea el objetivo general de:
Evaluar la actividad antifúngica de extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.) en el control de *B. cinerea* *in vivo* e *in vitro*.

Los objetivos específicos son:

Evaluar el efecto *in vitro* de extractos vegetales de hojas de vid silvestre en el crecimiento micelial, germinación y esporulación de *B. cinerea*.

Evaluar el efecto *in vivo* de extractos vegetales de hojas de vid silvestre sobre la incidencia de *B. cinerea* en frutos de fresa en poscosecha.

Determinar el efecto de los extractos vegetales de hojas de vid silvestre sobre algunos parámetros de calidad poscosecha en frutos de fresa.

Hipótesis

Los extractos vegetales de hojas de vid silvestre tienen potencial antifúngico para ser usados como alternativa de control del hongo *B.cinerea* en fresa.

2. REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Importancia *Botrytis cinerea* como hongo fitopatógeno

Botrytis cinerea es un hongo con hábito necrotrófico que ataca a más de 500 especies de plantas, resultando en pérdidas económicas que van de \$10 mil millones a \$100 mil millones de dólares en todo el mundo (Li *et al.*, 2018). Este patógeno tiene impacto económico desastroso en varios cultivos económicamente importantes como la uva, fresa y el tomate rojo (*Solanum lycopersicum* L.) (Doehlemann *et al.*, 2017) y ha sido considerado como uno de los patógenos poscosecha más importante en frutas y verduras frescas (Zhang *et al.*, 2014). Además de su capacidad de crecer como saprofito sobre tejidos de plantas muertas o en descomposición, está presente en tallos, hojas, flores, bulbos, frutos y semillas. Puede desencadenar síntomas evidentes de enfermedad en el periodo previo a la cosecha o permanecer inactivo hasta el periodo posterior a la cosecha (Fillinger y Eland, 2016). Gracias a su importancia científica y económica, *B. cinerea* ha sido clasificado como el segundo patógeno mas importante de las plantas a nivel mundial después de *Magnaporthe oryzae* (Ascomiceta, *Pyricularia oryzae* Sacc.) (Li *et al.*, 2018).

2.1.2 Clasificación taxonómica

El género *Botrytis* se encuentra clasificado dentro de los hongos superiores, los cuales presentan micelio septado y quitina en la pared celular. Pertenece al orden Moniliales, indicando que las esporas asexuales se forman sobre las hifas y se encuentran libres en el ambiente; está ubicado en la subdivisión Deuteromycotina lo cual se refiere a hongos imperfectos u hongos asexuales (Agrios, 2004).

Fase sexual

Phylum: Ascomycota

Clase: Discomycetes

Orden: Heliales

Familia: Sclerotiniaceae

Género: *Botryotinia* (telomórfo)

Especie: *Botryotinia fuckeliana*

Nombre científico: *Botryotinia fuckeliana* Whetzel

Fase asexual

Phylum: Deuteromycota

Clase: Hyphomycetes

Orden: Moniliales

Familia: Moniliaceae

Género: *Botrytis* (anamorfo)

Especie: *Botrytis cinerea*

Nombre científico: *Botrytis cinerea* Pers.: Fr.

Adaptado de: Ten Have, 2000 (35)

2.1.3. Morfología

B. cinerea posee conidios multinucleados, hialinas o levemente coloreadas, unicelulares, ovoides o esféricas, sobre pequeños esterigmas en el extremo de conidióforos ramificados (Agrios, 2004). Los conidios son esporas asexuales, considerados como el principal inóculo producido y disperso (Holz *et al.*, 2004). *B. cinerea* aislado del cultivo de fresa presenta conidióforos grandes y gruesos (más o menos 10 µm de diámetro), de color café oscuro, ramificados en la parte distal, con ápices hinchados y pequeños esterigmas productores de conidios lisos, unicelulares, café claro, de elipsoides a ovoides de 10.8-19.6 x 5.9-9.8 µm (en promedio 13.0-7.4 µm) (Agrios, 2004). La adhesión y germinación de los conidios en la superficie de las plantas representan pasos cruciales que preceden a la penetración y colonización del huésped, mediante el cual se detectan y reconocen las características de la superficie del huésped, incluidas la hidrofobicidad y las fuentes de azúcar (Doehlemann *et al.*, 2017).

Las hifas son septadas ramificadas y forman variedad de estructuras de penetración, incluyendo apresorios que invaden la epidermis del tejido vegetal. Las hifas que crecen en la superficie de la planta, ramifican y forman agregados bulbosos de células (Barnett y Hunter, 1998). Además, las especies del género *Botrytis* producen esclerocios que actúan como estructuras de resistencia para proteger al patógeno de condiciones climáticas desfavorables. La producción, tamaño y forma de los esclerocios en cultivo y sobre sustratos naturales es variable (Zang *et al.*, 2016).

2.1.4. Sintomatología

B. cinerea induce amplia variedad de síntomas, los cuales no pueden ser generalizados a través de los órganos y tejidos vegetales (Blanco-Ulate *et al.*, 2016b). Las

hojas nuevas, recientemente expandidas, se infectan sin mostrar síntomas debido a que el hongo permanece inactivo (latente) en estos tejidos. Cuando las hojas infectadas maduran, al iniciar la senescencia, el hongo puede activarse y producir cubierta aterciopelada gris en las partes muertas de la hoja. Además, *B. cinerea* puede infectar flores y causar su pudrición (Elad *et al.*, 2007). Las flores sintomáticas muestran lesiones de color café en los pétalos, sepalos y en el receptáculo (Petrasch *et al.*, 2019).

En frutos que comienzan a expandirse, el patógeno se vuelve activo y causa pudrición seca, de color café en el extremo de la fruta donde se ubica el cáliz y también pudrición seca similar en las diferentes etapas de desarrollo del fruto (Bristow *et al.*, 1986). En campo, los frutos maduros con moho gris avanzado resultan en una cubierta de esporas como alfombra que se propagan por todo el fruto (Petrasch *et al.*, 2019). En poscosecha, *B. cinerea* ocasiona pudrición de vegetales, frutas y flores y produce prolíficos conidióforos grises típicos de la enfermedad (Williamson *et al.*, 2007). Bennett *et al.* (2020) encontró que en frutos de fresa almacenados en frío, el moho gris puede aparecer más blanco, debido a que el patógeno requiere luz para desarrollar el color gris de las esporas.

2.1.5. Ciclo Biológico de *B. cinerea*

B. cinerea es un hongo parasito facultativo, por lo que puede crecer ya sea como saprofito en tejidos necróticos o bien como parásito (Braun y Sutton, 1988). El ciclo de vida de este patógeno se ilustra en la Figura 1.

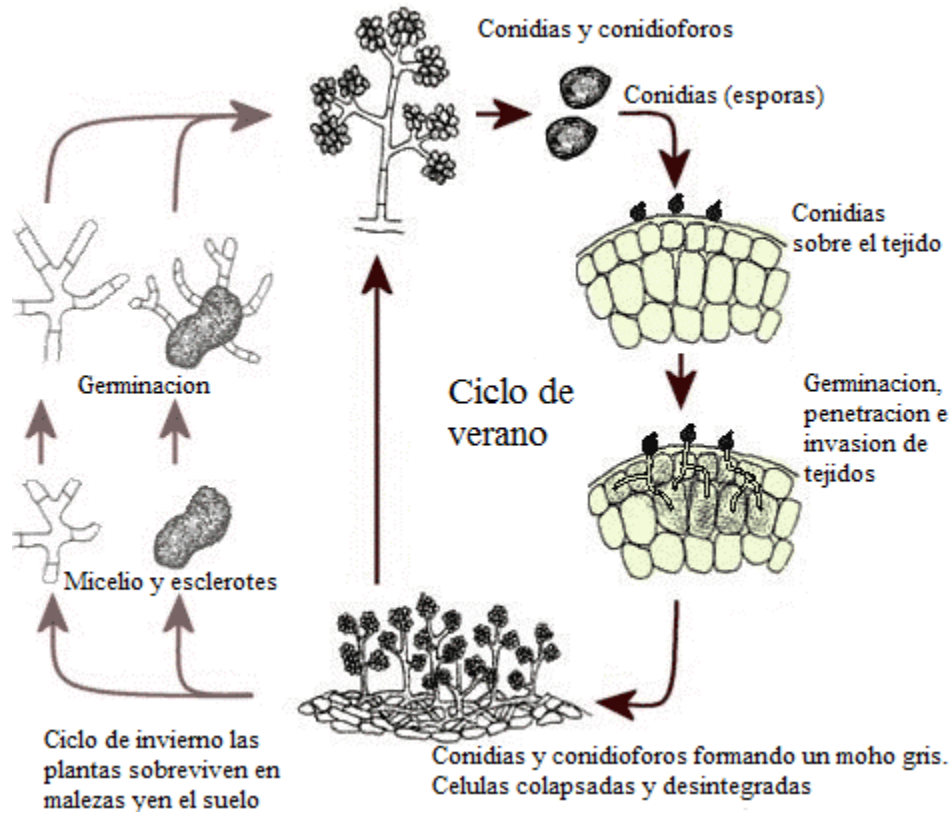


Figura 1. Ciclo de vida de *Botrytis cinerea* Pers. Ciclo de verano. Tomado de: Agrios, 2004.

Durante la época invernal es posible detectar al hongo en forma de micelio en tejido vegetal en descomposición, o como esclerocios. Pasado el invierno, el micelio crece y los esclerocios germinan para producir micelio, el cual produce conidióforos. Las conidias son liberadas desde los conidióforos hasta llegar al hospedero y bajo condiciones climáticas favorables, comienza el proceso de infección. Una vez que las conidias entran en contacto con el hospedero, éstas producen micelio, el cual invade el tejido provocando la desintegración de las células vegetales, el tejido se ablanda y pudre. El micelio en el tejido infectado vuelve a producir conidióforos y se liberan nuevas conidias. El proceso continúa y al invierno siguiente, el hongo vuelve al estado de hibernación (Agrios, 2004).

El hongo puede penetrar tejidos de la planta, principalmente por heridas a través de tejido muerto, generalmente flores, y posteriormente frutos; así, la enfermedad se inicia en tejido senescente, y una vez que el hongo se multiplica invade tejido juvenil (Bristow *et al.*, 1986). En tejidos afectados por pudrición, se producen nuevos conidióforos y conidias que completan el ciclo, volviendo a pasar la época estival en forma de micelio o esclerocios. La dispersión de los esclerocios depositados en el suelo o en restos vegetales se produce, principalmente, por labores culturales (Petrasch *et al.*, 2019).

2.2. Proceso de infección de *B. cinerea*

La infección o inoculación es el proceso mediante el cual un patógeno y su hospedero entran en contacto. En el caso de *B. cinerea* se produce cuando el conidio diseminado entra en contacto con el hospedero; también ocurre, cuando una superficie infestada con micelio entra en contacto con tejido sano (Elad *et al.*, 2007).

2.2.1. Adhesión y germinación de esporas

Durante la época invernal es posible detectar al hongo en forma de micelio en tejido vegetal en descomposición, o como esclerocios. Pasado el invierno, el micelio crece y los esclerocios germinan para producir micelio, el cual produce conidióforos. Los conidios son liberados desde los conidióforos hasta llegar al hospedero donde se adhiere y bajo condiciones climáticas favorables, comienza el proceso de infección (Bristow, 1986).

2.2.2. Penetración

La penetración en el tejido vegetal puede ser a través de heridas o de aberturas naturales, directamente mediante la participación de distintas actividades enzimáticas o mediante la intervención de diversos procesos mecánicos (incluyendo la diferenciación de

estructuras de penetración en algunos sistemas) (Choquer *et al.*, 2007). En las etapas tempranas del proceso de infección, los hospederos generalmente desencadenan procesos oxidativos que generan grandes cantidades de especies oxígeno reactivas (EOR) para contrarrestar al patógeno invasivo (Schumacher, 2016). Por otra parte, para lograr la degradación de la estructura de los polisacáridos de la pared celular, es necesario que *B. cinerea* secrete una serie de enzimas (Wubben *et al.*, 2000). Enzimas como cutinasa, la cual hidroliza a los polímeros de la cutina para permitir la penetración del patógeno; endo y exopoligalacturonasa (bcpg1 y bcpg2) que actúan en la infección primaria y expansión de la lesión; pectinliasas (PLs) y pectinmetilesterasas (PMEs) que inducen la desmetilesterificación de los poligalacturonanos de la pared celular. Además de la producción de metabolitos fitotóxicos no específicos (botrioidales y botcinólidos) (Williamson *et al.*, 2007)

2.2.3. Infección

La enfermedad puede manifestarse en forma sintomática o latente. La infección sintomática corresponde a la infección común, en la cual el patógeno ha penetrado directamente o por heridas (Feliziani y Romanazzi, 2016). La infección latente o asintomática es aquella en la que el patógeno ha cesado de estar agresivo temporalmente o permanentemente y los síntomas no están presentes. Los mecanismos que conducen a infecciones inactivas aún no se entienden completamente pero se sabe que las proantocianinas (AP) parecen inducir la inactividad de *B. cinerea* en frutos inmaduros de fresa al restringir la actividad de enzimas fúngicas como las poligalacturonasas (PG) que son necesarias para la infección (Petrasch *et al.*, 2019).

Las infecciones también pueden ser el resultado de la anidación, que corresponde a la penetración directa del micelio que crece en los órganos vegetales vecinos, como las hojas y los frutos infectados (Braun y Sutton, 1988). En frutos maduros de fresa, la fase necrotrófica puede desencadenarse por cambios en la composición bioquímica de los tejidos asociados con el proceso de maduración, como el aumento del contenido de azúcar, la producción de volátiles y la alteración de las defensas de las plantas (Neri *et al.*, 2015). Estas modificaciones promueven no solo el crecimiento de hongos sino también la susceptibilidad del huésped, a través de la liberación de ácido oxálico y el flujo de toxinas (Prusky y Lichter, 2007).

2.2.4. Dispersión

En clima húmedo, *B. cinerea* libera fácilmente sus conidios y éstos son diseminados por el viento (Agrios, 2004; Araujo *et al.*, 2005). La lluvia por salpicado, tiene también importancia en la liberación y diseminación de los conidios al interior del invernadero, los conidios son liberados al ambiente por un mecanismo higroscópico asociado a un cambio rápido en la humedad relativa (Latorre y Rioja, 2002).

2.2.5. Sobrevivencia

B. cinerea puede sobrevivir como saprófito en gran número de plantas cultivadas y malezas, o en materia orgánica en descomposición (Araújo *et al.*, 2005). Los conidios pueden sobrevivir por más de 14 meses en almacenamiento, aunque disminuye su viabilidad (Carisse, 2016); sin embargo, sobre el suelo no son capaces de lograrlo. En el suelo, el hongo hiberna en forma de esclerocios producidos sobre restos orgánicos acumulados luego de cosechar las flores, o de micelio que se desarrolla en restos de plantas en proceso de descomposición (Elad *et al.*, 2007).

2.3. Mecanismos patogénicos de *B. cinerea* en poscosecha

2.3.1. Rol de especies oxígeno reactivas (EOR)

En la etapa temprana de la infección, los hospederos generalmente desencadenan procesos oxidativos que generan grandes cantidades de EOR para contrarrestar el patógeno invasivo (Mellersh *et al.*, 2002; Tian *et al.*, 2013). Sin embargo, como hongo necrotrófico, *B. cinerea* puede interrumpir los procesos oxidativos e incluso contribuir al mismo produciendo su propio EOR. Se sabe que las unidades catalíticas BcNoxA y BcNoxB derivadas de las EOR son responsables de la patogenicidad y la formación de esclerocios, que permiten que los hongos sobrevivan en condiciones ambientales adversas y son fundamentales para la reproducción sexual (Siegmund *et al.*, 2015).

2.3.2. Proteínas extracelulares

Es necesario que *B. cinerea* secrete enzimas que degraden los polisacáridos estructurales de la pared celular del huésped. Entre las enzimas que han sido confirmadas por tener función en la patogenicidad de *B. cinerea* se encuentran dos endopoligalacturonasas (BcPG1 y BcPG2) involucradas en la virulencia del patógeno. Se conoce que el gen Bcpg1 no es necesario para la infección primaria, pero es necesario para una mayor colonización en manzana (*Malus domestica* Borkh.) y tomate (Ten Have *et al.*, 1998); mientras que, Bcpg2 afecta tanto la infección primaria como la expansión de la lesión en tomate y frijol ancho (*Phaseolus vulgaris* L.) (Kars *et al.*, 2005a). Además, la endo- β -1,4-xilanasas (BcXYN11A), que degrada el contenido de xilano de la pared celular tienen un efecto pronunciado sobre la virulencia (Brito *et al.*, 2006). La pectinmetilesterasa induce desmetilesterificación de los componentes de la pared celular (Kars *et al.*, 2005b). La cutinasa tiene el potencial de

hidrolizar la cutina, lo que facilita la penetración del patógeno a través de la cutícula (Van Kan *et al.*, 1997).

2.4. Factores que afectan la patogenicidad de *B. cinerea*

2.4.1. pH

El pH es un factor ambiental importante que afecta la interacción entre *B. cinerea* y sus huéspedes. Las frutas generalmente presentan pH que oscila entre 3.32 y 4.39; mientras que las hojas, los tallos y las raíces exhiben pH más alto que fluctúa entre 5.81 y 6.3 (Manteau *et al.*, 2003). La identificación de proteínas a pH 4 demostró que la mayoría de las proteínas identificadas eran proteasas, mientras que a pH 6 eran enzimas degradadoras de pared celular (CWDE) (Li *et al.*, 2012). Los hongos suelen utilizar las proteasas para degradar la células estructurales de la planta o las proteínas antifúngicas secretadas por la planta huésped (Have *et al.*, 2004); las enzimas degradadoras son esenciales para que los hongos descompongan la pared celular de la planta para lograr la virulencia completa (Kubicek *et al.*, 2014).

2.4.2. Luz

Botrytis cinerea es una cepa sensible a la luz, así, detecta activamente las condiciones de luz para ajustar su desarrollo y patogenicidad (Zhang *et al.*, 2016). La luz es una señal de desarrollo esencial para *B. cinerea*, ya que desencadena exclusivamente la formación de conidios, mientras que en oscuridad constante inicia únicamente la formación de esclerocios (Fillinger y Elad, 2016). Zhang *et al.* (2016) menciona que los conidios formados por *B. cinerea* en la oscuridad fueron mayores que los producidos en la luz.

2.4.3. Temperatura

B. cinerea presenta temperaturas de desarrollo óptimo entre 15-25°C, sin embargo, el patógeno es también activo a temperaturas más bajas. Así, la germinación de los conidios y el crecimiento micelial puede ocurrir a temperaturas tan bajas como 0°C. En condiciones favorables, una infección completa el ciclo puede ocurrir en 3 a 4 días dependiendo del tipo de tejido atacado (Fernandez *et al.*, 2014). Ciliberti *et al.* (2015) mencionan que en bayas maduras de fresa la infección ocasionada por conidios de *B. cinerea* fue favorecida con temperaturas de 15 a 25°C. Por el contrario, con temperaturas de 5, 10 y 30°C los niveles de infección por el patógeno fueron bajos. Además, el micelio creció rápidamente sobre bayas infectadas a 21°C y 94% de humedad relativa.

2.5. Madurez de frutos de fresa y su interacción con *B. cinerea*

La maduración de los frutos está asociada con el desmontaje de las paredes celulares de la fruta, lo que conduce al ablandamiento de los tejidos. La degradación de la pared celular beneficia a *B. cinerea*, ya que reduce las barreras mecánicas para la infección y la propagación, provocando la presencia de heridas para la entrada de patógenos y proporciona al hongo acceso a azúcares simples como fuente de carbono (Blanco-Ulate *et al.*, 2016; Brummel y Harpster, 2001). La solubilización de la pared celular ocurre con el desarrollo del fruto cuando las paredes comienzan a hincharse y está correlacionada con aumento en el contenido de azúcar de la fruta, como resultado de la descomposición del polisacárido (Knee *et al.*, 1977). El grado de solubilización y despolimerización de la pectina está muy relacionado con la firmeza del fruto de fresa (Rosli *et al.*, 2004). Santiago-Domenech *et al.*, (2008) mencionan que el silenciamiento del gen de pectinliasa endógena (PL) en fresa resultó en frutos con mayor firmeza externa e interna, principalmente debido a la baja solubilización

de pectina, paredes celulares más rígidas y mayor adhesión de célula a célula. Además de PL, otras enzimas que pueden afectar la firmeza de la fresa son PG, β -galactosidasas, endoglucanasas, α -arabinofuranosidasas y β -xilosidasas (Figuroa *et al.*, 2010).

2.6. Control de *B. cinerea*

El control de *B. cinerea* es complicado debido a su amplio número de hospederos, varias formas de ataque y etapas tanto sexuales como asexuales para sobrevivir en condiciones favorables o desfavorables (Fillinger y Elad, 2016). Hasta la fecha, los principales medios para controlar la podredumbre por *B. cinerea* incluyen control químico, uso de compuestos naturales de plantas vegetales, inductores de resistencia y control biológico (Elad *et al.*, 2007).

2.6.1. Control químico

La aplicación de fungicidas sintéticos para el control de enfermedades en campo y postcosecha causadas por *B. cinerea* es el método principal de control en la producción. Existen cinco categorías de fungicidas, respectivamente, que actúan sobre la respiración, montaje de microtúbulos, osmoregulación, biosíntesis de esteroides y aquellos cuyos efectos pueden ser revertidos por la metionina (Romanazzi *et al.*, 2016). Sin embargo, existen dos problemas principales en la aplicación de fungicidas. Por un lado, *Botrytis cinerea* presenta mutaciones y recombinaciones genéticas derivadas de la heterocariosis (conidios multinucleados) y de la reproducción sexual, y por otra parte, las modificaciones en el modo acción de los fungicidas. Frecuentemente se descubren cepas resistentes a diferentes categorías de fungicidas (Pokorny *et al.*, 2016). Por ejemplo, se observó que *Botrytis cinerea* desarrollaba cepas resistentes cuando se usan por primera vez los fungicidas bencimidazoles, dicarboximidias, anilino-pirimidinas y quinonas (Panebianco *et al.*, 2015; Pokorny *et al.*,

2016). Mercier *et al.* (2010) al evaluar cuatro fungicidas a dosis de 50 mg/L en 65 aislamientos de *B. cinerea* de la costa de California, encontraron 25% de resistencia para fenhexamid, 28% a cyprodinil/fludioxonil, y 66% a bocalid/pyraclostrobin.

Por otro lado, la aplicación de fungicidas sintéticos es costosa, ya que el control de *B. cinerea* generalmente requiere dosis más altas que otros patógenos fúngicos. El control de *B. cinerea* y especies relacionadas representan aproximadamente 8% del costo total de los fungicidas del mercado mundial y los gastos globales anuales superan los mil millones de euros (Fillinger y Elad, 2016). Además, los efectos nocivos para el ambiente y la salud humana de los plaguicidas químicos en general han supuesto la regulación de su uso por parte de los estados y han provocado rechazo por parte de los consumidores (Yadav *et al.*, 2015).

2.6.2. Fitoalexinas

La resistencia de las plantas al ataque de microorganismos causantes de enfermedades está relacionada con la presencia de barreras físicas y químicas de defensa. Entre las barreras químicas, destacan las fitoalexinas, sustancias fungitóxicas sintetizadas por las plantas principalmente después de la invasión o el contacto de sus tejidos con microorganismos. Estas sustancias incluyen varios grupos de compuestos naturales como terpenos, compuestos fenólicos, isoflavonoides y poliacetilenos. La acumulación de fitoalexinas puede ser inducida por organismos vivos, productos (elicitores) o agentes, productos químicos; como sales de metales pesados, y físicos (congelación, lignificación, etc) (Montes-Belmont, 2009).

2.6.3. Propiedades fúngicas de compuestos fenólicos

Diversas investigaciones demuestran la actividad antifúngica que algunos flavonoides, diterpenoides, sesquiterpenoides, monoterpénoides, estilbenos, glicoalcaloides

esteroideos y tri-terpenoides tienen contra *B. cinerea* (Soylu *et al.*, 2010). Estudios realizados con diferentes compuestos fenólicos indican su potencial como agentes de control de enfermedades. Tao *et al.* (2010) reportaron que el ácido gálico mostró inhibición fuerte y lineal ($r = -0.95$) sobre la germinación de esporas de *B. cinerea*. Por otra parte, al evaluar una emulsión bioactiva de compuestos fenólicos contra *B. cinerea*, el ácido ferúlico (0.085% m/v) resultó altamente efectivo contra el crecimiento del hongo (Patzke y Schieber, 2018). También el RVS ha sido reportado como compuesto activo contra diferentes hongos fitopatógenos en el cultivo de la vid, i. e. *Erysiphe necator* (Schwein) Burrill; anamorfo *Oidium tuckeri* (Berk.), *Plasmopara viticola* (Berk. & M.A. Curtis) Berl. & De Toni y *B. cinerea* (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013). Adrian y Jeandet (2012) indicaron que RVS, a 60 $\mu\text{g/mL}$, ocasionó disrupción de la membrana de los conidios de *B. cinerea*. Salgado *et al.* (2015) mencionan que el crecimiento micelial de *B. cinerea in vitro* se inhibió entre 50 y 70% por acción de RVS. Además, al evaluar la efectividad, de manera separada de RVS y tres compuestos relacionados con éste, (E)-4,5-trimethoxy- β -(2-furyl)-estireno, (E)-4-methoxy- β -(2-furyl)-estireno y (E)-3,5-dimethoxy- β -(2-furyl)-estireno a 100 $\mu\text{g/mL}$, se logró inhibir 70% de la germinación de conidios de *B. cinerea* (Caruso *et al.*, 2011).

2.6.4. Control con extractos vegetales

Varios extractos vegetales han sido evaluados contra *B. cinerea*. Mendoza *et al.* (2013) reportó que los ácidos p-coumarico (98.5 $\mu\text{g/mL}$) y kaempferol (100.9 $\mu\text{g/mL}$) presentes en extractos de cáscara de una mezcla de tres cultivares chilenos de *V. vinifera* presentaron la mayor actividad antifúngica contra *B. cinerea*. Asimismo, extractos acuosos de *Asteriscus imbricatus* (Cav.) DC. a 20000 ppm inhibieron completamente el crecimiento de *B. cinerea* (Senhaji *et al.*, 2014). Por otra parte, extractos de neem (*Azadirachta indica*

A.Juss) evaluados *in vitro* e *in vivo* inhibieron la germinación de esporas en 17.4 y 20.8% con extractos metanólicos y acuosos, respectivamente (Gholamnezhad, 2019).

2.7. La vid silvestre en México

En México se ha reportado la presencia de 24 especies de vides, *V. arizonica* (Engelm), *V. biformis* (Rose), *V. cinerea* ((Engelm.) Engelm. Ex Millardet), *V. tiliifolia* (Humb & Bonpl. Ex Schult.), *V. berlandieri* (Planch.), *V. bourgaeana* (Planch.), *V. popenoei* (J.L. Fennell), *V. rotundifolia* (Michx.), *V. peninsularis* (M.E.Jones), *V. blancoi* (Munson) *V. acerifolia* (Raf.), *V. aestivalis* (Michx.), *V. arizonica* (Engelm.), *V. bloodwothiana* (Comeaux), *V. girdiana* (Munson), *V. incisa* (Jacq.), *V. indivisa* (Willd.), *V. jaegeriana* (Comeaux), *V. labrusca* (L.), *V. linsecomii* (Buckey), *V. monticola* (Bucley), *V. mustangensis* (Bucley), *V. nesbittiana* (Comeaux), *V. rupestris* (Scheele) (Ánonimo, 1973; Sabás-Chávez *et al.*, 2018). Su crecimiento se ha observado desde el nivel del mar hasta 2540 de altitud, en los estados de México, Morelos, Puebla, Veracruz, Tamaulipas y Tabasco. La temperatura media de las regiones en donde naturalmente crecen las vides, especialmente las del centro-sur de la República, varían de 14°C en los climas templados de Tezuitlán, Puebla y partes altas de Temascaltepec, Edo. de México, hasta los 26°C en los climas cálidos de San Antonio Cañada, Puebla y Paraiso, Tabasco (Franco *et al.*, 2012).

2.7.1. Potencial farmacológico de la vid silvestre

En cuanto al potencial farmacológico, las plantas de las vides silvestres producen abundante cantidad de productos naturales de bajo peso molecular. La mayoría de estos compuestos desempeñan un papel importante en la defensa que presentan las plantas ante infecciones o condiciones que inducen estrés. Dos agentes antimicrobianos corresponden a moléculas secundarias fitoanticipinas y fitoalexinas (Boriello *et al.*, 2010).

La hoja de las especies silvestres de vid del centro de México (*Vitis* spp.), al igual que las hojas de *V. vinifera*, presenta cantidades importantes de compuestos fenólicos (Franco *et al.*, 2012). Tobar-Reyes *et al.* (2009) mencionan que de RVS se pueden encontrar de 0.04 a 39.5 $\mu\text{g/g}$ de peso fresco; además, determinaron la existencia de ácido gálico, rutín y ácido caféico.

3. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Evaluación *in vitro*

3.1.1. Cepa fúngica

Se colectaron frutos de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) con síntomas de pudrición gris, en el Centro de Investigación y Transferencia de Tecnología (CITT) “Rancho El Islote”, del Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), localizado en Villa Guerrero, Estado de México a 18° 58’ 04’’ latitud norte y 99° 39’ 21’’ longitud oeste y a 2199 msnm. Posteriormente, en el Laboratorio de Fitopatología del ICAMEX se tomaron fragmentos de aproximadamente 5 × 5 mm de tejido de los frutos enfermos, los cuales se desinfectaron con hipoclorito de sodio al 1% (v/v) por 3 min, se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces, se secaron en papel filtro y se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo avena-agar (MCAvA) acidificado con ácido láctico al 25 % (v/v), a pH 4.5 y se incubaron a 26 ± 2°C durante 8 días. Posteriormente, usando la técnica de punta de hifa, una porción de tejido micelial se transfirió a otra caja de Petri con MCAvA, con la finalidad de obtener una cepa pura del hongo. Para comprobar la patogenicidad de los aislamientos se inocularon frutos sanos de fresa cv. Festival, previamente desinfectados como se describió anteriormente. A los frutos se les ocasionaron tres heridas, de aproximadamente 2 mm de diámetro por 2 mm de profundidad, con agujas de disección previamente esterilizadas. En dichas heridas se depositaron 20 µL de una suspensión de 1 × 10⁶ conidios por mililitro. Una vez que se observaron los síntomas típicos de pudrición gris, se procedió a la identificación del hongo comparando las estructuras morfológicas observadas (tipo y color de la colonia, septación del micelio, conidióforos, ramificación de conidióforos, largo y ancho de conidios) con las

claves de Barnett y Hunter (1998); mientras que para la determinación de la especie se emplearon las descripciones especializadas de Ellis (1971) y Crous *et al.* (2007).

Adicionalmente, se enviaron muestras del hongo al Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del Colegio de Postgraduados, Montecillo, México, en donde se analizaron molecularmente. La secuencia ITS obtenida del hongo se comparó con secuencias de organismos referencia con mayor similitud, por medio de una búsqueda en la base de datos BLAST del GenBank® (National Institutes of Health, Bethesda, MD, USA). Una vez comprobada la especie, el hongo fue cultivado para realizar las pruebas del presente experimento.

3.1.2. Obtención de extractos vegetales

Se obtuvieron hojas sanas y uniformes en tamaño y color (Franco *et al.*, 2012) de tres accesiones de vid silvestre: (1) E-200, originaria de Tejupilco, Estado de México, (2) TN-4, originaria de Tenancingo, Estado de México y (3) P-178, originaria de Hueytamalco, Puebla; todas establecidas en el banco de germoplasma de vid silvestre de Zumpahuacán, México. El tejido vegetal se trasladó al Laboratorio de Horticultura de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México; en donde se maceraron 200 g de hojas por accesión en 250 mL de metanol al 99%; esta mezcla se dejó en reposo en oscuridad durante una semana. Posteriormente, el extracto se filtró y se concentró en un rotavapor, hasta tener 50 mL de la solución madre libre del solvente de extracción. Los extractos se envasaron en un frasco ámbar y se colocaron en refrigeración (4°C) para su conservación.

3.1.3. Identificación de polifenóles

Empleando como estándar ácido gálico, se determinó el contenido de fenoles totales en los extractos de hoja de vid silvestre (EHVS) con el método Folin-Ciocalteu (Mora *et al.*, 2009), a 760 nm en un espectrofotómetro; el resultado se expresó en equivalentes de ácido gálico (EAG). La identificación de algunos compuestos polifenólicos de los EHVS de cada accesión se realizó con un HPLC Shimadzu bomba isocrática (serie 42205), empleando una columna Spherisorb fase reversa C18 1 μm \times 250 mm \times 4.6 mm (Waters, USA). Como fase móvil se usó agua: acetonitrilo: ácido acético (70:29.9:0.1). El nivel de flujo fue 1 mL min⁻¹ permitiendo cinco minutos de estabilización entre cada muestra. La señal fue monitoreada a 270 nm (Lorrain *et al.*, 2013). Las muestras fueron inyectadas por triplicado en el sistema cromatográfico, cuantificando los compuestos detectados por el método de estándar interno.

3.1.4. Actividad antifúngica

En matraces con MCAvA a pH 4.5, sin solidificar, se vertieron las cantidades correspondientes de los EHVS de cada una de las accesiones, resveratrol (RVS) (Sigma), extracto de cítricos (EC) (Tecnosafe), cyprodinil+ fludioxonil (fungicida Switch® 62.5 WG) (SW), como testigo absoluto (TA) se tuvo MCAvA sin ningún ingrediente adicional.

De cada EHVS se tomaron 6, 8 y 12 mL para aforar a 100 mL de MCAvA a pH 4.5. Cada solución se vació en cajas de Petri debidamente etiquetadas y se dejó solidificar. Los tratamientos con RVS (60, 90 y 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$), EC (3, 5 y 8 % (v/v)) y SW (500, 800 y 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$) se prepararon de la misma manera, empleando RVS disuelto en agua: metanol 1:1, SW en agua destilada, mientras que EC se empleó en su forma comercial líquida.

Para cada uno de los 19 tratamientos se realizaron cuatro repeticiones con tres cajas de Petri por repetición, siendo cada placa una unidad experimental. El experimento se realizó por duplicado, debido a la similitud de ambos resultados, el análisis estadístico presentado en este reporte corresponde a uno de los experimentos. Posteriormente, se colocó, en el centro de cada una de las cajas de Petri con MCAvA y su respectivo tratamiento, un disco de 5 mm de diámetro de MCAvA con micelio activo de *B. cinerea* de 5 días de edad. Las cajas se incubaron a $26 \pm 2^{\circ}\text{C}$ y el diámetro de la colonia de *B. cinerea* se midió cada 48 h con ayuda de un vernier digital. Para cada repetición, las mediciones concluyeron cuando la superficie del MCAvA en todas las cajas del TA fue cubierta totalmente por el micelio del hongo. Los valores medios del crecimiento micelial fueron transformados a porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) en relación con el TA utilizando la fórmula $\text{ICM (\%)} = [(d\text{Ta} - dt)/d\text{Ta (ICM)}] \times 100$, donde dTa y dt representan el diámetro del crecimiento micelial del TA y de cada uno del resto de los tratamientos, respectivamente (Soylu *et al.*, 2010). La disposición de las cajas de Petri en la incubadora permitió tener un diseño experimental completamente al azar.

Al final del experimento, de cada tratamiento se obtuvieron esporas del MCAvA con ayuda de una varilla de vidrio y agua destilada estéril. Por cada unidad experimental previamente descrita, se tomó una alícuota de la suspensión con conidios y fue transferida a una cámara de Neubauer para realizar el conteo de los conidios de acuerdo con la metodología de Moo-Koh *et al.* (2014). Los datos se convirtieron a porcentajes y los resultados se reportaron como inhibición de la esporulación (IE) siguiendo la fórmula: $\text{IE (\%)} = [(E\text{Ta} - E\text{t})/E\text{Ta}] \times 100$, donde E_{Ta} y E_t representan el número de conidios en el TA y en cada uno de los tratamientos restantes, respectivamente (Soylu *et al.*, 2010).

Por otro lado, a partir de un cultivo esporulado (8 días de edad), se preparó una suspensión de 1×10^6 conidios por mililitro en agua destilada estéril. Se colocaron 200 μL de esta suspensión en cajas de Petri con MCAvA suplementadas con las diferentes dosis de cada uno de los 19 tratamientos. Al final de un periodo de 48 h de incubación a 22 ± 2 °C, se evaluó la germinación de 100 conidios ubicados de manera aleatoria. Se consideró germinado cuando el largo del tubo germinativo fue igual o mayor al tamaño del diámetro del conidio. El porcentaje de inhibición de la germinación (IGC) se determinó mediante la fórmula empleada por Soyly *et al.* (2010): $\text{IGC} (\%) = [(G\text{Ta} - G\text{t})/G\text{Ta}] \times 100$, donde G_{Ta} y G_t representan el número de conidios germinados en el TA y en cada uno del resto de los tratamientos, respectivamente. El diseño experimental y el número de repeticiones por tratamiento fue el mismo del trabajo de crecimiento micelial.

3.2. Evaluación *in vivo*

3.2.1. Material vegetal e inoculación

Las bayas de fresa ‘Festival’, en la escala de maduración No. 3 (Gobierno de México, 2002), fueron cosechadas en el municipio de San Felipe del Progreso, Estado de México. Luego, las bayas fueron transportadas, aproximadamente 45 min, al laboratorio de Horticultura de la Facultad de Ciencias Agrícolas de la Universidad Autónoma del Estado de México.

En el laboratorio, los frutos de fresa se desinfectaron en una solución acuosa de hipoclorito de sodio al 1% durante 2 min; luego, los frutos se enjuagaron con agua destilada estéril y se dejaron secar a temperatura ambiente. Las bayas fueron aleatorizadas y divididas en seis grupos homogéneos, 210 frutos cada uno. Los seis tratamientos fueron los siguientes: 0.450 g L⁻¹ resveratrol, 0.450 g L⁻¹ de ácido gálico, extractos de hojas frescas de accesión de

vid silvestre (EHVS) 'P-178', 'E-200', 'TN-4' a 7.2 % y control (agua destilada); Las 210 bayas de cada tratamiento se separaron en tres repeticiones, 70 bayas cada una.

Antes de la imbibición de las bayas, el resveratrol (SIGMA) se disolvió en agua destilada: solución de metanol (1:1), mientras que el ácido gálico (SIGMA) se disolvió en agua destilada. Por otro lado, en primer lugar, las hojas jóvenes (alrededor de tres semanas después de la expansión completa de la hoja) de las accesiones de vid silvestre 'P-178', 'E-200' y 'TN-4' se cosecharon en el banco de germoplasma de vid silvestre ubicado en Zumpahuacán, Estado de México (Sabas-Chávez *et al.*, 2016). Después de enjuagar las hojas en agua corriente, se maceraron hasta disolver el tejido vegetal en agua destilada. Luego, las soluciones de hojas se llevaron a 1 L para obtener la concentración final de hojas frescas de 7.2% (p/v). En contenedores de 2 L, las bayas se sumergieron en las soluciones EHVS durante 3 minutos; se empleó un contenedor para cada replicación en cada tratamiento.

Posteriormente, las bayas se dejaron secar a temperatura ambiente, luego, las bayas se infiltraron, con una jeringa, con suspensión fungica, cepa de *B. cinerea* de una semana de edad, 1×10^6 conidias por fruto. Después de la inoculación, las bayas se colocaron en superficies de plástico a una distancia de 0.5 cm entre las frutas continuas, la sala de almacenamiento se mantuvo a 19 ° C y 70% de humedad relativa. Las superficies de plástico y su distribución en la sala de almacenamiento permitieron una distribución en un experimento de bloques completos al azar.

3.2.2 Evaluación poscosecha

Diariamente, todos los frutos de cada repetición se analizaron visualmente para determinar la presencia o no de *B. cinerea*. Si la baya mostraba una mancha marrón de *B.*

cinerea de al menos 0.5 cm de diámetro, la fruta se determinó como enferma y se descartó inmediatamente del almacenamiento. Cada día, se contaban todas las bayas enfermas y el número se usó para determinar el porcentaje de frutas que mostraban síntomas de enfermedad. Del resto de las frutas sin síntomas, se pesaron 10 bayas para determinar la tasa de pérdida de peso fresco; esta tasa se expresó en porcentaje del peso inicial de la fruta. Para cada repetición, se usaron 10 frutas para determinar el contenido de sólidos solubles totales (SST) con un refractómetro (Atago, Japón) y acidez titulable mediante titulación con hidróxido de sodio (Franco-Mora *et al.*, 2015). La firmeza de la pulpa se determinó con un texturómetro Brookfield CT 1000 utilizando el cilindro P72 que penetra 5 mm del fruto a una velocidad de 5 mm/s.

3.3. Análisis estadístico

En la evaluación *in vitro*, los datos de porcentajes de ICM, IE e IGC se transformaron a $y = \arcsin [\sqrt{y/100}]$. Para la prueba *in vivo* el experimento se realizó en bloques completos al azar unifactorial y con tres repeticiones por tratamiento. Para cada determinación, los valores de 10 frutas se consideraron como una repetición. Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza de bloques completos al azar y en caso de significancia se procedió a la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) con el programa estadístico SAS® (SAS Institute, 2002).

4. RESULTADOS

Los resultados de este trabajo se resumen en dos documentos

a) Apolonio-Rodríguez, I., Franco-Mora O., Salgado-Siclán M., Aquino-Martínez, J. G. 2017. Inhibición *in vitro* de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis*

spp.). Revista Mexicana de Fitopatología 35: 170-185. Revista incluida en el Índice CONACYT de Revistas Científicas con Competencia Internacional.

b) Apolonio-Rodríguez, I., Franco-Mora O, J. G. Aquino-Martínez, J. G., Salgado-Siclán M. Extracts of leaves of wild grapevine (*Vitis* spp.) delay *Botrytis cinerea* postharvest decay in strawberry fruit. Revista Scientia Fungorum (en revisión). Revista incluida en el Índice CONACYT de Revistas Científicas En Desarrollo.

4.1 Inhibición in vitro de *Botrytis cinerea* con extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.

Resumen

Resumen. Extractos de hoja de vid silvestre (EHVS) (*Vitis* spp.) de tres accesiones (P-178, E-200 y TN-4) se evaluaron in vitro a 6, 8 y 12 % v/v con el fin de medir el efecto inhibitorio en el crecimiento de *Botrytis cinerea*. Comparativamente, se empleó resveratrol (RVS) (60, 90, 120 µg/mL), extracto de cítricos (EC) (3, 5 y 8 % v/v) y cyprodinil + fludioxonil (SW) (500, 800 and 1000 µg/mL). En promedio, SW inhibió el crecimiento micelial (ICM), esporulación (IE) y germinación conidial (IGC) en 88.9, 85.5 y 93.7 %, respectivamente. RVS presentó el segundo mejor resultado. Todos los EHVS tuvieron acción inhibitoria; especialmente, P-178 al 12 % tuvo 72, 75 y 62 % de ICM, IE e IGC, respectivamente. Esta dosis tuvo 19.9 mg/mL de compuestos fenólicos, RVS 1.7 mg/ mL, ácido gálico 3.8 mg/mL y ácido ferúlico 2.5 mg/mL.

Palabras clave: Ácido ferúlico, ácido gálico, actividad fúngica, compuestos fenólicos, resveratrol.

Abstract.

The extracts of wild grapevines (*Vitis*) leaves (EHVS) from three accessions (P-178, E-200 and TN-4) at 6, 8 and 12 % v/v, were tested in vitro to evaluate their inhibitory effect on *Botrytis cinerea* development. Resveratrol (RVS) (60, 90, 120 µg/mL), citrus extracts (EC) (3, 5 and 8 % v/v) and cyprodinil + fludioxonil (SW) (500, 800 and 1000 µg/mL) were compared against EHVS. In average, SW presented inhibition of mycelial growth (ICM), sporulation (IE) and spore germination (IGC) (88.9; 85.5 and 93.7 %, average respectively).

RVS presented the second higher inhibition rate. All EHVS presented antifungal activity; specially, P-178 at 12 % resulted in 72 % ICM, 75 % IE and 62 % IGC. This dose contained phenolic compounds 19.9 mg/mL, RVS 1.7 mg/mL, gallic acid 3.8 mg/mL and ferulic acid 2.5 mg/mL.

Key words: Ferulic acid, gallic acid, antifungal activity, phenolic compounds, resveratrol.

4.1.1. Introducción

Botrytis cinerea (Teleomorfo: *Botryotinia fuckeliana*), agente causal de la pudrición gris, ataca un amplio rango de plantas en todo el mundo (Piesik *et al.*, 2015). Este hongo ha desarrollado resistencia a algunos fungicidas convencionales, particularmente benzimidazoles y dicarboximidas (Panebianco *et al.*, 2015). Múltiples aplicaciones de los diferentes tratamientos de control químico en frutas y hortalizas pueden generar problemas a la salud del personal de campo agrícola y al consumidor, detención de exportaciones por residuos de plaguicidas, daños al ambiente y efectos perjudiciales a organismos benéficos para la agricultura (Yadav *et al.*, 2015). Por consiguiente, es necesario reemplazar el uso de sustancias tóxicas por alternativas naturales amigables con el ambiente y la salud humana (Enríquez-Guevara *et al.*, 2010). Una alternativa en el manejo integrado de enfermedades es el uso de compuestos naturales producidos por algunas plantas, a los cuales se les atribuye propiedades antifúngicas (Compean y Ynalvez, 2014). Entre estos compuestos se encuentran los isoflavonoides, diterpenoides, alcaloides, aceites esenciales, estilbenos y polipéptidos (Soylu *et al.*, 2010). Particularmente, se ha reportado que *Vitis vinífera* posee diversos compuestos con actividad antimicrobiana y antifúngica como miricetina, ácido elágico, kaempferol, quercitina, ácido gálico, entre otros (Schnee *et al.*, 2013). Entre los compuestos

fenólicos presentes en extractos de cáscara de una mezcla de tres cultivares chilenos de *V. vinifera* se reportó la mayor actividad antifúngica de ácido pcoumarico (98.5 µg/mL) y kaempferol (100.9 µg/ mL); el extracto fenólico fue reportado con potencial contra *B. cinerea* (Mendoza *et al.*, 2013).

De la misma manera, el resveratrol (RVS), compuesto aislado por primera vez de eléboro blanco (*Veratrum album*) y perteneciente al grupo de los estilbenos, ha sido reportado como compuesto activo contra diferentes hongos fitopatógenos en el cultivo de la vid, i. e. *Erysiphe necator*, *Plasmopara viticola* y *B. cinerea* (Alonso-Villaverde *et al.*, 2011; Wu *et al.*, 2013). Adrian y Jeandet (2012) indicaron que RVS, a 60 µg/mL, ocasionó disrupción de la membrana de los conidios de *B. cinerea*. Por otra parte, el crecimiento micelial de *B. cinerea* in vitro se inhibió entre 50 y 70 % por acción de RVS (Salgado *et al.*, 2015). Además, al evaluar la efectividad, de manera separada, de RVS y tres compuestos relacionados con éste, (E)-3,4,5- trimethoxy-β-(2-furyl)-estireno, (E)-4-methoxy-β- (2-furyl)-estireno y (E)-3,5-dimethoxy-β-(2-furyl)- estireno a 100 µg/mL, se logró inhibir 70 % de la germinación de conidios de *B. cinerea* (Caruso *et al.*, 2011).

En el territorio de México se reporta la presencia de más de 16 especies silvestres del género *Vitis* (Cruz, 2007). Actualmente, en la localidad de Santa Cruz, Municipio de Zumpahuacán, Estado de México, México, se tiene una colección de plantas de este género; a las cuales se les estudia sistemáticamente para incrementar su aprovechamiento. Particularmente, la hoja de las especies silvestres de vid del centro de México (*Vitis* spp.), al igual que la hojas de *V. vinifera*, presenta cantidades importantes de compuestos fenólicos (Franco *et al.*, 2012). Tobar-Reyes *et al.* (2009) mencionan que de RVS se pueden encontrar de 0.04 a 39.5 µg/g de peso fresco; además, determinaron la existencia de ácido gálico, rutín y ácido caféico.

Debido a que la presencia de compuestos fenólicos en hojas de vid silvestre indica su potencial como agente de control natural de enfermedades en vegetales, en el presente trabajo se evaluó in vitro la actividad antifúngica contra *B. cinerea* de extractos de hojas frescas de las accesiones de vid silvestre P-178, E-200 y TN-4.

4.1.2. Materiales y métodos

4.1.2.1. Cepa fúngica

Se colectaron frutos de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) con síntomas de pudrición gris, en el Centro de Investigación y Transferencia de Tecnología (CITT) “Rancho El Islote”, del Instituto de Investigación y Capacitación Agropecuaria, Acuícola y Forestal del Estado de México (ICAMEX), localizado en Villa Guerrero, Estado de México a 18° 58’ 04’’ latitud norte y 99° 39’ 21’’ longitud oeste. Posteriormente, en el Laboratorio de Fitopatología del ICAMEX se tomaron fragmentos de aproximadamente 5 × 5 mm de tejido de los frutos enfermos, los cuales se desinfestaron con hipoclorito de sodio al 1% (v/v) por 3 min, se enjuagaron con agua destilada estéril tres veces, se secaron en papel filtro y se transfirieron a cajas de Petri con medio de cultivo avena-agar (MCAvA) acidificado con ácido láctico al 25% (v/v) a pH 4.5 y se incubaron a 26±2°C durante 8 días. Posteriormente, usando la técnica de punta de hifa, una porción de tejido micelial se transfirió a otra caja de Petri con MCAvA con la finalidad de obtener una cepa pura del hongo. Para comprobar la patogenicidad de los aislamientos del hongo se inocularon frutos sanos de fresa (*Fragaria × ananassa*) cv. Festival, previamente desinfestados como se describió anteriormente. A los frutos se les ocasionaron tres heridas, de aproximadamente 2 mm de diámetro por 2 mm de profundidad con agujas de disección previamente esterilizadas. En dichas heridas se depositaron 20 µL de una suspensión de 1×10⁶ conidios por mililitro de agua. Una vez que

se observaron los síntomas típicos de pudrición gris, se procedió a la identificación del hongo comparando las estructuras morfológicas observadas (tipo y color de micelio, septación, conidióforos, ramificación de conidióforos, largo y ancho de conidios) con las claves de Barnett y Hunter (1998); mientras que para la determinación de la especie se emplearon las descripciones especializadas de Ellis (1971) y Crous *et al.* (2007). Identificando al hongo *B. cinérea*.

Adicionalmente, se enviaron muestras del hongo al Laboratorio de Diagnostico Fitosanitario del Colegio de Postgraduados, Montecillo, México, en donde se analizaron molecularmente. La secuencia ITS obtenida del hongo se comparó con secuencias de organismos referencia con mayor similitud, por medio de una búsqueda en la base de datos BLAST del GenBank® (National Institutes of Health (NIH), Bethesda, MD, USA). Una vez comprobada la especie (*B. cinérea*), el hongo fue cultivado para realizar las pruebas del presente experimento.

4.1.2.2. Obtención de extractos vegetales

Se obtuvieron hojas sanas y uniformes en tamaño y color (Franco *et al.*, 2012) de tres accesiones de vid silvestre: (1) E-200, originaria de Tejupilco, Estado de México, (2) TN-4, originaria de Tenancingo, Estado de México y (3) P-178, originaria de Hueytamalco, Puebla; todas ellas establecidas en el banco de germoplasma de vid silvestre de Zumpahuacán, México. El tejido vegetal se trasladó al Laboratorio de Horticultura de la Universidad Autónoma del Estado de México, Toluca, México; en donde se maceraron 200 g de hojas por accesión en 250 mL de metanol al 99 %; esta mezcla se dejó en reposo en oscuridad durante una semana. Posteriormente, el extracto se filtró y se concentró en un rotavapor, hasta tener

50 mL de la solución madre libre del solvente de extracción. Los extractos se envasaron en un frasco ámbar y se colocaron en refrigeración (4 °C) para su conservación.

4.1.2.3. Identificación de polifenóles

Empleando como estándar ácido gálico, se determinó el contenido de fenoles totales en los extractos de hoja de vid silvestre (EHVS) con el método Folin-Ciocalteu (Mora *et al.*, 2009), a 760 nm en un espectrofotómetro; se expresó el resultado en equivalentes de ácido gálico (EAG). La identificación de algunos compuestos polifenólicos de los EHVS de cada accesión se realizó con un HPLC Shimadzu bomba isocrática (serie 42205), empleando una columna Spherisorb fase reversa C18 1 μm \times 250 mm \times 4.6 mm (Waters, USA). Como fase móvil se usó agua: acetonitrilo: ácido acético (70:29.9:0.1). El nivel de flujo fue 1 mL min⁻¹ permitiendo cinco minutos de estabilización entre cada muestra. La señal fue monitoreada a 270 nm (Lorrain *et al.*, 2013). Las muestras fueron inyectadas por triplicado en el sistema cromatográfico; cuantificando los compuestos detectados por el método de estándar interno.

4.1.2.4. Actividad antifúngica

En matraces con MCAvA a pH 4.5, sin solidificar, se vertieron las cantidades correspondientes (Cuadro 1) de los EHVS de cada una de las tres accesiones, resveratrol (RVS) (Sigma), extracto de cítricos (EC) (Tecnosafe), cyprodinil + fludioxonil (funguicida Switch® 62.5 WG) (SW), y como testigo absoluto (TA) se empleó MCAvA sin ningún ingrediente adicional.

De cada EHVS se tomaron 6, 8 y 12 mL para aforar a 100 mL de MCAvA a pH 4.5. Cada solución se vació en cajas de Petri debidamente etiquetadas y se dejó solidificar. Los tratamientos con RVS (60, 90 y 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$), EC (3, 5 y 8% (v/v)) y SW (500, 800 y 1000

µg/mL) se prepararon de la misma manera, empleando RVS disuelto en agua: metanol 1:1, SW en agua destilada, mientras que EC se empleó en su forma comercial líquida.

Cuadro 1. Concentración de compuestos fenólicos en medio de cultivo avena agar adicionado con extractos de hoja de vid silvestre (*Vitis* spp).

Extracto de hoja de vid silvestre	Concentración (%; v/v)	Concentración (mg/mL)			
		fenoles totales (EAG)	ácido gálico	ácido ferúlico	Resveratrol
P-178	6	20.8 d	1.9 c	1.2 c	0.9 c
	8	27.7 c	2.5 b	1.7 b	1.1 b
	12	41.4 a	3.8 a	2.5 a	1.7 a
E-200	6	13.9 e	1.9 c	1.3 c	
	8	18.5 d	2.5 bc	1.6 b	
	12	26.7 c	3.6 a	2.3 ab	
TN-4	6	18.6 d	1.5 d	1.1 d	
	8	24.5 c	1.9 c	1.4 c	
	12	35.4 b	2.8 b	2.5 a	

EAG: Equivalentes de ácido gálico. Los datos son la media de tres repeticiones; valores con letra diferente presentan diferencia estadística a $P \leq 0.05$.

Para cada uno de los 19 tratamientos se realizaron cuatro repeticiones, con tres cajas de Petri por repetición, siendo cada caja de Petri una unidad experimental. El experimento se realizó por duplicado, debido a la similitud de ambos resultados, el análisis estadístico presentado en este reporte corresponde a uno solo de los experimentos. Posteriormente, se colocó, en el centro de cada una de las cajas de Petri con MCAvA y su respectivo tratamiento,

un disco de 5 mm de diámetro de MCAvA con micelio activo de *B. cinerea* de 5 días de edad. Las cajas se incubaron a 26 ± 2 °C y el diámetro de la colonia de *B. cinerea* se midió cada 48 h con ayuda de un vernier digital. Para cada repetición, las mediciones concluyeron cuando la superficie del MCAvA en todas las cajas del TA fue cubierta totalmente por el micelio. Los valores medios del crecimiento micelial fueron transformados a porcentaje de inhibición del crecimiento micelial (ICM) en relación con el TA utilizando la fórmula: $ICM (\%) = [(dT_a - dt)/dT_a (ICM)] \times 100$, donde dT_a y dt representan el diámetro del crecimiento micelial del TA y de cada uno del resto de los tratamientos, respectivamente (Soylu *et al.*, 2010). La disposición de las cajas de Petri en la incubadora permitió tener un diseño experimental completamente al azar.

Al final del experimento, de cada tratamiento se obtuvieron esporas del MCAvA con ayuda de una varilla de vidrio y agua destilada estéril. Por cada unidad experimental previamente descrita, se tomó una alícuota de la suspensión con conidios y fue transferida a una cámara de Neubauer para realizar el conteo de los conidios de acuerdo con la metodología de Moo-Koh *et al.* (2014). Los datos se convirtieron a porcentajes y los resultados se reportaron como inhibición de la esporulación (IE) siguiendo la fórmula: $IE (\%) = [(ET_a - Et)/ET_a] \times 100$, donde ET_a y Et representan el número de conidios en el TA y en cada uno de los tratamientos restantes, respectivamente (Soylu *et al.*, 2010).

Por otro lado, a partir de un cultivo esporulado (8 días de edad), se preparó una suspensión de 1×10^6 conidios por mililitro en agua destilada estéril. Se colocaron 200 μ L de esta suspensión en cajas de Petri con MCAvA suplementadas con las diferentes dosis de cada uno de los 19 tratamientos. Al final de un periodo de 48 h de incubación a 22 ± 2 °C, se evaluó la germinación de 100 conidios ubicados de manera aleatoria. Se consideró germinado

cuando el largo del tubo germinativo fue igual o mayor al tamaño del diámetro del conidio. El porcentaje de inhibición de la germinación (IGC) se determinó mediante la fórmula empleada por Soyly *et al.* (2010): $IGC (\%) = [(GTa - Gt)/GTa] \times 100$, donde GTa y Gt representan el número de conidios germinados en el TA y en cada uno del resto de los tratamientos, respectivamente. El diseño experimental y el número de repeticiones por tratamiento fue el mismo del trabajo de crecimiento micelial.

4.1.2.5. Análisis estadístico

Los datos de porcentajes de ICM, IE e IGC se transformaron a $y = \arcsin(\sqrt{y/100})$. Los datos fueron procesados mediante análisis de varianza de bloques completamente al azar con un factor y en caso de significancia se procedió a la comparación de medias con la prueba de Tukey ($P \leq 0.05$) con el programa estadístico SAS® (SAS Institute, 2002).

4.1.3. Resultados

Identificación morfológico-molecular cuatro días después de la inoculación con *Botrytis* sp., todos los frutos de fresa mostraron síntomas de pudrición gris, además de abundante esporulación del hongo (Figura 1A). Por otra parte, en el MCAvA las colonias exhibieron crecimiento micelial concéntrico, de consistencia afelpada y color blanco y siete días después, el micelio se tornó de color gris (Figura 1B). Bajo microscopia de luz, se observaron conidióforos largos, septados, pigmentados, con pared lisa, ramificados apicalmente y con racimos de conidios (Figura 1C). Los conidios fueron unicelulares, ovoides, lisos, hialinos y de $8-15 \times 6-9 \mu\text{m}$ (Figura 1D). Todas las características observadas correspondieron a *B. cinérea* de acuerdo con la descripción de Ellis (1971). Por otro lado, la

comparación en el BLAST de la secuencia mostró 100 % de similitud con la secuencia KR055051. Basado en características morfológicas y moleculares se confirmó que el agente causal de la pudrición gris del pimiento morrón en el CITT “Rancho el Islote” del ICAMEX es *Botrytis cinerea*.

4.1.3.1. Compuestos fenólicos

En los EHVS de las tres accesiones se determinó la presencia de ácido gálico y ácido ferúlico, mientras que en P-178 se determinó la presencia de resveratrol. Al aumentar la cantidad de EHVS por mililitro de MCAvA, se incrementó la concentración de los diversos fenoles indicados (Cuadro 1). Actividad antifúngica Todas las concentraciones de EHVS de las tres accesiones presentaron ICM. P-178 12 % presentó mayor ICM, superior al 70 % en relación a TA. SW a sus dos dosis más altas presentó 90 % de ICM, mientras que, de manera general, la ICM por RVS grado reactivo se ubicó entre SW y los EHVS. El EC inhibió no más de 25 % el crecimiento del micelio (Cuadro 2, Figura 2). La mayor IE se presentó con SW, seguida de RVS; mientras que el porcentaje de los EHVS fue entre 53 a 75 %, en relación al TA.

Por otro lado, todos los tratamientos presentaron IGC. SW, en sus tres dosis, inhibió más del 90 %, seguido de RVS, cuyo promedio de las tres dosis fue de 64 %. La mayor IGC de un EHVS fue observada en P-178 12 % cuyo porcentaje fue superior a 60 %, en relación al TA.

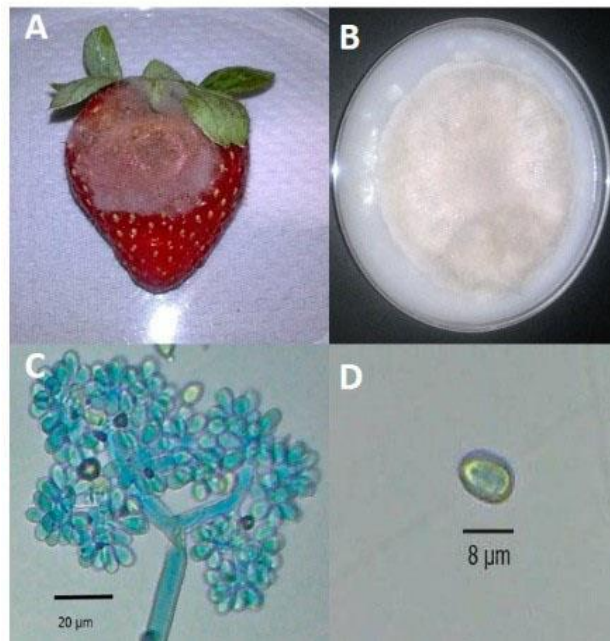


Figura 1. Aislado de *Botrytis cinerea* obtenido a partir de frutos de *Capsicum annuum*. A) Síntomas de pudrición gris en fruto de fresa. B). Colonia de 4 días de edad cultivada en medio avena agar. C) Ápice ramificado de un conidióforo con racimos de conidios; D) conidio de *Botrytis cinerea*.

Cuadro 2. Actividad inhibitoria de diferentes tratamientos sobre crecimiento micelial (ICM), esporulación (IE) y germinación de la espora (IGC) de *Botrytis cinerea in vitro*.

Concentración	Concentración (mg/mL)
---------------	-----------------------

Extracto de hoja de vid silvestre	(%; v/v)				
		fenoles totales (EAG)	ácido gálico	ácido ferúlico	Resveratrol
P-178	6	20.8 d	1.9 c	1.2 c	0.9 c
	8	27.7 c	2.5 b	1.7 b	1.1 b
	12	41.4 a	3.8 a	2.5 a	1.7 a
E-200	6	13.9 e	1.9 c	1.3 c	
	8	18.5 d	2.5 bc	1.6 b	
	12	26.7 c	3.6 a	2.3 ab	
TN-4	6	18.6 d	1.5 d	1.1 d	
	8	24.5 c	1.9 c	1.4 c	
	12	35.4 b	2.8 b	2.5 a	

Los datos son la media \pm EE de cuatro repeticiones, tres cajas de Petri por repetición. Medias seguidas con la misma letra en cada columna no presentan diferencia significativas con la prueba de Tukey a $P \leq 0.05$.

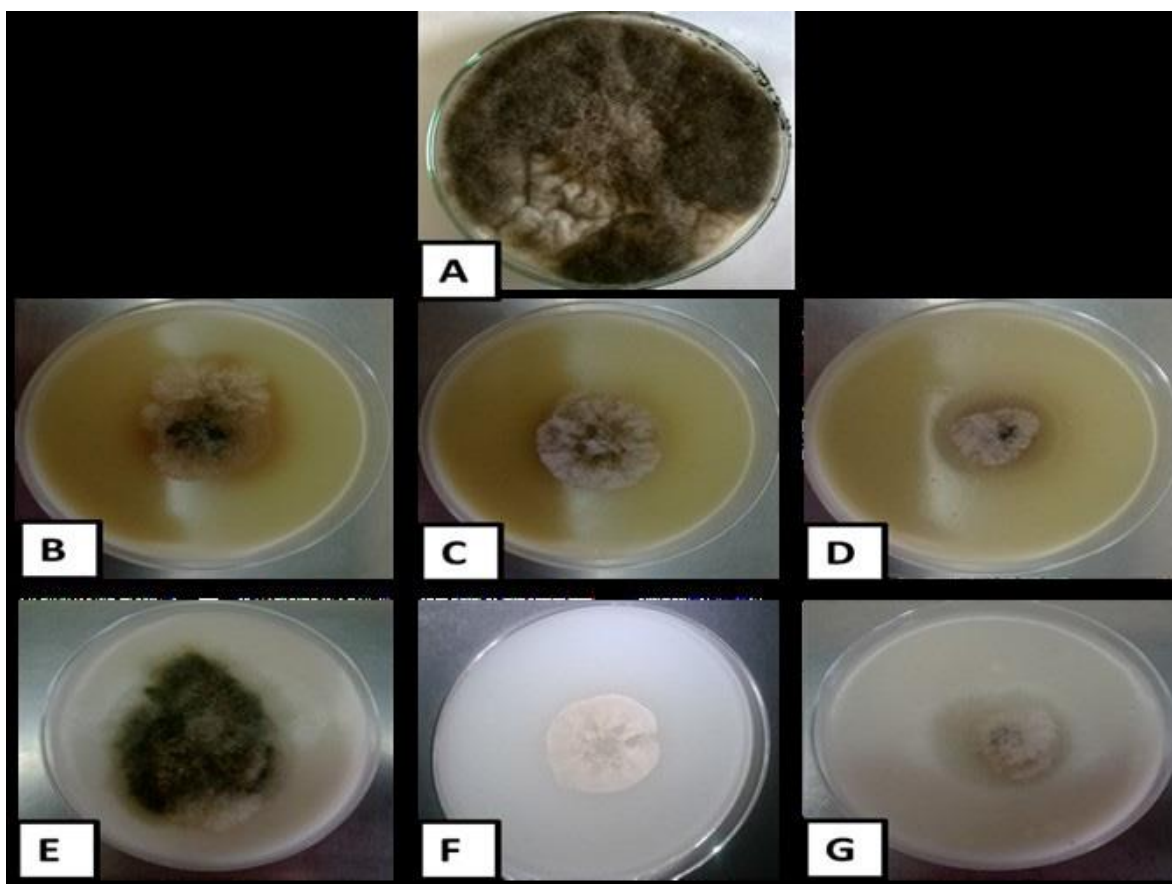


Figura 2. Crecimiento de *Botrytis cinerea* en medio avena agar a los 8 días de la inoculación a 26 ± 2 °C. A; testigo absoluto B: extracto de hoja de la accesión de vid silvestre (*Vitis* spp.) E-200 12 % (v/v); C: extracto de hoja de la accesión de vid silvestre TN-4 12 % (v/v); D: extracto de hoja de la accesión de vid silvestre P-178 12 % (v/v); E: extracto de cítricos 8 % (v/v); F: resveratrol 120 µg/mL; G: cyprodinil + fludioxonil 1000 µg/mL.

4.1.4. Discusión

La mayor concentración de ácido gálico, ácido ferúlico y RVS en los EHVS de P-178 en relación a E-200 y TN-4 está relacionado con la variabilidad en la presencia y concentración de polifenoles en hojas de distintas accesiones de vid silvestre de México; identificando a los factores genético, ambiental y genético-ambiental como los responsables de esta variabilidad (Katalinić *et al.*, 2009; Tobar-Reyes *et al.*, 2011). En este trabajo, se sugiere que la diferencia entre accesiones en el contenido total de compuestos fenólicos y particular de los tres fenoles identificados, es debida principalmente a la genética, ya que los tejidos vegetales de las tres accesiones provinieron de un mismo banco de germoplasma.

El efecto inhibitorio del desarrollo de *B. cinérea* de los EHVS empleados puede deberse a la presencia de ácido gálico, ferúlico y resveratrol, polifenoles que han mostrado propiedades antifúngicas (Katalinić *et al.*, 2009; Schnee *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2013). Vio-Michaelis *et al.* (2012), indicaron la presencia de ácido ferúlico en los extractos etanólicos de dos especies vegetales que poseen potencial para el control de *B. cinérea*; mientras que la aplicación de ácido gálico a un sistema in vitro implicó menor desarrollo de *B. cinérea* (Mendoza *et al.*, 2013). Así, la mayor ICM, IE e IGC de EHVS P-178 12 % en comparación al resto de los EHVS puede estar relacionada tanto por la presencia,

determinada y potencial, de más compuestos fenólicos, como por la mayor concentración de los mismos en relación a TN-4 y E-200. La elucidación completa de los polifenoles presentes en los EHVS y la actividad antifúngica particular de cada compuesto es una actividad científica a desarrollar.

Si bien la ICM, IE e IGC por P-178 12 % fue inferior a lo observado con SW y RVS, la actividad antifúngica de este extracto es importante por ser superior a 70 % para ICM e IE y superior a 60 % de IGC. En este sentido, la ICM es similar a la reportada por El- Kateeb *et al.* (2013) con extractos metanólicos al 0.4 % de hojas de *V. vinifera* ‘Thompson seedless’ y ‘Flame seedless’ (entre 63 y 72 %). Particularmente, el modo de acción de los polifenoles

contra *B. cinerea* no ha sido totalmente explicado, pero se ha sugerido que actúan sobre la membrana citoplasmática, produciendo cambios en su permeabilidad, ocasionando liberación del contenido celular, coagulación del material citoplasmático y desorganización de organelos y membrana celular, todo ello inhibe el desarrollo del micelio y evita su esporulación (Adrian y Jeandet, 2012; Minova *et al.*, 2015). Por otro lado, se ha indicado que polifenoles del tipo ácido 3b-hydroxy-kaurenoico están involucrados con reducción en la germinación de *B. cinerea* (Cotoras *et al.*, 2011).

La concentración de RVS en el MCAvA con EHVS P-178, a cualquier dosis, fue superior a la obtenida con la adición de cualquiera de los tratamientos con RVS grado reactivo, pero el efecto antifúngico de los EHVS fue menor. Estos resultados pueden deberse a lo reportado por Guerrero *et al.* (2010), indicando que entre los compuestos fenólicos presentes en un extracto vegetal existen interacciones sinérgicas y/o antagónicas, las cuales pueden modificar su efecto antifúngico. A pesar del menor control *in vitro* de *B. cinerea* con

EHVS en relación a SW, RVS grado reactivo e incluso otros extractos vegetales reportados en la literatura i.e. extractos de *Citrus paradisi* (Xu *et al.*, 2007); este trabajo indica el potencial de los EHVS de México como reductores de la dispersión e infección efectiva de *B. cinerea*, hongo causante de graves pérdidas económicas en diversos cultivos (Piesik *et al.*, 2005). La amplia presencia de la vid silvestre en México y su bajo costo de adquisición son factores que también contribuyen al interés de identificar completamente a los polifenoles presentes en los EHVS y su efecto particular contra el hongo en estudio.

4.1.5. Conclusiones

Los extractos metanólicos de hojas de tres accesiones de vid silvestre (*Vitis* spp.) mostraron actividad antifúngica *in vitro* contra *Botrytis cinerea*; particularmente, el extracto de hojas de la accesión P-178 inhibió 70% el crecimiento micelial, 75% la esporulación y 61% la germinación de esporas, siempre en relación al testigo absoluto. Se detectó resveratrol, ácido gálico y ácido ferúlico en los extractos de dicha accesión y se sugiere la participación de estos fenoles contra *B. cinerea*. Resveratrol grado reactivo produjo mejor control del hongo que los extractos de hoja de vid silvestre; generalmente, cualquier dosis de ambos extractos de hoja de vid silvestre y resveratrol grado reactivo; no superaron la actividad antifúngica de cyprodinil + fludioxonil.

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (Conacyt), México, por el financiamiento de los estudios de postgrado de Isela Apolonio-Rodríguez y al Laboratorio de Fitopatología de ICAMEX por las facilidades otorgadas para la realización del trabajo experimental.

4.2. Extractos de hojas de vid silvestre (*Vitis* spp.) retrasan el decaimiento postcosecha por *Botrytis cinerea* en fresa.

(Extracts of leaves of wild grapevine (*Vitis* spp.) delay *Botrytis cinerea* postharvest decay in strawberry fruit)

4.2.1. Introduction

Botrytis cinerea is the most important pathogen responsible of strawberry fruit (*Fragaria × ananasa*) postharvest decay (Domnez *et al.*, 2011; Amiri *et al.*, 2013). In extreme cases, loss of over 80% of berry production might be linked to the attack of *B. cinerea* (Salami *et al.*, 2010). Mexico has become one of the worldwide top five strawberry producers (SAGARPA, 2018) and its local industry might join the international efforts to increase the use of sustainable and innocuousness postharvest techniques over addition of agrochemicals to delay or reduce strawberry postharvest fungus incidence. For example, in preharvest stage, it has been proposed the, in planta, spray of chitosan on developing berries (Reddy *et al.*, 2010); whereas techniques proposed at postharvest include the application of chitosan edible films added with olive (*Olea europaea*) oil (Khalifa *et al.*, 2016); gelatin-based films containing cellulose nanocrystals (Fakhouri *et al.*, 2014); 12 h exposure to 0.1 ml L⁻¹ of essential oil of *Solidago canadensis* (Liu *et al.*, 2016); irradiation with 4 kJ m⁻² combined with an exposure of 3 h in hot air (45°C) (Pan *et al.*, 2004); inoculation of *Bacillus* MFDÜ-2 (Domnez *et al.*, 2011); applications of nitric oxide (Abdollahi *et al.*, 2013), among others.

Particularly, an extract 800 ppm *V. vinifera* tendrils fully inhibited the in vitro growth of *B. cinerea* (Fraternale *et al.*, 2015); and an aqueous solution of leaves, 12% (w/v), of Mexican wild grapevine (*Vitis* spp.) successfully inhibited in vitro mycelial growth (72%), sporulation (75%) and germination of spores (62%) of *B. cinerea* (Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017). Successful antifungal activity of *Vitis* plant extracts over *B. cinerea* has been related to the presence of diverse polyphenols i.e. rutin, quercetin, resveratrol and p-coumaric, ellagic, caffeic and caftaric acids among others (Mendoza *et al.*, 2013; Fraternale *et al.*, 2015; Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017).

On the other hand, the stilbene resveratrol (RVS) is a natural compound synthesized in several organs of the *Vitis* plants and its synthesis has been related to an increment in the plant resistance against *B. cinerea* (Langcake and McCarthy, 1979). This resistance has been related to the methylation of hydroxyphenol groups of RVS (Adrian *et al.*, 1997). Under in vitro conditions, 0.120 g L⁻¹ RVS inhibited 70% mycelial growth and spore germination and 80% sporulation of *B. cinerea* (Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017). RVS as well as gallic acid, rutin and caffeic acid are present in leaves of Mexican wild grapevines, (Tobar-Reyes *et al.*, 2009, 2011). Thus, present research aimed to determine the effect of extracts of aqueous extracts of wild grapevine fresh leaves on the development of *B. cinerea* in strawberry 'Festival' fruit and to compare the efficiency of those aqueous extracts versus commercial RVS and gallic acid.

4.2.2. Material and methods

4.2.2.1. Plant material and inoculation

Berries of strawberry 'Festival', at ripening scale No. 3 (Gobierno de México, 2002), were harvested in the municipality of San Felipe del Progreso, State of Mexico. Then, berries were transported, about 45 min, to the laboratory of Horticulture of the Faculty of Agriculture, Universidad Autónoma Del Estado de México.

At the laboratory, the strawberry fruit were disinfected in 1% sodium hypochlorite aqueous solution for 2 min; then, fruits were rinsed with sterile distilled water and they were allowed to dry at room temperature. The berries were randomized and divided in six homogenous groups, 210 fruits each. The six treatments were as follows, 0.450 g L⁻¹ resveratrol, 0.450 g L⁻¹ gallic acid, extracts of 7.2% fresh leaves of wild grapevine accession (FLWGA) 'Don José', 'E-200', 'TN-4' and control (distilled water); the 210 berries of each treatment were separated in three replications, 70 berries each.

Previous to berries imbibition, resveratrol (SIGMA) was dissolved in distilled water: methanol solution (1:1), whereas gallic acid (SIGMA) was dissolved in distilled water. On the other hand, firstly, young leaves (around three weeks after full leaf expansion) of wild grapevine accessions 'Don José', 'E-200' and 'TN-4' were harvested in the wild grapevine germplasm bank located in Zumpahuacán, State of Mexico (Sabas-Chavez *et al.*, 2016) as indicated by Apolonio-Rodríguez *et al.* (2017). After rinsing the leaves in tap water, they were macerated till dissolving the plant tissue in distilled water. Then, leaves solutions were brought out to 1 L to obtain a final fresh leave concentration of 7.2% (w/v). In 2 L containers, the berries were plenty imbibed in the FLWGA solutions during 3 min; one container for each replication in each treatment.

The berries were allowed to dry at room temperature, then, the berries were infiltrated by syringe with bacterial suspension, one-week old strain of *B. cinerea* (Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017), 1×10^6 conidia per fruit. After inoculation, berries were placed on plastic surfaces within a distance of 0.5 cm between continuous fruits, the room of storage was maintained at 19°C and 70% relative humidity. The plastic surfaces and their distribution in the storage room allowed a distribution in a random complete blocks experiment.

4.2.2.2. Postharvest evaluation

Daily, all the fruit of each replication were visually analyzed to determine the presence or not of *B. cinerea*. If the berry showed *B. cinerea* brown spot of at least 0.5 cm of diameter, the fruit was determined as diseased and immediately discarded from storage. Each day, all the diseased berries were counted and the number was used to determine the percentage of fruits showing symptoms of disease. From the rest of the fruits without symptoms, 10 berries were weighted to determine the rate of fresh weight loss; this rate was expressed in percentage of the initial fruit weight. For each replication, 10 fruits were used to determine the content of total soluble solids (TSS) with a refractometer (Atago, Japan), and titratable acidity by titulating with sodium hydroxide (Franco-Mora *et al.*, 2015). Flesh firmness was determined with a texturometer Brookfield CT- 1000 using the cylinder P72 penetrating 5 mm of the fruit at a velocity of 5 mm s⁻¹.

4.2.2.3. Statistical analysis

The experiment was conducted as a random complete blocks one, with three replications per treatment. For each determination the values of 10 fruits were considered as one replication.

It was performed an analysis of variance, and when the F value was significant, the treatments were compared with the tukey test at 0.05 of significance.

4.2.3. Results and discussion

4.2.3.1. Incidence of *B. cinerea*

Four days after *B. cinerea* inoculation (DAI), over 50% of the control berries developed symptoms of the disease; and 6 DAI, all the control fruit presented the disease. It has been determined that after starting fruit ripening, *B. cinerea* causes rapid decay of infected fruit (Elad *et al.*, 2007). For example, Mehli *et al.* (2005) observed spore germination and tissue infection after 16 h of inoculation. Contrarily, 8 DAI, less than 25% of the berries treated with RVS developed the disease; and around 40% of the berries treated with gallic acid, and extracts of FLWGA 'Don José' and 'E-200' presented the symptoms disease (Figure 1). In grapes (*Vitis vinifera*), endogenous resveratrol is produced in response to microbial attack of *B. cinerea* (Cichewicz *et al.*, 2000). Moreover, under culture medium conditions, addition of 0.120 g L⁻¹ RVS reduced over 70% in vitro mycelial growth of *B. cinerea*; also extracts of FLWGA reduced, in relation to control, the in vitro growth of *B. cinerea* (Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017). It has been determined that proanthocyanins appears to induce *B. cinerea* quiescence in unripe strawberries and, it has been suggested than other phenolic compounds might have a role in *B. cinerea* quiescence (Petrasch *et al.*, 2019). The extracts of FLWGA had a high content of phenolic compounds (Franco *et al.*, 2012) i.e. gallic acic, cafeic acid, rutin and RVS. Thus, the presence of phenolic compounds in the extracts of FLWGA might be related in suppressing the development of inoculated *B. cinerea* in the strawberries.

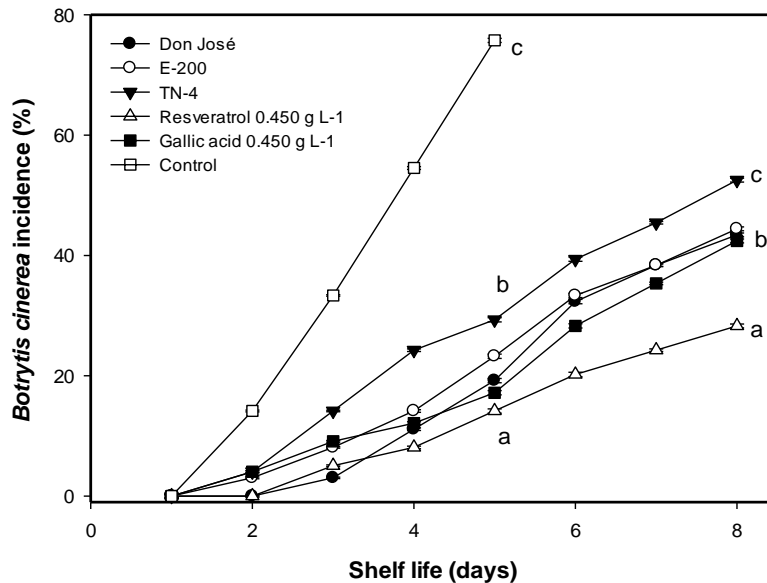


Figure 3. Effect of the extracts of fresh leaves of Mexican wild grapevine accessions, resveratrol or gallic acid in the incidence of inoculated *Botrytis cinerea* in strawberry fruit stored at 19°C and 70% RH. Data are the average of three replications, 70 fruits each. Different literals indicate statistical difference at 0.05 of Tukey test; for better seeing only literals to separate statistical groups are showed.

Figura 3. Efecto de los extractos de hojas frescas de accesiones de vides silvestres de México, resveratrol y ácido gálico en la incidencia de *Botrytis cinerea* inoculada en fresa almacenada a 19°C y 70% de H. R. Los datos son la media de tres repeticiones, 70 frutos por repetición. Letras diferentes indican diferencia estadística con Tukey al 0.05; para mejor observación sólo se muestran las letras que separan a los grupos de medias.

In the literature, it is possible to find reports with higher control of *B. cinerea* by other plant extracts. In strawberry fruit, Vitoratos *et al.* (2013) observed 100% reduction of *B. cinerea* symptoms with the application of 0.05 ml L⁻¹ lemon essential oils. However, present results suggest the reliability of applying extracts of FLWGA to reduce postharvest incidence of grey mould decay in strawberry. The State of Mexico, produces around 7800 ton of strawberry per year (SAGARPA, 2018); recently, its production increased mainly in the municipalities of Villa Guerrero, Zumpahuacán, Coatepec Harinas, Tonatico and Ixtapan de la Sal (Mata, 2018). The southern region of the state of Mexico, is a place where wild grapevines grow extensively (Franco-Mora *et al.*, 2012); and also, several accessions of wild grapevines from this region and other states of Central Mexico are now well established in the germplasm bank at Zumpahuacán (Sabás-Chávez *et al.*, 2016). Thus, strawberry growers might obtain in the region wild grapevine tissues easily and they might help by themselves in ecofriendly and innocuous control of *Botrytis*.

4.2.3.2. Postharvest quality

During the initial 3 DAI, fruit weight loss was similar in all treatments, then, at 4 and 5 DAI, control fruit lost more weight than the rest of treatments (Figure 2). Higher dehydration has been associated to different rates of hormone and sugar metabolism, as well as defense mechanism (Rizzini *et al.*, 2009). It is possible that the antifungal effect of RVS, gallic acid and the extracts of FLWGA reported herein might be the principal reason to reduce the rate of weight loss by reducing water stress. On the other hand, higher water stress was observed by increment in respiration rate and the presence of injuries in kiwi fruit attacked by *B. cinerea* (Cheah *et al.*, 1992). Lower presence of *B. cinerea* might suggest few amount of injuries by this pathogen and by consequence reduction in water loss.

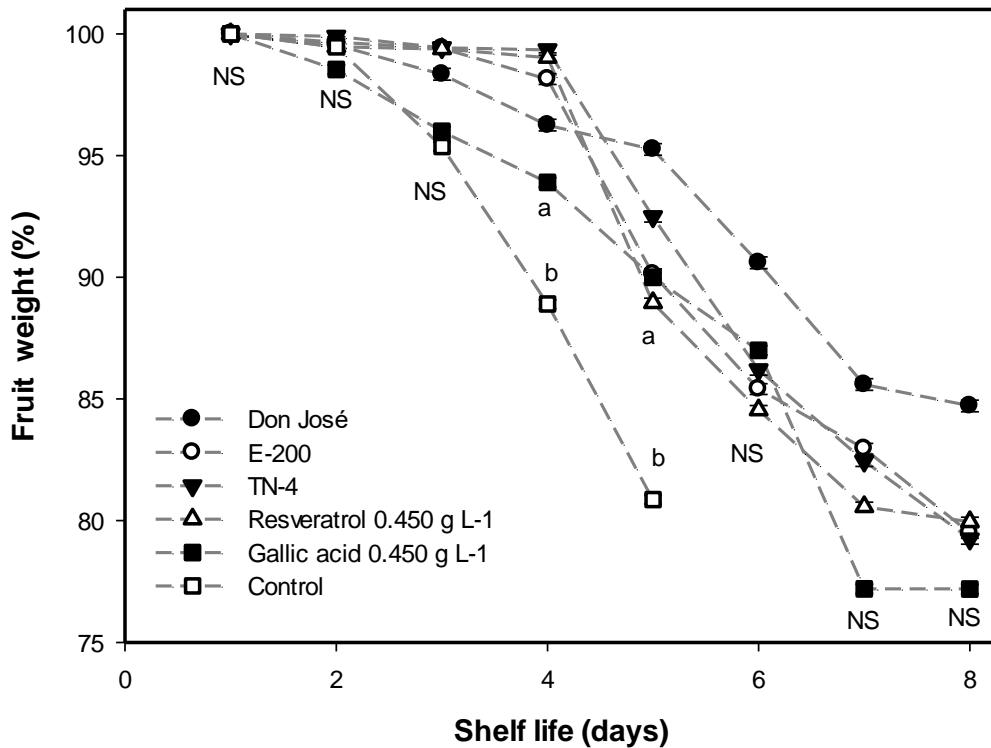


Figure 4. Effect of the extracts of fresh leaves of Mexican wild grapevine accessions, resveratrol or gallic acid in the rate of fruit weight loss during postharvest life of strawberry fruit inoculated with *Botrytis cinerea*. Data are the average of three replications, 10 fruits each. Different literals indicate statistical difference at 0.05 of Tukey test; for better seeing only literals to separate statistical groups are showed.

Figura 4. Efecto de los extractos de hoja fresca de accesiones de vides silvestres mexicanas, resveratrol o ácido gálico en el peso del fruto durante la vida postcosecha de fresa inoculada con *Botrytis cinerea*. Los datos son la media de tres repeticiones, 10 frutos por repetición. Letras diferentes indican diferencia estadística con Tukey a 0.05; para mejor observación sólo se muestran las letras que separan a los grupos de medias.

RVS highly limited berry softening; that is, berries treated with RVS lost less than 1 N of the initial flesh firmness in 8 days of storage, whereas control fruit lost about 2.5 N in 5 DAI. Moreover, during the first 5 DAI, the firmness in the berries treated with extracts of FLWGA and gallic acid was between 0.5 and 1 N lower than the fruit treated with RVS and around 1.5 N over the control fruit (Figure 3). The presence of *B. cinerea* stimulates the activities of fungal enzymes like pectinases, laccases and proteases, as well as activities of cell wall degrading enzymes (Petrasch *et al.*, 2019); in concordance, reduction of peel and pulp softening rate by exogenous application of RVS has been related to delay in polygalacturonase activity (Franco-Mora *et al.*, 2015). In addition, as previously discussed, the presence of different phenolic compounds might, also, reduce the softening fruit rate due to *B. cinerea* by limiting fungus development. RVS as reagent is expensive and difficult to adopt as a reliable technique to increase postharvest quality in horticultural commodities in developing countries. Nevertheless, extracts of FLWGA seem to be a low cost alternative to improve strawberry postharvest conservation, specially reducing fruit softening.

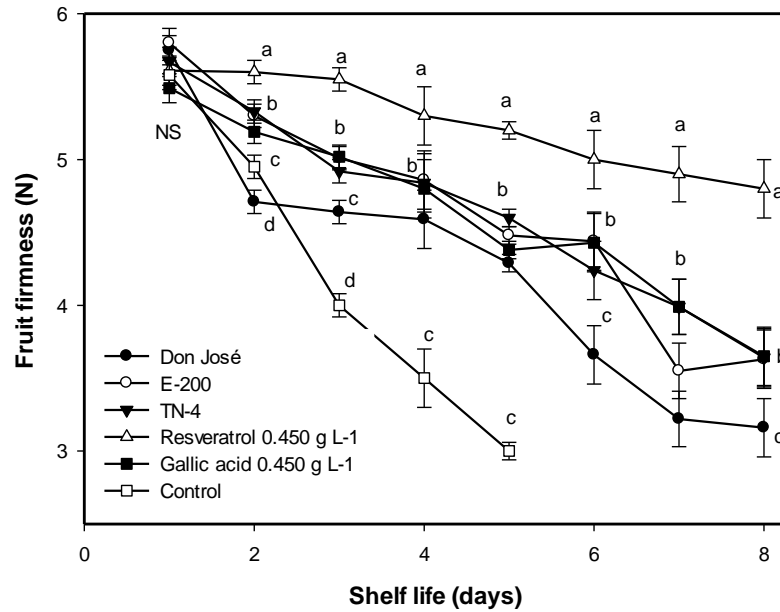


Figure 5. Effect of the extracts of fresh leaves of Mexican wild grapevine accessions, resveratrol or gallic acid in the fruit firmness during postharvest life of *Botrytis cinerea* inoculated strawberry fruit. Data are the average of three replications, 10 fruits each. Different literals indicate statistical difference at 0.05 of Tukey test.

Figura 5. Efecto de los extractos de hojas frescas de accesiones de vides silvestres mexicanas, resveratrol o ácido gálico en la firmeza del fruto durante la vida postcosecha de fresa inoculada con *Botrytis cinerea*. Los datos son la media de tres repeticiones, 10 frutos por repetición. Letras diferentes indican diferencia estadística con Tukey a 0.05.

As discussed previously, reduction of incidence of *Botrytis cinerea*, rates of fruit weight loss and fruit softening resulted in 3 days more of postharvest storage in strawberries treated with RVS or any of the extracts of FLWGA and gallic acid, all in relation to control. However,

application of any of the treatments, excepting water, resulted in lower sweetness compared to control; only control fruit reached 8°Brix, at 5 days of storage, and for the rest of the treatments 7.5°Brix was the maximum content of total soluble solids (Figure 4). In strawberry, cell wall solubilization correlates with increase in fruit sugar content, and those sugars might serve as nutrient for *B. cinerea* (Petrasch *et al.*, 2019). In this work, it is possible to suggest that higher total soluble solids content was related to higher cell wall solubilization and, by consequence, higher fruit softness and more presence of *B. cinerea*. Nevertheless, the content of total soluble solids presented in treated berries is commercially acceptable; strawberry 'Festival' grown in the Valley of Jacona-Zamora, State of Michoacán, Mexico, reached 8.5°Brix at maturity (Martínez-Bolaños *et al.*, 2008), and in Florida, USA, an average of several seasons determined 7.5°Brix for fruit of the same cultivar (Jouquand *et al.*, 2008).

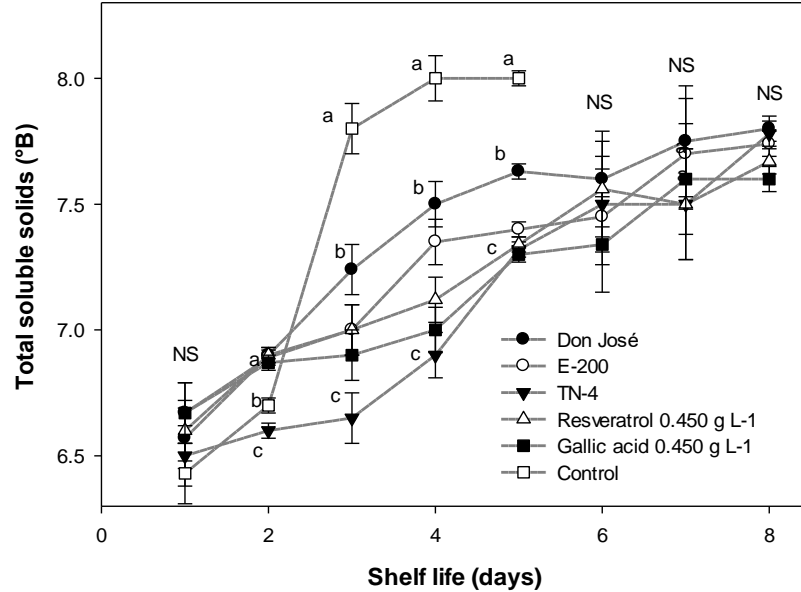


Figure 4. Effect of the extracts of fresh leaves of Mexican wild grapevines, resveratrol or gallic acid in the content of total soluble solids during postharvest life of *Botrytis cinerea* inoculated strawberry fruit. Data are the average of three replications, 10 fruits each. Different literals indicate statistical difference at 0.05 of Tukey test.

Figura 4. Efecto de los extractos de hoja frescas de vides silvestres mexicanas, resveratrol o ácido gálico en el contenido de sólidos solubles totales durante la vida postcosecha de fresa inoculada con *Botrytis cinerea*. Los datos son la media de tres repeticiones, 10 frutos por repetición. Letras diferentes indican diferencia estadística con Tukey a 0.05.

In titratable acidity there was not difference among treatments; at the beginning of the storage, the berries showed 0.35 % citric acid, and that amount descended till around 0.25%. This acidity is considerably lower in relation to other reports on strawberry ‘Festival’; for example, in the Valley of Jacona-Zamora, State of Michoacán, berries presented from 0.46

to 1.34% acidity (Martínez-Bolaños *et al.*, 2008), whereas in Florida, fruits of same cultivar reached 0.75% acidity (Jouquand *et al.*, 2008).

4.2.4. Conclusions

Five days after inoculation with 1×10^6 conidia of *B. cinerea*, control fruit presented symptoms in more than 80% of the fruit. By contraire, berries treated with resveratrol presented 15% and 28% of fruits with symptoms at 5 and 8 days after inoculation. Resveratrol treated berries presented the higher reduction, in relation to control, of fresh weight loss rate and fruit softening rate. Fruits treated with extracts of leaves (7.2% w/v) of wild grapevines, accessions 'Don José' and 'E-200', presented infection of 40% at 8 and 5 days after inoculation, respectively; and, in relation to control fruit, reduction of at least 10% of fresh weight loss, and 1.5 N more firmness. On the other hand, the content of total soluble solids were 0.5°Brix higher in control fruit than the rest of treatments.

5. DISCUSIÓN GENERAL

El efecto inhibitorio del desarrollo de *B.cinerea in vitro e in vivo* que se observó con la adición de los EHVS evaluados puede deberse a la presencia de compuestos fenólicos (Schnee *et al.*, 2013; Mendoza *et al.*, 2013), particularmente a la presencia de ácido galico (Tao *et al.*, 2010), ácido ferulico y resveratrol. Por otro lado, la mayor concentración, posiblemente de orden genético (Katalinić *et al.*, 2009; Tobar-Reyes *et al.*, 2011), de estos polifenoles en la accesión P-178 en relación a E-200 y TN-4 puede asociarse a la respuesta de inhibición que cada accesión presentó. Aunque el modo de acción de los polifenoles contra *B. cinerea* no ha sido totalmente explicado, se ha sugerido que actúan sobre la membrana citoplasmática, produciendo cambios en su permeabilidad, ocasionando liberación del contenido celular, coagulación del material citoplasmático y desorganización de organelos y membrana celular, todo ello inhibe el desarrollo del micelio y evita su esporulación (Adrian y Jeandet, 2012; Minova *et al.*, 2015).

La efectividad *in vitro e in vivo* de EHVS, especialmente P-178 en la ICM, IE e IGC de *B.cinerea*, así como la reducción de la incidencia de *B. cinerea* en frutos de fresa en poscosecha puede estar relacionada con la presencia de otros compuestos fenólicos y la concentración de los mismos. La elucidación completa de los polifenoles presentes en los EHVS y la actividad antifúngica particular de cada compuesto es una actividad científica a desarrollar.

La respuesta *in vitro* de EHVS en ICM, IE e IGC por P-178 12 % fue inferior a lo observado con SW y RVS; sin embargo, la actividad antifúngica de este extracto es importante por ser superior a 70 % para ICM e IE y superior a 60 % de IGC. En este sentido, la ICM es similar a la reportada por El- Kateeb *et al.* (2013) con extractos metanólicos al 0.4 % de hojas de *V. vinifera* 'Thompson seedless' y 'Flame seedless' (entre 63 y 72 %). Además,

los EHVS P-178 7.2 % desarrollaron síntomas de *B. cinerea* en 40% de los frutos evaluados en poscosecha; cuando la aplicación de RVS presenten 25% de frutos con síntomas. En uvas, el RVS endógeno se produce en respuesta al ataque microbiano de *B. cinerea* (Cichewicz *et al.*, 2000) y en este sentido, la aplicación de los EHVS se manifiestan como una opción viable y amigable con el ambiente.

Por otra parte, en la fase *in vivo* la pérdida de peso del fruto durante los primeros tres días fue similar en todos los tratamientos. Sin embargo, al día 4 y 5 el control perdió más peso que el resto de los tratamientos. La firmeza en las bayas tratadas con EHVS y ácido gálico fue entre 0.5 y 1 N menor que la fruta tratada con RVS y alrededor de 1.5 N sobre la fruta de control. Durante los 3 días después de la inoculación (DAI), la pérdida de peso de la fruta fue similar en todos los tratamientos, luego, a los 4 y 5 DAI, la fruta de control perdió más peso que el resto de los tratamientos. Una mayor deshidratación se ha asociado a diferentes tasas de metabolismo, deshidratación y respiración, así como al mecanismo de defensa (Rizzini *et al.*, 2009). Es posible que el efecto antifúngico del RVS, el ácido gálico y los EHVS informados en este documento puedan ser la razón principal para reducir la tasa de pérdida de peso al reducir el estrés hídrico; sin embargo también es posible que actúen como bioreguladores vegetales reduciendo tasas metabólicas. Por otro lado, se observó mayor estrés hídrico por el incremento en la tasa de respiración y la presencia de lesiones en el kiwi (*Actinidia deliciosa*) atacado por *B. cinerea* (Cheah *et al.*, 1992). Una presencia menor de *B. cinerea* podría sugerir pocas lesiones por este patógeno y, por consiguiente, una reducción en la pérdida de agua.

La firmeza en las bayas tratadas con EHVS y ácido gálico fue entre 0.5 y 1 N menor que la fruta tratada con RVS y alrededor de 1.5 N mayor que en frutos control. La presencia de *B. cinerea* estimula las actividades de las enzimas fúngicas como las pectinasas, lacasas y

proteasas, así como las actividades de las enzimas que degradan la pared celular (Petrasch et al., 2019). En concordancia, la reducción de la tasa de ablandamiento de la epidermis y la pulpa mediante la aplicación exógena de RVS se ha relacionado con un retraso en la actividad de la poligalacturonasa (Franco-Mora et al., 2015). Una importancia adicional del uso de los EHVS es que ya que el RVS como reactivo es costoso y difícil de adoptar como una técnica confiable para aumentar la calidad poscosecha en productos hortícolas en los países en desarrollo, los extractos de hojas de vid silvestre parecen ser una alternativa de bajo costo para mejorar la conservación de postcosecha de la fresa, reduciendo especialmente el ablandamiento de la fruta.

Como se discutió anteriormente, la reducción de la incidencia de *Botrytis cinerea*, las tasas de pérdida de peso de la fruta y el ablandamiento de la fruta dieron como resultado 3 días más de almacenamiento posterior a la cosecha en fresas tratadas con RVS o cualquiera de los EHVS y ácido gálico, todo en relación con el control. Sin embargo, la aplicación de cualquiera de los tratamientos, excepto el agua, resultó en una dulzura menor en comparación con el control; solo frutos control alcanzaron 8 ° Brix, a los 5 DAI, y para el resto de los tratamientos, 7.5 ° Brix fue el contenido máximo de SST. En fresa, la solubilización de la pared celular se correlaciona con aumento en el contenido de azúcar de la fruta, y esos azúcares podrían servir como nutrimentos para *B. cinerea* (Petrasch et al., 2019). En este trabajo, es posible sugerir que un mayor contenido de sólidos solubles totales se relacionó con mayor solubilización de la pared celular y, en consecuencia, mayor suavidad del fruto y mayor presencia de *B. cinerea*. Sin embargo, el contenido de SST presentados en las bayas tratadas es comercialmente aceptable; fresas 'Festival' cultivadas en el Valle de Jacona-Zamora, Estado de Michoacán, México, alcanzaron 8.5 ° Brix en la madurez (Martínez-

Bolaños *et al.*, 2008), y en Florida, EE. UU, un promedio de varias estaciones determinó 7.5 ° Brix para frutos del mismo cultivar (Jouquand *et al.*, 2008).

En la acidez titulable no hubo diferencia entre los tratamientos; Al comienzo del almacenamiento, las bayas mostraron 0.35% de equivalentes de ácido cítrico, y esa cantidad descendió hasta alrededor de 0.25%. Esta acidez es considerablemente menor en relación con otros informes sobre fresa ‘Festival’; Por ejemplo, en el Valle de Jacona-Zamora, Estado de Michoacán, las bayas presentaron una acidez de 0.46 a 1.34% (Martínez-Bolaños *et al.*, 2008), mientras que en Florida, las frutas del mismo cultivar alcanzaron acidez de 0.75% (Jouquand *et al.*., 2008).

Los resultados actuales sugieren la confiabilidad de aplicar extractos de hojas de vid silvestre para reducir la incidencia poscosecha de la pudrición ocasionada por *B. cinerea* en la fresa. El Estado de México produce alrededor de 7800 ton de fresa por año (SAGARPA, 2018); recientemente, su producción aumentó principalmente en los municipios de Villa Guerrero, Zumpahuacán, Coatepec Harinas, Tonatico e Ixtapan de la Sal (Mata, 2018). La región sur del estado de México, es un lugar donde las vides silvestres crecen ampliamente (Franco-Mora *et al.*, 2012); y también, varias accesiones de vides silvestres de esta región y otros estados del centro de México ahora están bien establecidas en el banco de germoplasma en Zumpahuacán (Sabás-Chávez *et al.*, 2016). Por lo tanto, los cultivadores de fresas podrían obtener en la región tejidos de vid silvestre fácilmente y podrían ayudar por sí mismos en el control ecológico e inocuo de *Botrytis*.

6. CONCLUSIONES GENERALES

En la prueba *in vitro* los extractos metanólicos de hojas tres accesiones de vid silvestre (*Vitis* spp.) mostraron actividad antifúngica contra *B. cinerea*; particularmente, el extracto de hojas de la accesión P-178 inhibió 70% el crecimiento micelial, 75% la esporulación y 61% la germinación de esporas, siempre en relación al testigo absoluto. Se detectó resveratrol, ácido gálico y ácido ferúlico en los extractos de dicha accesión y se sugiere la participación de estos fenoles contra *Botrytis cinerea*. Resveratrol grado reactivo produjo mejor control del hongo que los extractos de hoja de vid silvestre; generalmente, cualquier dosis de ambos, extracto de hoja de vid silvestre y resveratrol grado reactivo, no superaron la actividad antifúngica de cyprodinil + fludioxonil.

Por otra parte en la evaluación *in vivo* de extractos de hojas de vid silvestre, cinco días después de la inoculación con 1×10^6 conidios de *B. cinerea*, frutos control presentaron síntomas en más del 80% de la fruta. Por el contrario, las bayas tratadas con resveratrol presentaron 15% y 28% de las frutas con síntomas a los 5 y 8 días después de la inoculación. Las bayas tratadas con resveratrol presentaron la mayor reducción, en relación con el control, de la tasa de pérdida de peso fresco y la tasa de ablandamiento de la fruta. Las frutas tratadas con extractos de hojas (7.2% p/v) de vides silvestres, accesiones 'P-178' y 'E-200', presentaron infección del 40% a los 8 y 5 días después de la inoculación, respectivamente; y, en relación con el control de la fruta, la reducción de al menos 10% de la pérdida de peso fresco y 1.5 N más de firmeza. Por otro lado, el contenido de sólidos solubles totales fue 0.5 ° Brix más alto en fruta de control que el resto de tratamientos.

Los resultados obtenidos en la prueba *in vitro* e *in vivo* sugieren la fiabilidad de aplicar los extractos de hojas de vid silvestre para reducir la dispersión e infección efectiva de *B.*

cinerea; además estos extractos parecen ser una alternativa de bajo costo para mejorar la conservación poscosecha de la fresa, especialmente reduciendo el ablandamiento de la fruta

7. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdollahi, R., M. Asghari, M. Esmaili, A. Abdollahi, 2013. Postharvest nitric oxide treatment effectively reduced decay of Selva strawberry fruit. *International Journal of Agriculture and Crop Sciences* 6: 353-355.
- Adrian M and Jeandet P. 2012. Effects of resveratrol on the ultrastructure of *Botrytis cinerea* conidia and biological significance in plant/pathogen interactions. *Fitoterapia* 83:1345-1350. <http://dx.doi.org/10.1016/j.fitote.2012.04.004>
- Adrian, M., P. Jeandet, J. Veneau, L. Weston, R. Basis, 1997. Biological activity of resveratrol, a stilbenic compound from grapevines against *Botrytis cinerea*, the causal agent for gray mold. *Journal of Chemical Ecology* 23: 1689-1702.
- Agrios, G. N. 2004. *Fitopatología*. Limusa. México. 638 p.
- Alonso-Villaverde V, Voinesco F, Viret O, Spring JL and Gindro K. 2011. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiology and Biochemistry* 49:265-274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.12.010>
- Alonso-Villaverde V, Voinesco F, Viret O, Spring JL and Gindro K. 2011. The effectiveness of stilbenes in resistant Vitaceae: ultrastructural and biochemical events during *Plasmopara viticola* infection process. *Plant Physiology and Biochemistry* 49:265-274. <http://dx.doi.org/10.1016/j.plaphy.2010.12.010>
- Amiri, A., S. M. Heath, N. A. Peres, 2013. Phenotypic characterization of multifungicide resistance in *Botrytis cinerea* isolates from strawberry fields in Florida. *Plant Disease* 97: 393-401.

- Apolonio-Rodríguez, I., O. Franco-Mora, M. L. Salgado-Siclán, J. G. Aquino-Martínez, 2017. In vitro inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.) leaves. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 170-185.
- Apolonio-Rodríguez, I., O. Franco-Mora, M. L. Salgado-Siclán, J. G. Aquino-Martínez, 2017. In vitro inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.) leaves. *Revista Mexicana de Fitopatología* 35: 170-185
- Araújo, A. E., Maffia L. A., Mizubuti E. S. G., Alfenas A. C., Capdeville, G. and Grossi, J. A. S. 2005. Survival of *Botrytis cinerea* as mycellium in rose crop debris and as sclerotia in soil. *Fitopatología Brasileira* 30: 516-521.
- Barnett H L and Hunter B B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Ed. Minenesota US: Burgess Publishing Company, New York. 241 p.
- Bennett K, Jent J, Samarakoon UC, Schanabel G. and Faust, JE. 2020. Reduction of *Botrytis cinerea* Infection on Petunia Flowers following Calcium Spray Applications. *Disease and Pest Management; Hortscience* 19: 1-4.
- Blanco-Ulate B, Vincenti E, Cantu D. and Powell ALT. 2016b. Ripening of tomato fruit and susceptibility to *Botrytis cinerea* In: *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems* (Fillinger S., editor; and Elad Y., editor. , eds), pp. 387–412. Cham: Springer International Publishing; 10.1007/978-3-319-23371-0_19.
- Braun PG. and Sutton JC. 1988. Infection cycles and population dynamics of *Botrytis cinerea* in strawberry leaves. *Canadian Journal Plant Pathology* 2: 133–141. 10.1080/07060668809501745

- Bristow PR, McNicol RJ and Williamson B. 1986. Infection of strawberry flowers by *Botrytis cinerea* and its relevance to grey mould development. Annual. Appl. Biology 3: 545–554.
- Brito N, Espino JJ, González C. 2006. The endo-beta-1,4-xylanase xyn11a is required for virulence in *Botrytis cinerea*. Molecular PlantMicrobe Interactions 19: 25–32.
- Brummel DA and Harpster MH. 2001. Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants. Plant Molecular Biology 47:311–340.
- Carisse O. 2016. Epidemiology and aerobiology of *Botrytis* spp In: *Botrytis – The Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*, (Fillinger, S., and Elad, Y., eds), pp. 127–148. Cham: Springer International Publishing; 10.1007/978-3-319-23371-0_7.
- Caruso F, Mendoza L, Castro P, Cotoras M, Aguirre M, Matsuhira B, Isaacs M, Rossi M, Viglianti A and Antonioletti R. 2011. Antifungal activity of resveratrol against *Botrytis* is improved using 2-furyl derivatives PLOS ONE 6:e25421. <http://dx.doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0025421>
- Cheah, L.H., D. E. Irving, A. W. Hunt, V. K. Corrigan, 1992. Effect of hot water dips on botrytis storage rot and quality of kiwi fruit. Postharvest Biology and Technology 2: 1-6.
- Choquer M, Fournier E, Kunz C, Levis C, Pradier JM, Simon A and Viaud M. 2007. *Botrytis cinerea* virulence factors: new insights into a necrotrophic and polyphageous pathogen. FEMS Microbiology Letters 277: 1–10. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2007.00930.x>

- Cichewicz, R. H., S. A. Kouzi, M. T. Hamann, 2000. Dimerization of resveratrol by the grapevine pathogen *Botrytis cinerea*. *Journal of Natural Products* 63: 29-33.
- Ciliberti N, Fermaud M, Languasco L, Rossi V. Influence of fungal strain, temperature, and wetness duration on infection of grapevine inflorescences and young berry clusters by *Botrytis cinerea*. *Phytopathology*. 2015;105: 325–333. 10.1094/PHYTO-05-14-0152-R.
- Compean KL and Ynalvez RA. 2014. Antimicrobial activity of plant secondary metabolites: A review. *Journal of Medicinal Plants Research* 8:204-213. <http://dx.doi.org/10.3923/rjmp.2014.204.213>
- Cotoras M, Mendoza L, Muñoz A, Yáñez K, Castro P and Aguirre M. 2011. Fungitoxicity against *Botrytis cinerea* of a flavonoid isolated from *Pseudognaphalium robustum*. *Molecules* 16:3885-3895. <http://dx.doi.org/doi:10.3390/molecules16053885>
- Crous PW, Braun U and Groenewald JZ. 2007. *Mycosphaerella* is polyphyletic. *Studies in Mycology* 58:1-32. <http://dx.doi.org/10.3114/sim.2007.58.01>
- Cruz, C. 2007. Las uvas (*Vitis*) silvestres: Distribución y usos en la región central de Veracruz, pp. 225-235. En: Nieto AR (Ed.): *Frutales nativos, un recurso filogenético de México*. Ed. Universidad Autónoma Chapingo, Chapingo, México.
- Doehlemann G, Ökmen B, Zhu W, Sharon A. 2017. Plant Pathogenic Fungi, p 703-726. In Heitman J, Howlett B, Crous P, Stukenbrock E, James T, Gow N (ed), *The Fungal Kingdom*. ASM Press, Washington, DC. doi: 10.1128/microbiolspec.FUNK-0023-2016
- Domenech SN, Jimnez-Bemudez S, Matas AJ, Rose JKC, Munoz-Blanco J, Mercado JA and Quesada MA. 2008. Antisense inhibition of a pectate lyase gene supports a role for pectin depolymerization in strawberry fruit softening *Journal of Experimental Botany*. 59: 2769–2779. 10.1093/jxb/ern142.

- Domnez, M.F., A. Esitken, H. Yildiz, S. Ercisli, 2011. Control of *Botrytis cinerea* on strawberry fruit by plant growth promoting bacteria. *Journal of Animal and Plant Science* 21: 758-763.
- Elad Y, Williamson B, Tudzynski P. and Delen N. 2007. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – An introduction In: *Botrytis: Biology, Pathology and Control* (Elad Y., editor; , Williamson B., editor; , Tudzynski P., editor; and Delen N., editor. , eds), pp. 1–8. Dordrecht: Springer, Netherlands; 10.1007/978-1-4020-2626-3_1.
- Elad, Y., B. Williamson, P. Tudzynski, N. Delen, 2007. *Botrytis* spp. and diseases they cause in agricultural systems – An introduction. In. Elad, Y. et al. (eds.), *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Springer, Amsterdam. pp. 413-486.
- El-Khateeb AY, Elsherbiny EA, Tadros LK, Ali SM and Hamed HB. 2013. Phytochemical analysis and antifungal activity of fruit leaves extracts on the mycelial growth of fungal plant pathogens. *Journal of Plant Pathology and Microbiology* 4:1-6. <http://dx.doi.org/10.4172/2157-7471.1000199>
- Ellis MB. 1971. *More dematiaceous hyphomycetes*. Ed. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 608 pp. <http://dx.doi.org/10.1007/BF01989814>
- Enríquez-Guevara EA, Aispuro-Hernández E, Vargas-Arispuro, I y Martínez-Téllez MA. 2010. Oligosacarinas derivadas de pared celular: Actividad biológica y participación en la respuesta de defensa de plantas. *Revista Mexicana de Fitopatología* 28: 144-155. <http://www.scielo.org.mx/pdf/rmfi/v28n2/v28n2a7.pdf>
- Fakhouri, F. M., A. C. A. Casar, M. Mariano, F. Yamashita, M. L. H. Innocentini, V. Soldi, S. M. Martelli, 2014. Effect of a gelatin-based edible coating containing cellulose nanocrystals (CNS) on the quality and nutrient retention of fresh strawberries during

storage. 2nd Int. Conf. Structural Nano Composites. Doi:10.1088/1757-899X/64/1/012024.

Feliziani E. and Romanazzi G. 2016 Postharvest decay of strawberry fruit: Etiology, epidemiology, and disease management. Journal. Berry Research. 6: 47–63. 10.3233/JBR-150113.

Fernández JE., Fernández-Baldo MA., Sansone G., Calvente V., Benuzzi D., Salinas E., Raba J and Sanz MI. 2014. Effect of temperature on the morphological characteristics of *Botrytis cinerea* and its correlated with the genetic variability. Journal of Coastal Life Medicine 2: 543-548.

Fernández-Ortuño D, Grabke A, Bryson PK, Beasley ED, Fall LA and Brannen PM. 2013. First report of fludioxonil resistance in *Botrytis cinerea* from a blackberry field in Georgia. Plant Disease 98:848. <http://dx.doi.org/10.1094/PDIS-10-13-1020-PDN>

Figueroa C.R., Rosli HG, Civello PM, Martínez GA, Herrera R. and Moya-León MA. 2010 Changes in cell wall polysaccharides and cell wall degrading enzymes during ripening of *Fragaria chiloensis* and *Fragaria × ananassa* fruits. Science. Horticulture 4: 454–462

Fillinger S, Elad Y. 2016. *Botrytis*-the Fungus, the Pathogen and its Management in Agricultural Systems. Pub. Springer, New York.

Franco MO, Cruz CJG, González HA y Pérez LDJ. 2012. Distribución y caracterización. En: Franco MO, Cruz CJG. (Eds.): La vid silvestre en México. Actualidades y potencial, pp. 42-67. México: Universidad Autónoma del Estado de México-Altres-Costa Amic Editores.

https://www.researchgate.net/publication/262014593_La_vid_silvestre_en_Mexico_Actualidades_y_potencial

Franco, M. O., J. G. Cruz, A. González, D. J. Pérez, 2012. Distribución y caracterización. In. Franco, M. O., J. G. Cruz (eds.), La Vid Silvestre en México. Actualidades y Potencial. UAEM-ACA, Toluca. pp. 42-67.

Franco-Mora O., S. Aguirre-Ortega, A. González-Huerta, A. Castañeda-Vildózola, E. J. Morales-Rosales, D. J. Pérez-López, 2012. Characterization of *Vitis cinerea* Engelm. ex Millardet fruits from the southern region of the State of Mexico. Genetic Resources and Crop Evolution 59: 1899-1906.

Franco-Mora, O., A. A. Morales-Pérez, E. J. Morales-Rosales, A. Castañeda-Vildózola, J. R. Sánchez-Pale, 2015. Preharvest treatments with resveratrol and benzylaminopurine helps to preserve postharvest quality in cherimoya (*Annona cherimola* Mill.). Journal of Agricultural and Life Science 2: 16-24.

Fraternale, D., D. Ricci, G. Verardo, A. Gorassini, V. Stocchi, P. Sestili, 2015. Activity of *Vitis vinifera* tendrils extract against phytopathogenic fungi. Natural Product Communication 10: 1037-1042.

Gholamnezhad J. 2019. Effect of plant extracts on activity of some defense enzymes of apple fruit in interaction with *Botrytis cinerea*. Journal of Integrative Agriculture 18: 115-123.

Gobierno de México. 2002. Productos alimenticios no industrializados para consumo humano – fruta fresca- fresa (*Fragaria* × *ananassa*) – Especificaciones y métodos de prueba. Secretaria de Economía, Cd. México.

- Guerrero RF, Puertas B, Fernández MI, Palma M and Cantos-Villar E. 2010. Induction of stilbenes in grapes by UV-C: Comparison of different subspecies of *Vitis*. *Innovative Food Science Emerging Technology* 11:231-238. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ifset.2009.10.005>
- Holz G, Coertze S and B. Williamson. 2004. The ecology of *Botrytis* on plant surfaces. pages 9-27. In: Y Elad, B. Williamson, P Tudzynski, and N. Delen (eds.). *Botrytis: Biology, Pathology and Control*. Kluwer Academic Publishers. Dor-drecht. The Netherlands. 428 pp.
- Howard RJ and Valent B. 1996. Breaking and entering: Host penetration by the fungal rice blast pathogen *Magnaporthe grisea*. *Annual. Review Microbiology* 50 491–512
- Jouquand, C., C. Chandler, A. Plotto, K. Goodner, 2008. A sensory and chemical analysis of fresh strawberries over harvest dates and seasons reveals factors that affect eating quality. *Journal of the American Society for Horticultural Sciences* 133: 859-867.
- Kars I, McCalman M, Wagemakers L and van Kan JA. 2005b. Functional analysis of *Botrytis cinerea* pectin methylesterase genes by PCR-based targeted mutagenesis: Bcpme1 and Bcpme2 are dispensable for virulence of strain B05-10. *Molecular Plant Pathology* 6: 641–652.
- Katalinić V, Generalić I, Skroza D, Ljubenkov I, Teskera A, Konta I and Boban M. 2009. Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera* leaves extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 1:7-15. <https://www.researchgate.net/publication/44201407>
- Katalinić V, Generalić I, Skroza D, Ljubenkov I, Teskera A, Konta I and Boban M. 2009. Insight in the phenolic composition and antioxidative properties of *Vitis vinifera*

- leaves extracts. *Croatian Journal of Food Science and Technology* 1:7-15.
<https://www.researchgate.net/publication/44201407>
- Khalifa, I., H. Barakat, H. A. El-Mansy, S.A. Soliman, 2016. Improving the shelf-life stability of apple and strawberry fruits applying chitosan-incorporated olive oil processing residues coating. *Food Packing and Shelf Life* 9: 10-19.
- Knee M, Sargent JA and Osborne DJ. 1977. Cell wall metabolism in developing strawberry fruits. *Journal of Experimental Botany* 28: 377–396.
- Kubicek CP, Starr TL, Glass NL. 2014. Plant cell wall-degrading enzymes and their secretion in plant-pathogenic fungi. *Annual Review of Phytopathology Journal of Experimental Botany* 52: 427–451.
- Langcake, P., W. McCarthy, 1979. The relationship of resveratrol production to infection of grapevine leaves by *Botrytis cinerea*. *Vitis* 18: 244-253.
- Latorre B and Rioja M. 2002. Efecto de la temperatura y de la humedad relativa sobre la germinación de conidias de *Botrytis cinerea*. *Ciencia e Investigación Agraria* 2: 67-71.
- Li H, Yong C, Zhanquan Z, Bioqiang L, Guozheng Q and Shiping T. 2018. Pathogenic mechanisms and control strategies of *Botrytis cinerea* causing post-harvest decay in fruits and vegetables. *Food Quality and Safety* 3: 111–119.
- Li, B. Q., Wang, W. H., Zong, Y. Y., Qin, G. Z., Tian, S. P. (2012). Exploring pathogenic mechanisms of *Botrytis cinerea* secretome under different ambient pH based on comparative proteomic analysis. *Journal of Proteome Research*, 11: 4249–4260

- Liu, S., X. Shao, Y. Wei, Y. Li, F. Xu, H. Wang, 2016. *Solidago canadensis* L. essential oil vapor effectively inhibits *Botrytis cinerea* growth and preserves postharvest quality of strawberry as a food model system. *Frontiers in Microbiology* 7: Ar. 1179.
- Lorrain B, Ky I, Pechamat L and Teissedre PL. 2013. Evolution of analysis of polyphenols from grapes, wines and extracts. *Molecules* 18:1076-1100. <http://dx.doi.org/10.3390/molecules18011076>
- Manteau, S., Abouna, S., Lambert, B., Legendre, L. (2003). Differential regulation by ambient pH of putative virulence factor secretion by the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *FEMS Microbiology Ecology* 43: 359–366
- Martínez-Bolaños, M., D. Nieto-Angel, D. Téliz-Ortiz, J. Rodríguez-Alcazar, M. T. Martínez-Damian, H. Vaquera-Huerta, O. Carrillo-Mendoza, 2008. Comparación cualitativa de fresas (*Fragaria* × *ananassa* Dutch.) de cultivares mexicanos y estadounidenses. *Revista Chapingo Serie Horticultura* 14: 113-119.
- Mata, M. 2018. Estado de México, cuarto lugar en producción de fresa. *Milenio*. 21 marzo 2018. Disponible en: <https://www.pressreader.com/mexico/milenio-edo-de-mexico/20180321/281689730348980>
- Mehli, L., T. D. Kjellsen, F. M. Dewey, A. M. Hietala, 2005. A case study from the interaction of strawberry and *Botrytis cinerea* highlights the benefits of comonitoring both partners at genomic and mRNA level. *New Phytologist* 168: 465-474.
- Mellersh, D. G., Foulds, I. V., Higgins, V. J., Heath, M. C. (2002). H₂ O₂ plays different roles in determining penetration failure in three diverse plantfungal interactions. *The Plant Journal: for Cell and Molecular Biology*, 29: 257–268.

- Mendoza L, Yáñez K, Vivanco M, Melo R and Cotoras M. 2013. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops and Products* 43:360-364. <http://dx.doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.07.048>
- Mendoza, L., K. Yáñez, M. Vivanco, R. Melo, M. Cotoras, 2013. Characterization of extracts from winery by-products with antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Industrial Crops Production* 43: 360-364.
- Mercier, J., Kong, M., and Cook, F. 2010. Fungicide resistance among *Botrytis cinerea* isolates from California strawberry fields. Online. *Plant Health Progress* doi:10.1094/PHP-2010-0806- 01-RS.
- Minova S, Seđićna R, Voitkâne S, Metla Z, Daugavietis M and Jankevica L. 2015. Impact of pine (*Pinus sylvestris* L.) and (*Picea abies* (L.) Karst.) bark extracts on important strawberry pathogens. *Proceedings of the Latvian Academy of Sciences* 69: 62-67. <http://dx.doi.org/10.1515/prolas-2015-0008>
- Montes-Belmont R. 2009. Diversidad de compuestos químicos producidos por las plantas contra hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Micología* 29:73-82.
- Moo-Koh FA, Alejo CJ, Reyes-Ramírez A, Tun-Suárez J M, Sandoval-Luna R y Ramírez-Pool JA. 2014. Actividad *in vitro* del extracto acuoso del *Bonellia flammea* contra hongos fitopatógenos. *Agrociencia* 48:833-845. <http://www.colpos.mx/agrocien/Bimestral/2014/nov-dic/art-6.pdf>
- Mora VHF, Franco-Mora OF, López-Sandoval JA, Pérez-López DJ y Balbuena-Melgarejo A. 2009. Characterization of wild plum (*Ximenia americana* L. var. americana; Olacaceae) fruit growing at Tepexi de Rodríguez, Puebla, Mexico. *Genetic Resources and Crop Evolution* 56:719-727. <http://dx.doi.org/10.1007/s10722-009-9422-6>
- Neri F, Cappellin L, Spadoni A. 2015. Role of strawberry volatile organic compounds in the development of *Botrytis cinerea* infection. *Plant Pathology* 6:709–717.

- Pan, J., A. R. Vicente, G. A. Martínez, A. R. Chaves, P. M. Civello, 2004. Combined use of UV-C irradiation and heat treatment to improve postharvest life of strawberry fruit. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 84: 1831-1838.
- Panebianco A, Castello I, Cirvilleri G, Perrone G, Epifani F, Ferrara M, Polizzi G, Walters DR and Vitale A. 2015. Detection of *Botrytis cinerea* field isolates with multiple fungicide resistance from table grape in Sicily. *Crop Protection* 77:65-73. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cropro.2015.07.010>
- PatzkeH and Schieber, A. 2018. Growth-inhibitory activity of phenolic compounds applied in an emulsifiable concentrate - ferulic acid as a natural pesticide against *Botrytis cinerea*. *Food Research International* 113: 18-23. [doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.062](http://dx.doi.org/10.1016/j.foodres.2018.06.062)
- Petrasch S, Silva CJ, Mesquida-Pesci SD, Gallegos G, Van den Abeele C, Papin V, Fernandez-Acero FJ, Knapp SJ and Blanco-Ulate B. 2019. Infection strategies deployed by *Botrytis cinerea*, *Fusarium acuminatum*, and *Rhizopus stolonifer* as a function of tomato fruit ripening stage. *Front. Plant Sci.* 10, 223. [10.3389/fpls.2019.00223](https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00223).
- Petrasch, S., S. J. Knapp, J. A. L. Van Kan, B. Blanco-Ulate, 2019. Grey mould of strawberry, a devastating disease caused by the ubiquitous necrotrophic fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology*. DOI:10.1111/mpp.12794.
- Piesik D, Miler N, Lemańczyk G, Bocianowski J and Buszewski B. 2015. *Botrytis cinerea* infection in three cultivars of chrysanthemum in ‘Alchemist’ and its mutants: Volatile induction of pathogen-infected plants. *Scientia Horticulturae* 193:127-135. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scienta.2015.06.040>

- Prusky D. and Lichter A. (2007) Activation of quiescent infections by postharvest pathogens during transition from the biotrophic to the necrotrophic stage. *FEMS Microbiol. Lett.* 268(1), 1–8. 10.1111/j.1574-6968.2006.00603.x
- Reddy, M. V. B., K. Belkacemi, R. Corcuff, F. Castaigne, J. Arul, 2010. Effect of pre-harvest chitosan sprays on post-harvest infection by *Botrytis cinerea* and quality of strawberry fruit. *Postharvest Biology and Technology* 20: 39-51.
- Rizzini, F., C. Bonghi, P. Tonutti, 2009. Postharvest water loss induced marked changes in transcript profiling in skins of wine grape berries. *Postharvest Biology and Technology* 52: 247-253.
- Romanazzi G, Sanzani SM, Bi Y, Tian SP, Gutierrez-Martinez P and Alkan N. 2016. Induced resistance to control postharvest decay of fruit and vegetables. *Postharvest Biology and Technology* 122: 82–94.
- Rosli HG, Civello PM and Martínez GA 2004. Changes in cell wall composition of three *Fragaria x ananassa* cultivars with different softening rate during ripening. *Plant Physiol. Biochem* 42: 823–831. 10.1016/j.plaphy.2004.10.002.
- Sabás-Chavez CC, Franco-Mora O, Rubí-Arriaga, Sánchez-Pale JR, Castañeda-Vildózola, 2016. Tamaño y dulzor del fruto de ocho accesiones de *Vitis* spp. en tres años continuos. *Nova Scientia* 8: 233-248.
- Sabás-Chavez, C. C., O. Franco-Mora, A. Castañeda-Vildózola, J. G. Cruz-Castillo, 2018. An approach to the model for conservation of Central Mexico native grapevines. *Natural Resources Conservation and Research*. 1: 1-10.

SAGARPA. 2018. Atlas agroalimentario 2012-2018. Gobierno de México, Cd. México.

Salami, P., H. Ahmadi, A. Keyhani, M. Sarsaifee, 2010. Strawberry post-harvest energy losses in Iran. *Researcher* 2: 67-73.

Salgado M, Rodríguez-Rojo S, Alves-Santos FM and Cocero MJ. 2015. Encapsulation of resveratrol on lecithin and β -glucans to enhance its action against *Botrytis cinerea*. *Journal of Food Engineering* 165:13-21. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2015.05.002>

SAS Institute. 2002. SAS/STAT software: Version 9.0. SAS Institute Inc. Cary, NC.

Schnee S, Queiroz EF, Voinesco F, Marcourt L, Dubuis P. H, Wolfender JL and Gindro K 2013. *Vitis vinifera* Canes, a new source of antifungal compounds against *Plasmopara viticola*, *Erysiphe necator*, and *Botrytis cinerea*. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 61:5459-5467. <http://dx.doi.org/10.1021/jf4010252>

Schumacher J. 2016. Signal transduction cascades regulating differentiation and virulence in *Botrytis cinerea* In: *Botrytis – the Fungus, the Pathogen and Its Management in Agricultural Systems*, pp. 247–67. Cham: Springer International Publishing; 10.1007/978-3-319-23371-0_13

Senhaji B, Chebli B, Mayad E. H, Ferji Z. 2014. Antifungal activity of medicinal plants extracts against *Botrytis cinerea* the causal agent of gray mold on tomato. *Journal of Biology Agriculture and Healthcare* 4:141-147.

Siegmund U, Marschall R, Tudzynski P. 2015. Bcnoxd, a putative ER protein, is a new component of the NADPH oxidase complex in *Botrytis cinerea*. *Molecular Microbiology* 95: 988–1005.

- Soylu EM, Kurt Ş and Soyly S. 2010. *In vitro* and *in vivo* antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. International Journal of Food Microbiology 143:183-189. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2010.08.015>
- Tao ST, Zhang SL, Beldica C, Tsao R, Charles MT, Yang R and Khanizadeh S. 2010. *In vitro* antifungal activity and mode of action of selected antioxidants on *Botrytis cinerea*. Archives of Phytopathology and Plant Protection 43: 1564–1578.
- Ten Have A, Mulder W, Visser J and Van Kan JA 1998. The endopolygalacturonase gene Bcpg1 is required for full virulence of *Botrytis cinerea*. Mol Plant Microbe Interact 11: 1009–1016
- Tian SP, Qin GZ y Xu Y, 2004. Survival of antagonistic yeasts under field conditions and their biocontrol ability against postharvest diseases of sweet cherry. Postharvest Biology and Technology 33: 327-331.
- Tobar-Reyes JR. Franco-Mora O, Morales-Rosales EJ y Cruz-Castillo JG. 2009. Contenido de resveratrol en hojas de vides silvestres (*Vitis* spp.) mexicanas. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias 41: 127-37. www.redalyc.org/articulo.oa?id=382837645010
- Tobar-Reyes JR. Franco-Mora O, Morales-Rosales EJ y Cruz-Castillo JG. 2011. Fenoles de interés farmacológico en vides silvestres (*Vitis* spp.) de México. Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas 10:167-172. www.redalyc.org/articulo.oa?id=85617384011
- Tobar-Reyes JR. Franco-Mora O, Morales-Rosales EJ y Cruz-Castillo JG. 2009. Contenido de resveratrol en hojas de vides silvestres (*Vitis* spp.) mexicanas. Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias 41: 127-37. www.redalyc.org/articulo.oa?id=382837645010

- Van Kan JAL, Stassen JHM, Mosbach A, Van Der Lee TAJ, Faino L, Farmer AD, Papatirou DG, Zhou S, Seidl MF and Cottam E. 2017. A gapless genome sequence of the fungus *Botrytis cinerea*. *Molecular Plant Pathology* 18:75-89.
- Vio-Michaelis S., Apablaza-Hidalgo G, Gómez M, Pena-Vera R and Montenegro G. 2012. Antifungal activity of tree Chilean plant extracts on *Botrytis cinerea*. *Botanical Sciences* 90:179-183. <http://dx.doi.org/10.17129/botsci.482>
- Vitoratos, A., D. Bilalis, A. Karkanis, A. Efthimidou, 2013. Antifungal activity of plant essential oils against *Botrytis cinerea*, *Penicillium italicum*, and *Penicillium digitatum*. *Notulae Botanicae Horti Agrobotanici* 41: 86-92.
- Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JA. 2007. *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular Plant Pathology* 8: 561–580.
- Wu CF, Yang JY, Wang F and Wang X. 2013. Resveratrol: botanical origin, pharmacological activity and applications. *Chinese Journal of Natural Medicines* 11:1-15. [http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364\(13\)60001-1](http://dx.doi.org/10.1016/S1875-5364(13)60001-1)
- Wubben JP, Ten Have A, Van Kan JA, Visser J. 2000. Regulation of endopolygalacturonase gene expression in *Botrytis cinerea* by galacturonic acid, ambient pH and carbon catabolite repression. *Current Genetics* 37: 152–157
- Xu W-T, Huang K-L, Guo F, Qu W, Yang JJ, Liang Z-H and Luo YB. 2007. Postharvest grapefruit seed extract and chitosan treatments of table grapes to control *Botrytis cinerea*. *Postharvest Biology and Technology* 46:86-94. <http://dx.doi.org/10.1016/j.postharvbio.2007.03.019>
- Yadav IC, Devi NL, Syed JH, Cheng Z, Li J, Zhang G and Jones KC. 2015. Current status of persistent organic pesticides residues in air, water, and soil, and their possible effect

on neighboring countries: A comprehensive review of India. *Science of the Total Environment* 511:123-137. <http://dx.doi.org/10.1016/j.scitotenv.2014.12.041>

Zhang ZQ, Li H, Qin G Z, He C, Li BQ, Tian SP. 2016. The MADS-box transcription factor *Bcmads1* is required for growth, sclerotia production and pathogenicity of *Botrytis cinerea*. *Scientific Reports* 6: 33901.

Zhang ZQ, Qin GZ, Li BQ, Tian SP. 2014a. Infection assays of tomato and apple fruit by the fungal pathogen *Botrytis cinerea*. *BioProtocol* 23: e1311.