

Actividad antifúngica In vitro de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinerea* (Moho gris)

In vitro antifungal activity of three plants extracts against *Botrytis cinerea* (Gray mold)

Atividade antifúngica in vitro de três extratos de plantas frente à *Botrytis cinerea* (Bolor cinzento)

...

Erika V. Jiménez P^{1*}, Oscar M. Mosquera M¹

Recibido: Mayo de 2014. Aceptado: Diciembre de 2014

Citación Vancouver: Jiménez EV, Mosquera OM. Actividad antifúngica In vitro de tres extractos de plantas frente a *Botrytis cinerea* (Moho gris). Salud Soc Uptc. 2014;1(2):16-21.

Resumen

Introducción: Los extractos de plantas cumplen un rol muy importante en la agroecología, por el beneficio al medio ambiente y al ecosistema cuando son usados como alternativa para el tratamiento de enfermedades infecciosas en las plantas, causadas por organismos fitopatógenos.

Objetivo: El objetivo del presente estudio fue evaluar la actividad fungicida de los extractos de *Ruta graveolens*, *Nicotiana tabacum* y *Chrysanthemum morifolium* para combatir el hongo *Botrytis cinerea*. **Materiales y métodos:** Los extractos fueron obtenidos de hojas de *R. graveolens*, *N. tabacum* y las flores de *C. morifolium* por el método de extracción con solventes (hexano, diclorometano y etanol) por medio de sonicación. Los núcleos fitoquímicos presentes en estos fueron caracterizados por cromatografía de capa delgada. Para determinar la actividad antifúngica de los extractos sobre *B. cinerea*, se utilizó la técnica de microdilución en caldo para hongos filamentosos (adaptada del CLSI), probando seis diluciones de cada extracto (250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 y 7,8 µg/mL). Todos los ensayos se realizaron por triplicado. **Resultados:** De los nueve extractos evaluados, solo el extracto diclorometánico de las hojas de *R. graveolens* inhibió la germinación de conidios de *B. cinerea* en un 57,5%, con un valor de CIM de 62,5

µg/mL. **Conclusión:** El extracto diclorometánico de *R. graveolens* podría ser útil en el control de la enfermedad del moho gris causada por *B. cinerea*, generando menos impacto ambiental. Por otra parte, la actividad antifúngica observada se atribuiría a metabolitos secundarios como cumarinas, flavonoides y alcaloides que fueron los más abundantes detectados en este extracto.

Palabras clave: *Botrytis*, *Chrysanthemum*, Extractos vegetales, Fitoterapia, Actividad antifúngica, *Nicotiana tabacum*, *Ruta graveolens*. (Fuente: DeCS).

Abstract

Introduction: The plant extracts make a very important role in the agroecology, they benefit to the environment and to the entire ecosystem around, fighting infectious diseases in plants caused by phytopathogens organism. **Objective:** The propose of this study was to evaluate fungicidal activity of extracts from *Ruta graveolens*, *Nicotiana tabacum* and *Chrysanthemum morifolium* against *Botrytis cinerea*. **Materials and Methods:** Extracts were obtain from leaves of *Ruta graveolens* and *Nicotiana tabacum* and flowers of *Chrysanthemum morifolium* by the method of extraction with solvents (hexane, dichloromethane and ethanol) by means of sonication. The phytochemicals present in these were characterized by thin layer chromatography. To determine the antifungal activity of the extracts on *B. cinerea*, the microdilution technique in broth for filamentous fungi (adapted from CLSI), testing six dilutions of each extract (250; 125; 62.5; 31.25; 15.6 and 7.8 µg/mL). All assays were performed in triplicate. **Results:** Of the nine extracts evaluated, only the dichloromethane extract of the leaves of *R. graveolens* inhibited the germination of conidia of *B. cinerea* in 57.5%, with a CIM value of 62.5

1. Universidad Tecnológica de Pereira (Pereira – Colombia).

* E-mail para correspondencia: evjimenez@utp.edu.co

themum morifolium using extraction with solvents method (hexane, dichloromethane and ethanol) through sonication. Extracts were characterized using thin layer chromatography. Fungicidal activity against *Botrytis cinerea* were determined with 96 well microplate assay for filamentous fungi adapted from Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI) testing eight dilutions of each extract (250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 and 7,8 µg/mL). Tests were carried out by triplicate. **Results:** One of nine plant extracts evaluated had good inhibitory effect. The dichloromethane extract of *Ruta graveolens* exhibited good antifungal activity In vitro against *Botrytis cinerea*, with 57,5% of conidial germination inhibition, showing a MIC of 62,5 µg/mL. **Conclusion:** The dichloromethane extract of leaves of *R. graveolens* could be helpful in treatment of gray mould caused by *Botrytis cinerea* with less environmental impact. On the other hand, this effect could be caused by secondary metabolites such as coumarins, flavonoids and alkaloids, which were the most abundant, detected in the extract.

Keywords: *Botrytis*, *Crysanthemum*, Plant extracts, Phytotherapy, Antifungal activity, *Nicotiana tabacum*, *Ruta graveolens*. (Source: DeCS)

Resumo

Introdução: Os extractos de plantas desempenham um papel muito importante na agroecologia pelos benefícios para o ambiente e para o ecossistema para ser utilizado como alternativas para o tratamento de doenças infecciosas em plantas causadas por microrganismos fitopatogénicos. **Objetivo:** Avaliar a atividade fungicida dos extratos de *Ruta graveolens*, *Nicotiana tabacum* e *Crysanthemum morifolium* para controle do fungo *Botrytis cinerea* da mora de castelã (*Rubus glaucus* Benth). **Materiais e métodos:** Os extratos foram obtidos das folhas de *Ruta graveolens*, *Nicotiana tabacum* e as flores de *Chrysanthemum morifolium* pelo método de extração de sonicação com os solventes hexano, diclorometano e etanol; os núcleos fitoquímicos presentes nestes foram caracterizados por cromatografia de camada fina. Para determinar a atividade antifúngica dos extratos contra *Botrytis cinerea* utilizou-se a técnica de microdiluição em caldo para os fungos filamentosos (adaptada do CLSI) com seis diluições (250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 e 7,8 µg/mL) de cada extrato. Todos os ensaios foram feitos por triplicata e repetiram-se duas vezes em dias diferentes para verificar a reproducibilidade do método. **Resultados:** Dos nove extratos avaliados só um mostrou efeito inibitório. O extrato de diclorometano das folhas de *Ruta graveolens* inibiu a germinação dos conídios de *Botrytis cinerea* num 57,5% com uma concentração mínima inibitória de 62,5 µg/mL. **Conclusão:** Este trabalho determina o efeito de inibição do extrato de diclorometano das folhas de *Ruta graveolens* sob *Botrytis cinerea* isolado das moras infestada, atividade que se pode atribuir aos metabolitos secundários como as cumarinas, flavonoides e alcaloides que foram os mais abundantes detectados nos extratos.

Palavras chave: *Botrytis*, *Crysanthemum*, Extratos de plantas, Fitoterapia, Atividade antifúngica, *Nicotiana tabacum*, *Ruta graveolens*. (Fonte: DeCS)

INTRODUCCIÓN

La mora de castilla (*Rubus Glaucus Benth*), se distingue como la fruta estrella en el desarrollo hortofrutícola de la región cafetera debido a las oportunidades de crecimiento que ofrece en el mercado. En Risaralda (Colombia), la mora de castilla es uno de los cultivos más destacados por tener gran acogida en el país y una amplia proyección comercial de exportación. El plan nacional de desarrollo, para la productividad del departamento, fijó varias apuestas de inversión para el sector agroindustrial siendo la mora uno de los productos más destacados, con una producción de 6.000 toneladas del fruto al año. Así mismo, el Plan Frutícola Nacional (PNF) del 2.006 proyectó para el 2.026 un incremento del 94,1% en el área cultivada con el fruto, pasando de 10.743 hectáreas en el 2.008 a 20.631 hectáreas en 2.026 (1).

Estudios sobre la situación actual y perspectivas del mercado de la mora, demuestran cifras de crecimiento en áreas cultivadas con el fruto. Sin embargo, el promedio general nacional de los rendimientos en los cultivos se mantuvo constante, por lo que es importante el mejoramiento de prácticas agrícolas y del material vegetal a utilizar (2).

El cultivo de mora sufre diferentes enfermedades que afectan su utilidad, siendo una de las más perjudiciales la podredumbre del fruto o el moho gris, ocasionada por el hongo *Botrytis cinerea* que está presente en el 94% de los cultivos y genera pérdidas entre el 50 y 76% (3). Este hongo afecta tallos, hojas y flores, produciendo momificación en los frutos inmaduros, podredumbre en los frutos en proceso de maduración y en etapas post cosecha como en el almacenaje (4).

Para los productores colombianos, es indispensable el uso de fungicidas sintéticos que controlen el proceso de infección ocasionado por *B. cinerea*, sin embargo, este método presenta varias limitantes: la resistencia por parte del patógeno a muchos fungicidas, el riesgo de inocuidad del producto y problemas ambientales por efecto residual (5).

En los últimos años, se ha incrementado el uso de productos naturales que sirvan como alternativas para tratar enfermedades causadas por agentes fitopatogénicos; con lo que se busca disminuir los costos de producción y el impacto ambiental (6). Por lo tanto, la mejor herramienta para su hallazgo es realizar estudios de bioprospección en plantas y microorganismos.

Las plantas son capaces de sintetizar metabolitos secundarios que incluyen gran variedad de compuestos químicos cuya presencia varía enormemente de acuerdo a la familia, especie, localización geográfica y parte de la planta (7). Estos metabolitos pueden tener actividades biológicas sobre insectos, plagas, o microorganismos fitopatogénicos e inclusive pueden producir fortalecimiento estructural en la planta, incrementando su resistencia a la penetración de micelios de los hongos y a los ataques de insectos (8).

Los principales núcleos fitoquímicos con actividad fungicida reportados son: terpenos, taninos, flavonoides y alcaloides (9).

Estudios revelan la viabilidad de combatir a *B. cinerea* con extractos vegetales y aceites esenciales en condiciones *In vitro* (8, 10-12); también se ha evaluado el sinergismo de extractos de plantas surafricanas mezcladas con Kresomix-metil resultando efectivas para la inhibición de *B. cinerea* (13).

Así mismo ensayos "In vivo" demuestran la eficacia en el control de la enfermedad del moho gris en la mora de castilla con la aplicación de extractos vegetales (14, 15). En Colombia, el ICA recomienda biopreparados que se han usado de forma empírica en campo, mostrando buenos resultados contra *Botrytis sp.*(5).

En este trabajo se evaluó la actividad fungicida *In vitro* de los extractos de hexano, diclorometano y etanol de *R. graveolens*, *N. tabacum* y *C. morifolium* sobre *B. cinerea*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal: El material vegetal fue recolectado en el departamento del Quindío (Colombia) en los municipios de la Tebaida y Salento, y un voucher de número 9967 (MG) de cada una de las especies fue depositado en el herbario de la Universidad del Quindío. Las coordenadas de recolección, temperatura, humedad y altura sobre el nivel mar (msnm) son mostrados en la tabla 1.

Tabla 1. Condiciones de recolección del material vegetal

Localidad	Temperatura °C	Coordenadas	Altura (msnm)	%HR	Planta
Salento	22	4° 38' 14" N, 75° 34' 15" W	1895	82	Ruta graveolens
La Tebaida	21	4° 27' 8" N, 75° 47' 12" W	1190	78	Chrysanthemum morifolium <i>Nicotiana tabacum</i>

%HR: Porcentaje de humedad relativa

Material biológico: El hongo se aisló de un fruto infectado seleccionado al azar del cultivo ubicado en la finca el Moral, vereda Barrio Blanco en el municipio de Quinchía (Risarcaldía-Colombia) a 2.087 msnm, a una temperatura de 23°C y humedad relativa del 88%.

Obtención de los extractos: El material vegetal fue secado a 35°C y posteriormente fue molido. La extracción se llevó a cabo usando el sonicador FSF60H Fisher Scientific® con tres solventes sucesivamente: n-hexano, diclorometano y etanol de grado analítico con una relación sólido líquido

1:10 a una temperatura de 20°C y en intervalos de 20 minutos (16). Los extractos así obtenidos se concentraron en rotaevaporador con baño térmico a 45°C y presiones de 335 mbar para el extracto de Hexano, presión atmosférica para el de Diclorometano y 175 mbar para el extracto de Etanol. Los extractos secos se conservaron a -4°C hasta su utilización.

Caracterización fitoquímica por cromatografía de capa delgada (CCD): La caracterización de los diferentes metabolitos secundarios se realizó por el método de CCD, usando placas de sílica gel F₂₅₄ comparando las características de las manchas producidas por cada extracto con los respectivos patrones (17, 18).

Ensayo de bioactividad: En placas de 96 pozos de fondo plano se realizó el ensayo de microdilución en caldo nutritivo, adaptando la metodología M38-A, para ensayos de sensibilidad a los antifúngicos para hongos filamentosos del Clinical and Laboratory Standards Institute (CLSI), inoculando moho a una concentración de 10⁸ conidias/mL. Se evaluaron seis diluciones por extracto (250; 125; 62,5; 31,25; 15,6 y 7,8 µg/mL), cada una por triplicado, más controles de crecimiento, esterilidad e inhibición para cada extracto y un blanco del extracto para distinguir la absorbancia entre la pigmentación del extracto y el crecimiento del hongo. El análisis de los datos se hizo de manera visual y fotométrica.

Lectura del Bioensayo: Las placas fueron observadas 7 días después de inoculadas y la absorbancia se cuantificó en un lector de microplacas de 96 pozos Thermo Scientific Multiskan Go UV/VIS 10040® a 405 nm. A la absorbancia de cada pozo se restó la producida por el extracto (control de dilución) y se comparó con el control de crecimiento para determinar la concentración inhibitoria mínima, el porcentaje de inhibición y la dosis letal media (IC₅₀) que corresponde a la concentración que inhibe el 50% del desarrollo del hongo.

Análisis estadístico: Se realizó análisis de varianza ANOVA por planta y por tipo de extracto, además se complementó con el test de Tukey HSD, con un nivel de significancia del 5% usando el software Statgraphics Centurion XVII®.

RESULTADOS

Caracterización fitoquímica de los extractos por CCD. La cromatografía de capa delgada permite la separación de los diferentes constituyentes de una muestra de acuerdo a su polaridad, donde se observan diferentes coloraciones de acuerdo al núcleo fitoquímico analizado y al tipo de revelador. En la tabla 2 se resume la marcha fitoquímica de los extractos, en donde se indica la abundancia, presencia y ausencia de los metabolitos secundarios analizados.

Tabla 2. Marcha fitoquímica de *Ruta graveolens*, *Chrysanthemum morifolium* y *Nicotiana tabacum*

Nombre científico	Extracto	Metabolitos Secundarios								
		Alcaloides	Triterpenos y Esteroides	Fenoles	Flavonoides	Taninos	Cumarinas	Lactonas	Saponinas	Amidas
<i>Ruta graveolens</i>	N-Hexano	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	Diclorometano	++	++	+	++	++	++	+	-	+
	Etanol	+	+	-	++	++	++	+	-	-
<i>Chrysanthemum morifolium</i>	N-Hexano	-	++	+	+	+	+	++	-	-
	Diclorometano	+	++	+	+	+	-	-	++	-
	Etanol	-	+	-	++	+	+	-	+	-
<i>Nicotiana tabacum</i>	N-Hexano	++	++	+	-	-	-	++	++	-
	Diclorometano	++	+	-	++	-	+	++	+	+
	Etanol	+	+	-	-	-	+	+	-	-

(++) Abundante, (+) Presente, (-) Ausente

Con estos resultados se confirma la abundancia de cumarinas, flavonoides, alcaloides, triterpenos y esteroides de *R. graveolens*. Así mismo, se evidencia la presencia de taninos gálicos y en una menor proporción lactonas, compuestos fenólicos y amidas; no se encontraron saponinas. Los extractos de *C. morifolium* revelaron gran cantidad de flavonoides, triterpenos, esteroides y saponinas. En los ensayos con *N. tabacum* se determinó la abundancia de alcaloides y lactonas, presencia de triterpenos y esteroides, saponinas, cumarinas, flavonoides y amidas en poca cantidad.

Evaluación de la actividad Antifúngica. La inhibición del crecimiento del hongo *B. cinerea* se pudo constatar visualmente con el extracto diclorometanólico de *R. graveolens*, en donde no hubo desarrollo del hongo a partir de la concentración de 62,5 µg/mL; en los otros extractos analizados no se notó mayor efecto. Por otro lado, los valores de absorbancia obtenidos fueron utilizados para calcular los porcentajes de inhibición, que se presentan en la tabla 3.

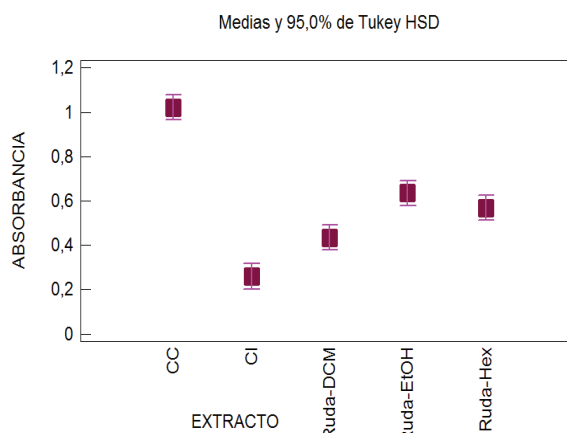
Tabla 3. Inhibición del crecimiento de *B. cinerea* expuesto los extractos de *R. graveolens*, *N. tabacum* y *C. morifolium*.

Extracto	Porcentaje de Inhibición		
	<i>Ruta graveolens</i>	<i>Nicotiana tabacum</i>	<i>Chrysanthemum morifolium</i>
Hexano	44,27	19,83	19,89
Diclorometano	57,50	16,44	0
Etanol	37,66	28,42	14,84
Control Inhibición (Mancozeb)	74,50	72,90	74,55

El ANOVA de la figura 1 complementado con el test de Tukey con una confiabilidad del 95%, indica que no existen diferencias estadísticamente significativas entre los extractos etanólico y hexánico de *R. graveolens*, el extracto de mayor actividad fungicida es el diclorometánico que inhibió un 57,5%

el crecimiento, calculado a partir de la absorbancia dada por control de crecimiento que corresponde al 100%.

Figura 1. ANOVA de actividad fungicida de los extractos de *R. graveolens* sobre *B. cinerea*



CC: control de crecimiento, **CI:** Control de inhibición (Mancozeb 1000 µg/mL), **DCM:** Extracto diclorometánico, **EtOH:** Extracto Etanólico, **Hex:** Extracto Hexánico

Con los extractos activos se pudo determinar la concentración inhibitoria mínima que corresponde a la concentración más baja de extracto que inhibió el desarrollo del hongo (19).

Tabla 4. Concentración Mínima Inhibitoria de los extractos activos

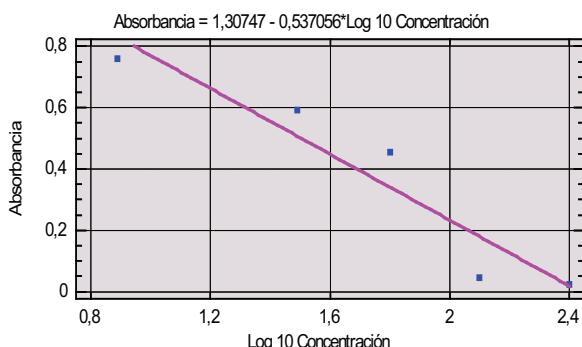
Extractos (<i>R. graveolens</i>)	CMI (µg/mL)
Etanólico	125
Diclorometánico	62,5
Hexánico	250

Así mismo, se calculó la dosis letal media con la absorbancia promedio y con el cálculo del logaritmo en base 10 de las concentraciones evaluadas se construyó el gráfico (Figura 2).

Tabla 5. Valores de absorbancia promedio para el extracto de *R. graveolens* en diclorometano

Concentración µg/mL	Absorbancia	Log 10 Concentraciones
7,8	0,7597	0,89
15,6	0,7285	1,19
31,25	0,5921	1,49
62,5	0,4542	1,80
125	0,0467	2,10
250	0,0230	2,40

Figura 2. Regresión lineal. Cálculo de la dosis letal media IC_{50} del extracto diclorometánico de *Ruta graveolens*



Al ser la máxima absorbancia 0,7597, el 50% corresponde a 0,3799, este valor corresponde al del eje Y, reemplazando en la ecuación de la gráfica, tenemos un valor de Log 10 de la concentración igual a 1,7271; aplicando antilogaritmo, se tiene que IC_{50} es de 53,35 $\mu\text{g/mL}$.

DISCUSION Y CONCLUSIONES

En Colombia, el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) en su programa de manejo integrado de plagas en mora, hace referencia a la enfermedad "Moho Gris" y recomienda la aplicación de fungicidas en tratamientos de pre y pos cosecha al cultivo (planta entera) y tratamientos de pos cosecha a la fruta, que mantienen la calidad del producto durante su almacenamiento y comercialización. Los fungicidas sintéticos más comunes son Mancozeb, Benomil, Iprodine, Euparen, Orthocide y Anvil (4, 20).

Métodos empíricos usados en Colombia hacen referencia a hidrolatos de mezclas de repollo, ajo, malva, canela, helecho marranero y ruda (4). En este estudio se encontró que el grupo de metabolitos secundarios de las hojas de *R. graveolens* producen la inhibición del crecimiento del hongo en condiciones *In vitro*, logrando enfocar la búsqueda de componentes activos en el grupo de alcaloides, flavonoides y cumarinas. De esta manera estudios posteriores podrían lograr el aislamiento de la molécula responsable de dicho efecto y la elaboración de un producto comercial.

B. cinerea es el "clásico patógeno de alto riesgo" por su resistencia a los tratamientos con fungicidas sintéticos, principalmente benzimidazoles (21). Esto obliga a la utilización de múltiples productos para lograr un control adecuado del mismo (22-24)

Por tal motivo, en la investigación de alternativas para el control del patógeno, se han reportado alrededor de 11 patentes, algunas de origen europeo y japonés, que buscan una mayor efectividad en el tratamiento de enfermedades fúngicas, entre ellas la podredumbre gris o del fruto, teniendo como base fungicidas sintéticos del grupo de las carboximidaz. Una de las más recientes es la publicada por el gobierno de Chile y solicitada por Bayer Cropscience AG Alemania, que expone nuevas estructuras de fungicidas como el 2-halógenofuriltienil-3-carboxamidas (25).

En este estudio, de los nueve extractos evaluados, los de *R. graveolens* mostraron buena actividad fungicida, siendo el extracto diclorometánico el que presentó mayor inhibición. Los extractos de crisantemo (*C. morifolium*) y tabaco (*N. tabacum*) no tuvieron efecto inhibitorio importante sobre *B. cinerea*.

La actividad del extracto diclorometánico de *R. graveolens* sobre *B. cinerea* podría atribuirse a la presencia de diferentes cumarinas, las cuales según la cromatografía de capa delgada realizada, son abundantes en este extracto. Otros estudios exponen la presencia de 7-metoxicumarina, 8-Metoxipsraleno (furanocumarina), 2-[4'-(3",4"-Metilendioxi)fenil] butil]-4-quinolona y 1-metil-2-[6'-(3",4"-metilendioxi)fenil] hexil]-4-quinolona, los cuales mostraron porcentajes de inhibición del 60%, 78%, 60%, y 90% respectivamente, con actividad fungicida sobre *Botrytis sp.* (26). También es importante tener en cuenta que este extracto es rico en alcaloides, triterpenos y esteroides, metabolitos que han demostrado tener actividad fungicida (27-29).

El extracto diclorometánico de *R. graveolens* podría ser de utilidad en el control de la enfermedad del moho gris causada por *B. cinerea*, generando con su aplicación menos impacto ambiental. Con los resultados obtenidos en este estudio, se podría plantear un proceso de aislamiento de compuestos puros activos a partir del extracto crudo de *R. graveolens*, el cual podría ser evaluado y escalado para la elaboración de un biopreparado.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran no tener conflicto de intereses.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo fue financiado parcialmente por la Universidad Tecnológica de Pereira a través de la Vicerrectoría de Investigaciones, Innovación y Extensión.

REFERENCIAS

- Rentería C, Escobar A, Uribe E, Porras O, Chamorro LH. Agenda Interna Para la Productividad y la Competitividad. In: Planeación DND, editor. Risaralda, Colombia: Grupo de Comunicaciones y Relaciones Públicas DNP; 2007.
- Ruiz MP, Uruña del Valle MA. Situación Actual y Perspectivas del Mercado de la Mora. In: internacional ASApplasyic, editor. Bogotá, DC: Economic Research Service- ERS Componente de Agronegocios-Programa MIDAS; 2009. p. 1-16.
- Tamayo P, Peláez A. Caracterización de daños y pérdidas causadas por enfermedades del fruto de la mora de castilla (*Rubus glaucus* Benth) en Antioquia. In: Corpoica, editor. Memorias III Seminario Nacional de Frutales de Clima Frío Moderado; Manizales; 2000.
- Alarcon JJ. Manejo Integrado de Plagas en Mora. In: ICA IdCA, editor. Seminario de Mora; Universidad del Quindío: Facultad de Ciencias Agroindustriales-Universidad del Quindío; 2010.
- Instituto Colombiano Agropecuario. Manejo fitosanitario del cultivo de la mora (*Rubus Glaucus* Benth). Bogotá, D.C.: ICA; 2011.
- Leng P, Zhang Z, Pan G, Zhao M. Applications and development trends in biopesticides. *Afr J Biotechnol*. 2011;10(86):19864-73.
- Agostini L, Morón M, Ayala A, Ramón A. Determinación de la capacidad antioxidante de flavonoides en frutas y verduras frescas y tratadas térmicamente. *Arch Latinoam Nutr*. 2004;54(1):89-92.
- Castro J, Valencia N, Bernal MH, Castro E. Evaluación del extracto de Trompeta (*Bocconia frutescens* L.) En el manejo de problemas fitosanitarios de interés agrícola. *Cult. Droga*. 2006;13:175-210.
- Castillo F, Hernández D, Gallegos G, Mendez M, Rodríguez R, Reyes A, et al. "In vitro" antifungal activity of plant extracts obtained with alternative organic solvents against *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ind Crop Prod*. 2010;32(3):324-8.
- Bautista S, García E, Barrera L, Reyes R, Wilson C. Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against *Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberryfruit. *Postharvest Biol Technol*. 2003;29:81-92.
- Miño J, Uricoechea J. Evaluación de seis métodos farmacológicos de preparación de extractos de repollo (*Brassica oleraceae*), Ajo (*Allium sativum*) y Eucalipto (*Eucalyptus globulus*) en el control de *Botrytis cinerea* Pers. Ex. Fr. en el cultivo de la mora (*Rubus glaucus*) en condiciones de laboratorio en Tunja, Boyacá: (Tesis). Ingeniería agronómica. Universidad Pedagógica y Tecnológica de Colombia. 2001.
- Gutiérrez J, Agudelo C, Ramírez S, Velosa M. Control del moho gris (*Botrytis cinerea* Pers ex. Fr.) en el cultivo de la mora (*Rubus glaucus* Benth) mediante la aplicación de extractos de ajo (*Allium sativum* L.) Canela (*Cinnamomum zeylanicum* Nees) y Repollo (*Brassica oleraceae*). *Ciencia en Desarrollo*; 2003.
- Knowles CL. Synergistic effects of mixtures of the kresoxim-methyl fungicide and medicinal plant extracts in vitro and in vivo against *Botrytis cinerea*. (Tesis). Western Cape University of the Western Cape; 2005.
- Martínez MA, Moreno ZY. Estandarización de una metodología para la evaluación de eficacia de productos para la protección de cultivo (PCC) preventivos para el control de *Botrytis* sp, en condiciones semi-controladas (Tesis). Bogotá: Pontificia Universidad Javeriana; 2008.
- Villares M, Martínez A, Ochoa J, Asaibay C, Gallegos P, Vásquez W. Desarrollo de un programa de manejo integrado de botrytis (*Botrytis cinerea*) en mora de castilla (*Rubus glaucus* b.), en Bolívar y Tungurahua. Centro Internacional de Agricultura Tropical/ Fondo Regional de Tecnología Agropecuaria. 2010.
- Cares MG, Vargas Y, Gaete L, Sainz J, Alarcón J. Ultrasonically assisted extraction of bioactive principles from Quillaja Saponaria Molina. *Phys. Procedia*. 2010;3(1):169-78.
- Bilbao MR. Análisis fitoquímico preliminar. Universidad del Quindío; 1997. 3-99 p.
- Sanabria-Galindo A, López SI, Gualdrón R. Estudio fitoquímico preliminar y letalidad sobre *Artemia salina* de plantas colombianas. *Rev Col Cienc Quím Farm*. 1997;26:15-9.
- Cantón E, Mazuelos M, Espinel-Ingroff A. Métodos estandarizados por el CLSI para el estudio de la sensibilidad a los antifúngicos (documentos M27-A3, M38-A y M44-A). In: Pemán J, Martín-Mazuelos E, Rubio Calvo M, editors. Guía Práctica de Identificación y Diagnóstico en Micrología Clínica. 2da ed. Bilbao; 2007.
- Schroeder A. Pesticide Evaluation report and Safe Use Action Plan PERSUAP. United States: Agency for international Development, 2007.
- Rivera-Coto G, Calvo-Araya JA, Orozco-Rodríguez R, Orozco-Cayasos S. Aislamiento y evaluación In vitro de antagonistas de *Botrytis cinerea* en mora. *Agronomía Mesoamericana*. 2012;23(2):225-31.
- Asadollahi M, Fekete E, Karaffa L, Flippi M, árnyasi M, Esmaeili M, et al. Comparison of *Botrytis cinerea* populations isolated from two open-field cultivated host plants. *Microbiol Res*. 2013;168(6):379-88.
- González F, García MG, Lozoya H, Herrera T. Resistencia de *Botrytis cinerea* (Pers.) Fr., a dos fungicidas Benimidazoles utilizados en la floricultura. *Rev Chapingo Ser Hortic*. 2002;8(1):95-9.
- Alvarez M. Resistencia cruzada negativamente entre los fungicidas Benomilo y Dietofencarb en aislamientos de *Botrytis cinerea* de vides. *Agric Tech (Santiago)*. 1991 junio 1991;51(2):171-5. Epub 1.
- Dunkel R, Hartmann B, Greul JN, Wachendorf-Neumann U, Elbe H-L, Dahmen P, inventors; Alesasandri and Compañía, assignee. 2-halógenofurilitienil-3-carboxamidas con propiedades fungicidas, composiciones que las contienen procedimiento de preparación y su uso para combatir microorganismos indeseados. Patente Chile. 2005.
- Oliva A, Meepagala KM, Wedge DE, Harries D, Hale AL, Aliotta G, et al. Natural fungicides from *Ruta graveolens* L. leaves, including a new quinolone alkaloid. *J Agr Food Chem*. 2003;51(4):890-6.
- Oh E-T, Lee J-H, Kim C-S, Keum Y-S. Alkylquinolone alkaloid profiles in *Ruta graveolens*. *Biochem Sys Ecol*. 2014;57:384-7.
- Hashemi SM, Hadavi D, Lohrasbi L. Survey of the Antibacterial Effect of Aquatic and Alcoholic Extracts of *Ruta-graveolens*. *Middle East J Sci Res*. 2014;21(10):1694-7.
- Soylu EM, Kurt S, Soyulu S. In vitro and in vivo antifungal activities of the essential oils of various plants against tomato grey mould disease agent *Botrytis cinerea*. *INT J Food Microbiol*. 2010;143(3):183-9.