

04-009

EVALUATION OF THE FUNGAL EFFECT OF SECHIUM COMPOSITUM TO DESIGN ALTERNATIVES TO THE CHEMICAL CONTROL OF BOTRYTIS CINEREA.

Gordillo Salinas, Laura Simeona ⁽¹⁾; Arévalo Galarza, Ma. de Lourdes ⁽¹⁾; Soto Hernández, Ramón Marcos ⁽¹⁾; Cadena Iñiguez, Jorge ⁽¹⁾; Cisneros Solano, Víctor Manuel ⁽²⁾

⁽¹⁾ Colegio de Postgraduados, ⁽²⁾ Universidad Autónoma Chapingo

The production of vegetables generates high financial costs for the control of fungal diseases. Mexico exports chayote (*Sechium edule*) and the international certification of rural production units restricts the use of many fungicides. The effect of *Sechium compositum* juice (inedible) was evaluated in vitro to inhibit the growth of *Botrytis cinerea*, which affects production and postharvest. The content of cucurbitacins, phenolic acids and flavonoids of the juice was determined. Ten concentrations of juice, an absolute control and fungicide (Swicht® (cyprodinil + fludioxonil) as a chemical control) were tested in potato-dextrose-agar (PDA) culture medium. The sensitivity of *B. cinerea* to juice was determined by growth inhibition mycelial and spore germination. The juice registered 874.80 mg kg⁻¹ of cucurbitacin I; 730.82 mg kg⁻¹ of phenolic acids (chlorogenic and gallic); and 577.82 mg kg⁻¹ of flavonoids (mirecetin and naringenin). 0 and 5.0% inhibited mycelial growth (≥80%), and from 7.5 to 40% there was no growth. The juice inhibited 100% of conidia germination at any concentration. The above facilitates the design and formulation of biological fungicides. These results They are part of the rural productive diversification project through the management and enhancement of an underutilized plant genetic resource.

Keywords: Cucurbitaceae; fungicides; wild chayotes; secondary metabolites; cucurbitacins.

EVALUACIÓN DEL EFECTO FÚNGICO DE SECHIUM COMPOSITUM PARA DISEÑAR ALTERNATIVAS AL CONTROL QUÍMICO DE BOTRYTIS CINEREA.

La producción de hortalizas genera altos costos financieros por el control de enfermedades fúngicas. México exporta chayote (*Sechium edule*) y la certificación internacional de unidades rurales de producción restringe el uso de muchos fungicidas. Se evaluó in vitro el efecto del jugo de *Sechium compositum* (no comestible) para inhibir el crecimiento de *Botrytis cinerea* que afecta la producción y postcosecha. Se determinó el contenido de cucurbitacinas, ácidos fenólicos y flavonoides del jugo. En medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) se probaron diez concentraciones de jugo, un testigo absoluto y fungicida (Swicht® (ciprodinil + fludioxonil) como control químico. La sensibilidad de *B. cinerea* al jugo se determinó por inhibición de crecimiento micelial y germinación de esporas. El jugo registró 874.80 mg kg⁻¹ de cucurbitacina I; 730.82 mg kg⁻¹ de ácidos fenólicos (clorogénico y gálico); y 577.82 mg kg⁻¹ de flavonoides (mirecetina y naringenina). El jugo en 1.0 y 5.0% inhibió el crecimiento micelial (≥80%), y de 7.5 a 40% no hubo crecimiento. El jugo inhibió 100% de germinación de conidios en cualquier concentración. Lo anterior facilita el diseño y formulación de fungicidas biológicos. Estos resultados forman parte del proyecto de diversificación productiva rural mediante gestión y potenciación de un recurso fitogenético subutilizado.

Palabras claves: Cucurbitáceas; fungistático; chayotes silvestres; cucurbitacinas.

Correspondencia: Jorge Cadena Iñiguez jocadena@gmail.com



© 2021 by the authors. Licensee AEIPRO, Spain. This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>).

1. Introducción

Los fungicidas químicos han sido utilizados para la producción agrícola, aumentando la protección de los cultivos y rendimiento. Sin embargo, estas acciones han desarrollado resistencia en los fitopatógenos, contaminando el medio ambiente y afectando la salud humana, de tal forma que es necesario buscar alternativas al uso de fungicidas tradicionales (De Rodríguez *et al.*, 2011)

Las regiones de México con sus diferentes climas hacen factible la variabilidad de plantas silvestres que se desarrollan en condiciones climáticas extremas (Adame *et al.*, 2000). Estas especies silvestres presentan compuestos diversos entre los que destacan polifenoles, saponinas, triterpenos y flavonoides, que han probado tener uso terapéutico como propiedades antiinflamatorias, antifúngicas, antioxidantes y antiproliferativas (Harborne, 1998; Zuanazzi *et al.*, 2004).

Sechium compositum (Cucurbitaceae), es una de las 10 especies del género *Sechium* P. Br., procedente de Mesoamérica, que se encuentra en estado silvestre (Cadena *et al.*, 2007). Los frutos de esta especie se caracterizan por el sabor amargo, atribuido a las cucurbitacinas (triterpenos tetracíclicos) además de una amplia gama de flavonoides y saponinas. Estudios recientes han mostrado propiedades antiproliferativas en células animales en los frutos de *S. compositum* (Aguñiga *et al.*, 2015). Bar-Nun *et al.* (1990) demostraron la actividad fungistática de la cucurbitacina I en frutos de pepino (*Cucumis lattu* L.) y hojas de col (*Brassica oleracea*) inoculados con *B. cinerea*. Song *et al.* (2011) evaluaron la actividad de los triterpenos de *Astilbe myriantha* Diels contra *C. gloeosporioides*, demostrando actividad fungistática, además, observaron que aquellos triterpenos que poseen grupos hidroxilo en C-6 y C-24 y el grupo funcional carboxílico C-27, poseían actividad contra hongos patógenos.

Se ha clasificado a *Botrytis cinerea* Pers.: Fr., como el segundo hongo más importante por el número de especies que ataca, su adaptabilidad, y los costos que representan su control (Dean *et al.*, 2012). Investigaciones recientes se enfocan a la búsqueda de compuestos con actividad fungicida, amigables con el ambiente y con baja cantidad de compuestos xenobióticos.

Por lo anterior como parte del proyecto de diversificación productiva rural que busca la potenciación de un recurso fitogenético subutilizado se probó la actividad fungicida del jugo de frutos de *Sechium compositum* sobre *Botrytis cinerea* en condiciones *in vitro* y plantear su uso potencial en formulaciones como agente fungicida o fungistático, además de realizar pruebas de liberación con microcápsulas mediante el método de coacervación a base de jugo de los frutos de *S. compositum* como opción de diseño de nuevos productos.

2. Materiales y métodos

Frutos de *S. compositum* se cosecharon en madurez fisiológica. Los frutos se lavaron con agua corriente; se desinfectaron en solución de hipoclorito de sodio (1 %) por 3 min; se enjuagaron dos veces en agua destilada y se secaron con toallas absorbentes estériles. Posteriormente los frutos se cortaron en trozos pequeños, se procesaron en una máquina de extracción de aceite prensado en frío (modelo OPM-500, JOOSHUN™, Guangdong China). El jugo extraído se centrifugó a 2150

g por 10 min. El sobrenadante resultante se almaceno a 4 °C, para la eliminación de bacterias se aplicó luz UV-C a dosis de ~4 kJ m⁻².

2.1. Control in vitro de *Botrytis cinerea*, con jugo de *S. compositum*

Doscientos mililitros de medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) se mezclaron antes de su solidificación con cada una de las concentraciones del jugo (Tabla 1) y se vaciaron en cajas de Petri (9 cm de diámetro) estéril, para solidificación. Posteriormente en el centro de cada caja se colocó un disco de 5 mm de diámetro de PDA con micelio de la cepa de *B. cinerea* de 4 d de edad. El testigo químico fue ciprodinil + fludioxonil (Switch®) (2 g L⁻¹), mientras que el testigo absoluto fue medio PDA solo. Las cajas de Petri se incubaron a 23 °C, y el diámetro ecuatorial del hongo se midió cada 24 h con vernier digital hasta que el testigo absoluto cubrió la caja Petri.

Tabla 1. Concentraciones de jugo de frutos de *Sechium compositum* probado para la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *B. cinerea*.

Tratamiento	Componente	Concentración (%)
1		1
2		2.5
3		5
4	Jugo de frutos de <i>S. compositum</i>	7.5
5		10
6		15
7		20
8		25
9		30
10		40
11	Testigo absoluto (solo PDA)	0
12	Testigo químico [PDA + Ciprodinil + Fludioxonil (SWITCH®)]	2 g L ⁻¹

2.2. Germinación de esporas

Para determinar el efecto del jugo en la germinación de esporas de ambas especies, se utilizaron caja Petri de diámetro de 6 cm a los que se le agregaron 4 mL de medio de cultivo PDA. Antes de que el PDA solidificara se mezcló con el jugo vegetal hasta lograr la homogenización de cada concentración.

Posteriormente se colocaron 20 µL de suspensión de 1x10⁶ esporas por mL (20,000 esporas) de cada hongo en sus respectivos tratamientos. Se evaluó la germinación a las 3, 6, 9, 12, 15 y 24 h (los datos son adimensionales, ya que fueron obtenidos del análisis del área bajo la curva del progreso del porcentaje de germinación) empleando microscopio compuesto (Nikon Eclipse

E400® EE.UU.). Una espora fue considerada germinada cuando el largo de su tubo germinativo alcanzó la mitad del diámetro de la espora.

2.3. Elaboración de microcápsulas

Se utilizó el método de coacervación simple, que consiste en mezclar el material encapsulante (quitosano) y el compuesto de interés (jugo de chayote). Posteriormente, se realiza un cambio de fuerza iónica que provoca una fase de separación de la cobertura y captura del material activo disperso. Al final la cobertura es solidificada a través de un material entrecruzante (glutaraldehído) (Salazar, 2017; Akbuga y Bergisadi, 1996).

El proceso inició preparando una solución de quitosano al 3 % en 100 mL de ácido acético al 5 % que se llevó a agitación por 8 h en una parrilla de agitación (Fisher Scientific, USA), después se usó un agitador digital (Caframo, Canadá) a 1100 rpm por 10 h. Posteriormente se llevó la solución a la autoclave bajo 120 °C y 15 psi por 15 min. Por último, la solución se filtró, usando una bomba de vacío con una presión de succión de 4 cm de mercurio.

Después se preparó una solución madre de jugo de chayote al 20 %, y se colocaron en un tubo Eppendorf 200 µL y se diluyeron en 800 µL de agua destilada, después se tomó la solución del jugo y se mezcló en 9 mL de quitosano, que fue colocada en un tubo falcon de 15 mL y se agitó en un vortex (Scientific Industries, Vortex-2 Genie, USA) por 10 segundos para homogenizar la mezcla. Se dejó reposar por 5 min.

2.4. Fase continua (adición del agente entrecruzante)

Por otro lado, se colocaron 350 mL de aceite de maíz (Mazola®) en un matraz con capacidad de 500 mL y se añadieron 1.5 mL del emulsionante Spam 80, la mezcla se llevó a una agitación de 1100 rpm con el agitador digital (caframo, Canadá). Una vez que la mezcla se homogeneizó, se agregaron 10 mL de la fase dispersa, colocando una gota cada 10 segundos. Posteriormente se agregaron 7.5 mL de glutaraldehído al 25 %, dividido en 5 sesiones (cada 15 min), agregando 1 gota cada 3 segundos. Una vez terminado de agregar el glutaraldehído, se redujo la agitación a 850 rpm y se mantuvo así por dos horas, y se dejó reposar por 75 min.

2.5. Lavado y secado de las microcápsulas

Se realizó utilizando una bomba de vacío con una presión de succión de 4 cm de mercurio conectado un matraz kitasato, un embudo büchner y papel filtro Wattman No. 3. Se inició el lavado con éter de petróleo para eliminar el aceite y después se lavó con agua para eliminar el glutaraldehído, este proceso se repitió para eliminar por completo el aceite y el glutaraldehído. El secado de las microcápsulas se realizó por aire a presión, colocando las microcápsulas húmedas en un tubo falcon de 50 mL sostenida sobre un vortex y conectado a una bomba de vacío, usando 5 lb de presión, por un lapso de 4 h. Las microcápsulas se almacenaron en bolsas de polipapel dentro de cajas Petri de vidrio selladas con papel parafilm.

2.6. Caracterización de las microcápsulas

Se utilizó un microscopio compuesto Rossbach MG-11T con cámara digital Canon EOS 50D, para observar las microcápsulas después de ser lavadas y cuando ya estaban secas, se observó su forma y tamaño de 40 repeticiones.

2.7. Pruebas de liberación de las microcápsulas

Se utilizó un espectrofotómetro (Genesys 10 UV, Thermo Fisher Scientific, USA) con una absorbancia de 320 nm. Se usaron como testigos: agua destilada, las microcápsulas vacías y una solución de 0.2% del jugo de *S. compositum*. Se pesaron 50 mg de microcápsulas secas cargadas con jugo en matraces Erlenmeyer de 25 mL y se agregaron 5 mL de agua destilada, se dejaron reposar por una hora. Las lecturas se realizaron cada 10 min por una hora y a las 24 y 48 horas, para ello se tomaron 2.5 mL de cada testigo y de las microcápsulas, que se colocaron en celdas de cuarzo con capacidad de 3 mL. Los resultados se expresaron en absorbancia por tiempo.

2.8. Análisis estadístico

Se realizaron las pruebas de normalidad y homogeneidad de varianza. Posteriormente los análisis de varianza y pruebas de separación múltiple de medias (Tukey $\alpha= 0.05$) así como el análisis de regresión lineal para determinar la concentración y dosis (*in vitro*) letal 50 (CL₅₀) se aplicó el Probit con Statical Analysis System, versión 9.1 para Windows (SAS Institute Inc., Cary, NC, USA).

3. Resultados y discusión

Los frutos de *S. compositum* tienen 87.17% de agua y 12.83% de materia seca, con rendimiento de jugo menor al 80%, previamente centrifugado, a fin de eliminar las saponinas y otros residuos que impedían la obtención de jugo claro.

3.1. Efectividad del jugo sobre el crecimiento *in vitro* de *B. cinérea*

Se observó efecto inhibitorio *in vitro* de *B. cinerea* con el jugo de *S. compositum*. A las 24 h después de la inoculación del patógeno en el medio PDA no hubo crecimiento de las colonias en todas las concentraciones de jugo evaluadas, con excepción del tratamiento testigo; sin embargo, a las 48 h, en concentraciones bajas de jugo (1.0, 2.5 y 5.0 %) el hongo presentó crecimiento (Figura 1).

El medio con 5% de jugo tuvo control del 94.87%, a 2.5% de jugo la inhibición fue del 90% y al 1% se logró inhibición del 83.15%, mientras que el testigo químico Switch® (ciprodinil + fludioxonil) inhibió 86% a 4 d después de inoculación.

El análisis estadístico mostró que el tratamiento con 1% de jugo y químico no presentaron diferencias estadísticamente significativas. Por otro lado, las cajas con concentraciones mayores (7.5, 10, 15, 20, 25, 30 y 40%), no presentaron crecimiento del hongo durante la evaluación.

Es interesante notar que el crecimiento del hongo en las concentraciones bajas de jugo se presentó solo en la porción de PDA que se colocó en el medio con el jugo, y cuyo crecimiento fue ascendente, con consistencia esponjosa, y poco crecimiento lateral, como si tratase de evitar el contacto con el medio, diferente al testigo absoluto, cuyo crecimiento se presentó en toda la superficie del medio, con la formación de micelio; mientras que en aquellas cajas con jugo de chayote a bajas concentraciones el micelio creció de forma compacta con esporulación adelantada, como respuesta a la toxicidad del medio.

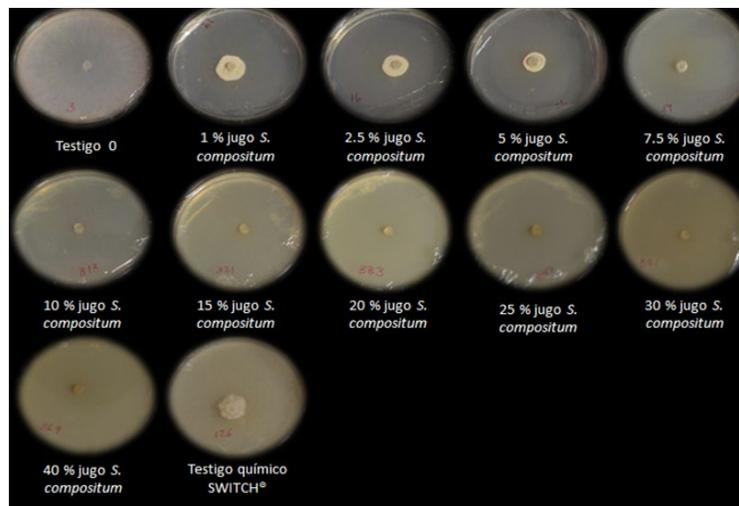


Figura 1. Crecimiento micelial de las colonias de *B. cinerea* en medio de cultivo papa-dextrosa-agar (PDA) a diferentes concentraciones de jugo de frutos de *S. compositum* y con fungicida químico Swicht® (ciprodinil + fludioxonil) cuatro días después de inoculación.

Autores como Rangel-Guerrero *et al.* (2018) evaluaron el efecto inhibitorio de extractos de frutos de *C. foetidissima* en el crecimiento *in vitro* de *Botrytis* sp., *Fusarium* sp. *Phytophthora capsici* y *Rhizoctonia solani*, los resultados mostraron mayor efecto inhibitorio de los extractos en *R. solani* (94.3-100%), y *Botrytis* sp. (42-100%), sin efecto inhibitorio significativo en *Fusarium* sp. y *P. capsici*. El efecto inhibitorio se puede atribuir a que *C. foetidissima* contiene además de cucurbitacinas, flavonoides y compuestos fenólicos.

Con relación al fungicida químico Switch® al igual que el jugo de *S. compositum* mostraron efecto fungistático, ya que, al tomar micelio de ambos medios, y colocarlo en medio de PDA, el crecimiento fue normal. Las cajas con concentraciones mayores de jugo (7.5 a 40%), no presentaron germinación durante el tiempo de evaluación.

En contraste, las cajas con fungicida químico Switch® (ciprodinil + fludioxonil) presentaron germinación de conidios a las cuatro horas de inicio del experimento, hasta que a las 24 h alcanzaron 100% de esporas germinadas. Cotoras *et al.* (2004) evaluaron el efecto de dos diterpenoides (ácido 3 β -hidroxi kaurenoico y ácido kaurenoico) (40 $\mu\text{g mL}^{-1}$) en la germinación de *B. cinerea* registrando que estos compuestos retrasaron la germinación de conidios.

Otros autores como Badaracco *et al.* (2020) aislaron diferentes metabolitos a partir de plantas, aislando y evaluando la acción antifúngica de seis compuestos de origen vegetal, daidzeína, genisteína, dos chalconas, vainillina e iso-vainillina, sobre el crecimiento *in vitro* de patógenos que actúan en cultivos de interés alimentario. Otros como Borbón-Alpizar (2020), mencionan los efectos de los metabolitos secundarios sobre el hongo *Geotrichum candidum*. Es relevante mencionar que la especie *Geotrichum sp.*, es un patógeno de importancia en el cultivo de *S. edule* comestible y la acción de los metabolitos secundarios obtenidos a partir del jugo de su pariente silvestre *S. compositum*, puede ser una valiosa alternativa de biocontrol.

3.2. Propuesta para el Desarrollo de Productos derivados de *S. compositum*

Con el fin de aprovechar la presencia de metabolitos secundarios, rescatar y generar valor agregado a los frutos de *S. compositum* se plantea la propuesta de desarrollar científicamente nuevos proyectos para la elaboración de productos con valor añadido y dar solución alternativa al uso de agroquímicos para el control de enfermedades como *B. cinerea* a productores y empacadores que exportan, tanto el chayote (*S. edule*) como otras hortalizas, y que los países destino (USA y Canadá) les exigen para su proceso de certificación internacional, el uso de productos de bajo impacto en la salud del productor, consumidor y ambiente.

La Figura 2, muestra el primer acercamiento para el diseño de un producto de biocontrol de *B. cinerea*, para lo cual se requiere la asociación de productores rurales.

Propuesta para la obtención de productos derivados de *S. compositum*

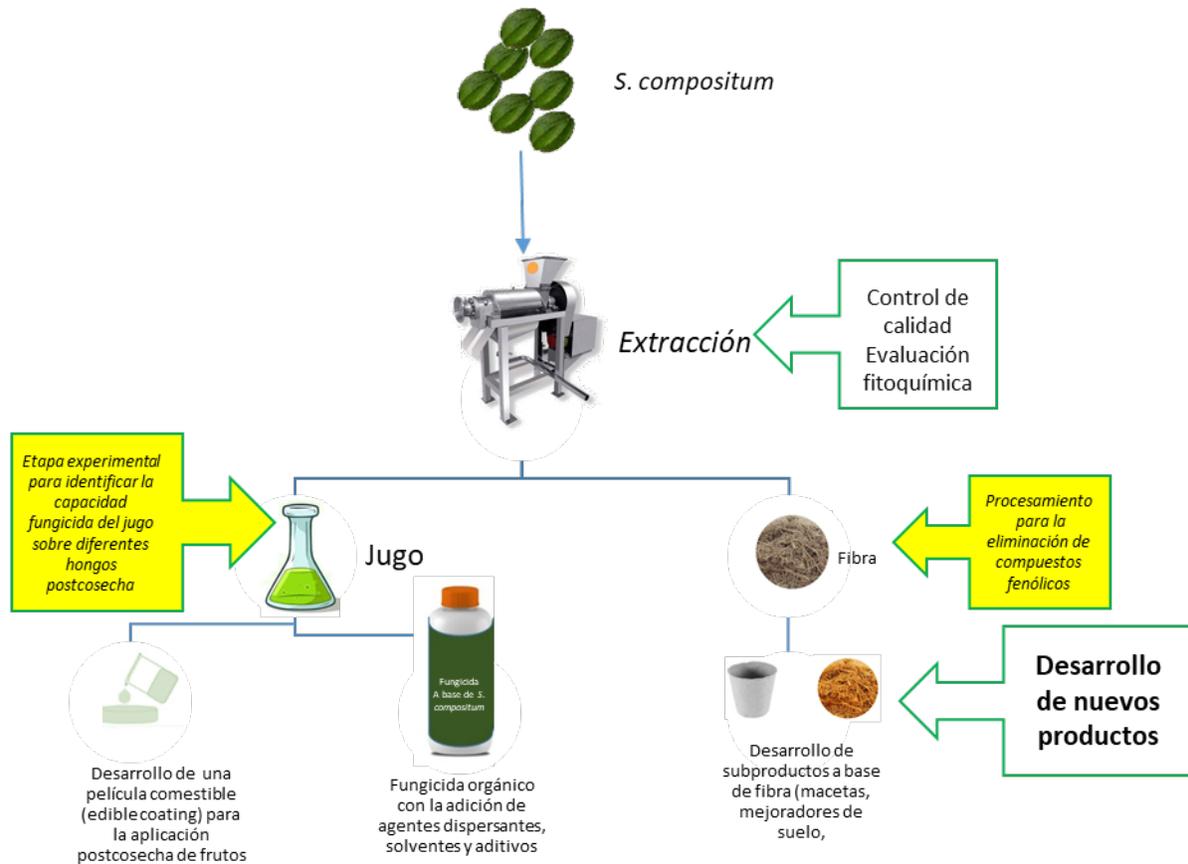


Figura 2. Propuesta de diseño del proyecto de elaboración de un producto antifúngico para el control de *B. cinérea*, a partir del uso de jugo de frutos de *S. compositum*

3.3. Caracterización de las microcápsulas

Con un microscopio compuesto se observaron las microcápsulas vacías y las que contenían el jugo de chayote (Figura 3 y 4), resultado microcápsulas de forma esférica cuando se encontraban húmedas y con un peso seco de 0.425 g y 0.599 g y rendimiento de 4.41% y 6.27% respectivamente.

Se observó que el proceso de secado con aire a presión ayudó a que las partículas se separaran un poco más que las húmedas, sin embargo, algunas partículas perdieron su forma esférica inicial, el tamaño de las microesferas secas cargadas con el jugo de chayote fueron de 3.89-23.90

μm , mientras que las vacías tuvieron tamaños de 15.37-33.36 μm . También se observó que el secado de las microcápsulas a temperatura ambiente o las secadas con aire a presión, tuvieron algunos conglomerados

Salazar (2016) encapsuló extracto metanólico de frutos de *Sechium edule* cultivar Perla Negra, obteniendo microcápsulas de diámetro entre 13.3-52.7 μm con un rendimiento de 24.96 % cuando se secaron a temperatura ambiente.

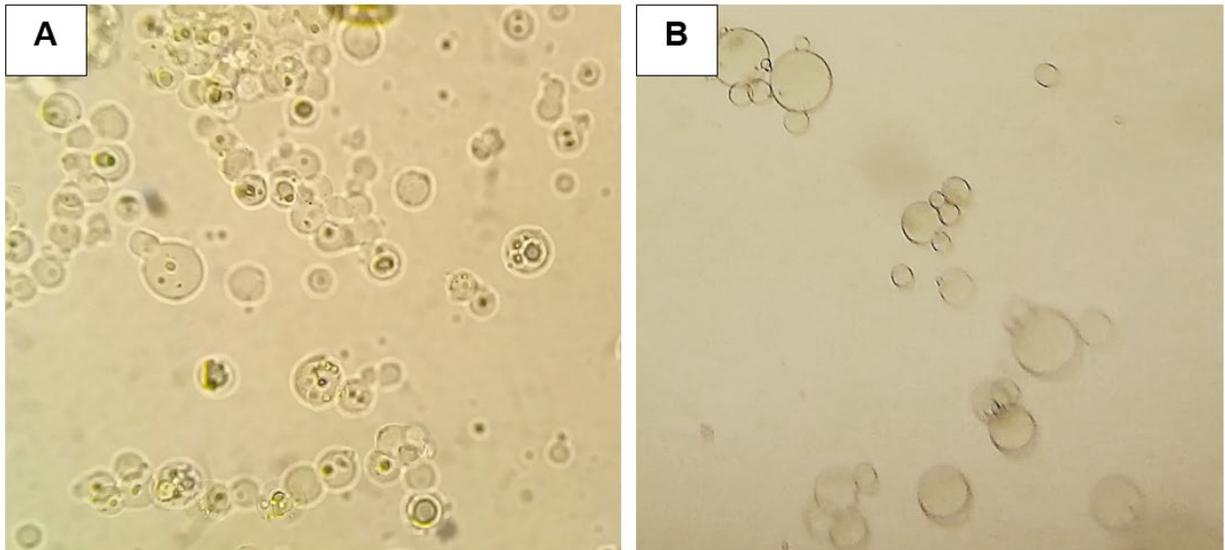


Figura 3. Microcápsulas húmedas vistas en el microscopio compuesto a 40X. A: Conteniendo jugo de *S. compositum* y B: Microcápsulas vacías.

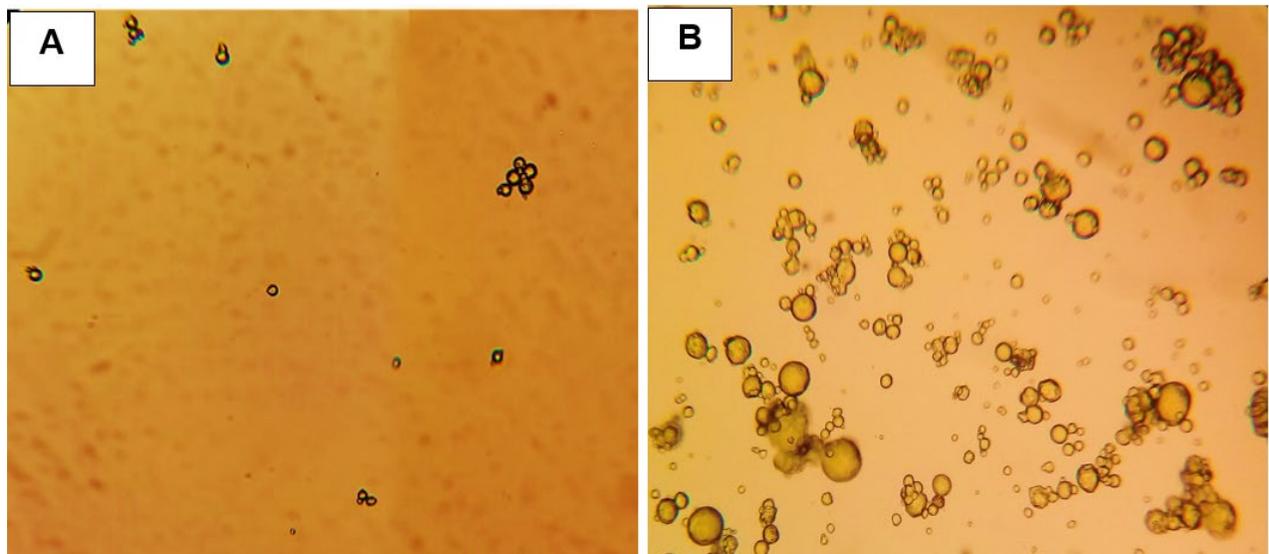


Figura 4. Microcápsulas secas vistas en el microscopio óptico de luz a 10X. A: Cargadas con jugo de *S. compositum* y B: vacías.

3.4. Pruebas de liberación

Se obtuvieron lecturas de los tres testigos (agua destilada, jugo de *Sechium compositum* al 4% y microcápsulas vacías) y las microcápsulas que contenían el jugo de *S. compositum* cada 10 min por una hora, y se siguió registrando la absorbancia a las 24 y 48 h. Se observó que la absorbancia de las microcápsulas que contenían el jugo aumentó en las primeras lecturas. El jugo de los frutos de *S. compositum* contenido en las microesferas fue liberándose gradualmente alcanzando su mayor pico de absorbancia a las 24 h (Figura 5). Salazar (2016) reporta la mayor liberación de extracto metanólico de frutos de *Sechium edule* contenidas en microesferas a las 23 h y 10 min.

La eficiencia de la liberación controlada depende principalmente de la composición y estructura de la pared del agente encapsulante, así como las condiciones durante la elaboración de las microcápsulas como la temperatura, pH, presión, humedad (Fuchs *et al.*, 2006).

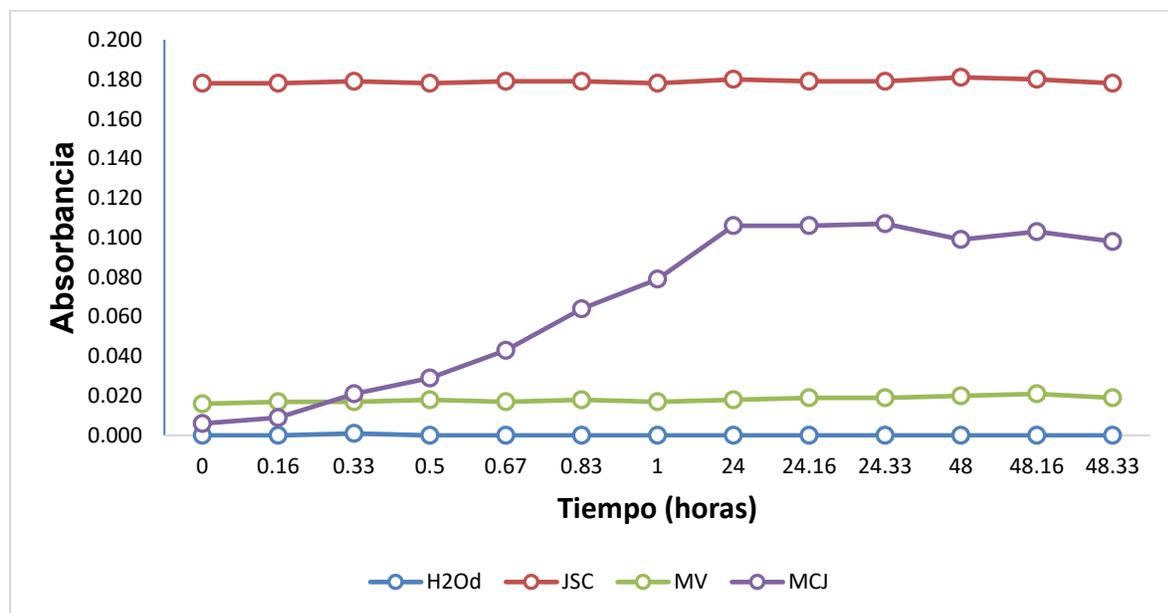


Figura 5. Gráfica de liberación del jugo de *S. compositum* contenido en las microcápsulas (MCJ). Testigos: H₂O (Agua destilada), JSC (Jugo de *S. compositum* al 4%) y MV (Microcápsulas vacías).

Cuando un recurso genético no recibe un proceso de gestión con fines prospectivos, puede literalmente desaparecer, ya que los habitantes de núcleos rurales no le ven utilidad y lo eliminan en el mediano plazo, o lo ubican en alguna categoría de riesgo de manera inconsciente. Por ello, la realización de este tipo de estudios bioprospectivos, son de mucha utilidad para evitar o reducir el nivel de fragilidad para *S. compositum*, así como para el diseño de nuevos aprovechamientos

y proyectos de diversificación productiva y económica de los núcleos humanos con quien dicho recurso ha convivido.

Hernández-Tenorio y Orozco-Sánchez (2020), reportaron el potencial de la nanotecnología en el desarrollo de bioinsecticidas botánicos, así como la caracterización de las nano formulaciones, para una agricultura ecológica, resaltando las curvas de liberación controlada. En el caso de *S. compositum*, se considera que, con el presente acercamiento mediante las microcápsulas, es factible escalar en el mediano plazo al plano comercial y diversificar la productividad y la economía local rural en el área de distribución de la especie.

4. Conclusiones

El medio con 5% de jugo de *S. compositum* registró 94.87% de control, mientras que a 2.5% la inhibición fue de 90% y a 1% se logró la inhibición de *B. cinérea* de 83.15%, mientras que el testigo químico Switch® (ciprodinil + fludioxonil) inhibió 86% a 4 d después de inoculación. Lo anterior ubica a *S. compositum* como una alternativa excelente para el biocontrol del patógeno. El método de coacervación simple permitió la microencapsulación del jugo de fruto de chayote *S. compositum*.

Algunas de las microcápsulas después del secado con aire a presión perdieron su forma esférica, éstas fueron de menor tamaño que las que contenían el jugo de chayote, el quitosano como material encapsulante permitió la liberación gradual de las mismas, en las primeras 24 h; sin embargo, es necesario realizar pruebas posteriores para perfeccionar la técnica y lograr la estabilidad y uniformidad de las microcápsulas, que aseguren su uso en emulsiones, tales como ceras de recubrimiento postcosecha de frutos y hortalizas.

5. Literatura Citada

- Adame J. A. (2000). Plantas curativas del Noreste Mexicano. Ediciones Castillo. México. 15 pp.
- Aguñiga-Sánchez I., M. Soto-Hernández, J. Cadena-Iñiguez, L. D. M. Ruiz-Posadas, J. D. Cadena-Zamudio, A. K. González-Ugarte, B. Weiss, and E. Santiago-Osorio. 2015. Fruit extract from a *Sechium edule* hybrid induces apoptosis in leukaemic cell lines but not in normal cells. *Nutrition and Cancer* 67: 250-257.
- Bar-Nun N. and A. M. Mayer. (1990). Cucurbitacins protect cucumber tissue against infection by *Botrytis cinerea*. *Phytochemistry* 29: 787-791.
- Badaracco, P., Sortino, M., & Pioli, R.N. (2020). Estudio de compuestos vegetales con potencial acción antifúngica sobre patógenos de plantas cultivadas. *Chilean Journal of Agricultural & Animal Sciences (ex Agro-Ciencia)*, 36(3), 244-252. Recuperado a partir de <http://revistas.udec.cl/index.php/chjaas/article/view/2987>
- Borbón-Alpizar, H. (2020). Caracterización química de metabolitos aislados en un extracto con actividad antimicrobiana y antifúngica de la ascidia, *Rhopalaea* sp. Proveniente del área de Cuajiniquil, Guanacaste, Costa Rica. <https://hdl.handle.net/20.500.11801/379>
- Cadena-Iñiguez J., L. Arévalo-Galarza, C. Avendaño-Arrazate, M. Soto-Hernández, L. Ruiz-Posadas, E. Santiago-Osorio, M. Acosta-Ramos, V. M. Cisneros-Solano, J. F. Aguirre-Medinam, and Ochoa-Martínez, D. (2007). Production genetics postharvest

management and pharmacological characteristics of *Sechium edule* (Jacq.) Sw. Fresh produce 1: 41-53.

- Cotoras M., C. Folch and L. Mendoza. (2004). Characterization of the antifungal activity on *Botrytis cinerea* of the natural diterpenoids kaurenoic acid and 3 β -hydroxy-kaurenoic acid. *Journal of agricultural and food chemistry* 52: 2821-2826.
- De Rodríguez D. J., R. R. García, F. H. Castillo, C. A. González, A. S. Galindo, J. V. Quintanilla and L. M. Zuccolotto. (2011). In vitro antifungal activity of extracts of Mexican Chihuahuan desert plants against postharvest fruit fungi. *Industrial Crops and Products* 34:960-966.
- Dean R., J. Van-kan, Z. Pretorius, K. Hammond-Kosack, A. Di Pietro, P.D. Spanu, J. J. Rudd, M. Dickman, R. Kahmann, J. Ellis and G. D. Foster. (2012). The top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*. 13:414-430.
- Harborne J. B. 1998. *Phytochemical Methods: A Guide to modern techniques of Plant Analysis*. Chapman & Hall, London. 302 pp.
- Hernández-Tenorio, F., Orozco-Sánchez, F. (2020). Nanoformulations of botanical insecticides for the control of agricultural pests. doi: <https://doi.org/10.15446/rev.fac.cienc.v9n1.81401>
- Rangel-Guerrero J. M., S. Flores-Benítez, J. Cadena-Iñiguez, F. J. Morales-Flores and L. I. Trejo-Téllez. (2018). Extractos de frutos de *Cucurbita foetidissima* (Kunth) inhiben el crecimiento de fitopatógenos de interés agrícola. *Agroproductividad* 11: 107-115.
- Song QY, Qi WY, Li ZM, Zhao J, Chen JJ, Gao K. (2011). Antifungal Activities of Triterpenoids from the Roots of *Astilbe myriantha* Diels. *Food Chem.* 128:495-499. Doi:10.1016/j.foodchem.2011.03.059.

