

Control orgánico *in vitro* de *Phytophthora cinnamomi* con aceites esenciales de orégano y clavo

Yisa María Ochoa Fuentes¹
Anselmo Hernández Pérez¹
Juan Carlos Delgado Ortiz²
Omegar Hernández Bautista²
Ernesto Cerna Chavez¹
Luis Alberto Aguirre Uribe¹
Luis Mario Tapia Vargas^{3§}

¹Departamento de Parasitología-Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro. Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. (yisa8a@yahoo.com; jabaly1@yahoo.com; luisaguirreu@yahoo.com.mx).
²CONACYT-UAAAN Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro-Departamento de Parasitología, Buenavista, Saltillo, Coahuila, México. CP. 25315. (hernandez.anselmo1@gmail.com; moe.788@hotmail.com).
³Campo Experimental Uruapan- INIFAP. Avenida Latinoamericana No. 1101, Colonia Revolución, Uruapan, Michoacán, México. CP. 60500.

§Autor para correspondencia: mariotv60@hotmail.com.

Resumen

Michoacán es el principal estado productor de aguacate en el mundo; sin embargo, las enfermedades radiculares diezman y dañan los árboles ocasionando su muerte. El objetivo de la presente investigación fue evaluar el control orgánico del crecimiento *in vitro* de *Phytophthora cinnamomi* con aceites esenciales de orégano (*Lippia berlandieri*) y clavo (*Syzygium aromaticum*). En los meses de octubre y noviembre de 2016, se recolectaron muestras de raíces en árboles con síntomas de la enfermedad en aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass), en la huerta experimental del INIFAP ubicada en San Juan Nuevo Parangaricutiro, Michoacán. Los aislados se identificaron morfológica y molecularmente. Se evaluó el control de *P. cinnamomi* con aceites esenciales de orégano y clavo determinando la concentración media inhibitoria y sus límites fiduciales al 95% mediante una regresión Probit por el método de máximas verosimilitud. Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico R 3.4. De acuerdo con los resultados obtenidos, en relación con la inhibición del crecimiento hay una reducción en el crecimiento de *P. cinnamomi*. Los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y orégano (*Lippia berlandieri*) son una alternativa natural para el control del oomiceto *P. cinnamomi* por su actividad fungicida a bajas concentraciones y pueden incluirse en programas de manejo integrado de enfermedades.

Palabras clave: *Persea americana* Mill. var. Hass., aceite esencial, inhibición, tasa de crecimiento.

Recibido: marzo de 2019

Aceptado: junio de 2019

El aguacate (*Persea americana* Mill.) es el fruto de un árbol originario de México y Centroamérica (Téliz, 2000). La producción mundial del cultivo es de alrededor de 4 700 000 toneladas y 70.3% de esta producción lo aporta el continente americano (FAOSTAT, 2015). La República Mexicana es la más importante productora y exportadora de aguacate en el mundo, con una producción de casi 2 millones de toneladas, de las cuales el estado de Michoacán aporta 77% de la producción nacional, convirtiéndolo en la capital mundial de este cultivo (SIAP 2017).

Sin embargo, existen diferentes limitantes fitosanitarias, las cuales, reducen significativamente el rendimiento, ocasionando malformaciones del fruto, causan pérdidas considerables en postcosecha e incluso la muerte del árbol. Se tiene conocimiento de diferentes patógenos causantes de las enfermedades fungosas conocidas como roña (*Sphaceloma perseae*), antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y el oomiceto cosmopolita *Phytophthora cinnamomi*, causante de la pudrición del sistema radicular y en la parte aérea del árbol una marchitez conocida como tristeza del aguacatero, *P. cinnamomi* es considerado de gran importancia económica (Zentmyer *et al.*, 1994; Pérez, 2008).

Este patógeno, ataca a todas las variedades de aguacate en el mundo, dañando las raíces por efecto de un taponamiento de los haces vasculares, traducándose en la muerte del árbol (Coffey, 1992; Whiley *et al.*, 2007). En México, se ha detectado la presencia de la enfermedad conocida como tristeza del aguacatero en todas las zonas productoras; destacando por la severidad de los daños, como por ejemplo en la región de Atlixco, Puebla, donde ocasionó la casi desaparición de este cultivo Reyna (1983). En la región productora de Michoacán, se considera que alrededor de 4 000 ha están afectadas por la enfermedad, presentando una tendencia exponencial (Téliz, 2000).

En este sentido, es necesario tener amplio conocimiento del comportamiento *in vitro* de *P. cinnamomi* así como de alternativas orgánicas para su control. Por consiguiente, se requiere partir de medios de cultivos alternativos para acelerar su desarrollo y por ende poder efectuar evaluaciones rápidas en cuanto a su crecimiento, ya que este fitopatógeno es afectado en su desarrollo *in vitro* por diferentes factores como la temperatura. El control de las enfermedades fúngicas, ha dependido en gran medida de los tratamientos con agroquímicos; sin embargo, su uso representa un severo riesgo para la salud humana y contribuye al aumento de la contaminación al medio ambiente (Abdel-Monahim *et al.*, 2011).

Para reducir este problema, existe la necesidad de investigar, generar, validar, transferir y adoptar estrategias que sean accesibles, sencillas de aplicar y no tóxicas para seres humanos y animales (Naeini *et al.*, 2010). En la actualidad, los productos naturales gozan de amplia aceptación y reemplazan cada vez más a los productos de síntesis química.

Como respuesta a esta tendencia, se ha producido un creciente interés en la investigación de la posible utilización de aceites esenciales y extractos de plantas como fungicidas naturales, que no sean perjudiciales para el medio ambiente (Benites *et al.*, 2009; Bajpai y Kang, 2010). Se ha demostrado que los aceites esenciales y sus compuestos tienen un efecto fungicida (Wilson *et al.*, 1997; Gogoi *et al.*, 1997), por lo cual, ha incrementado el interés por la aplicación de este tipo de productos como agentes antimicrobianos naturales en alimentos y cultivos agrícolas (Celis *et al.*, 2012). Por ende, la agricultura del nuevo milenio debe establecer nuevas alternativas de control que produzcan un menor impacto ambiental, ya que día con día va en aumento el porcentaje de consumidores que demandan alimentos inocuos y libres de residuos de productos químicos, seguros para la salud humana (Ponce *et al.*, 2004).

Por tanto, el objetivo de la presente investigación fue evaluar la dinámica del crecimiento *in vitro* de *P. cinnamomi* en medios de cultivo alternativos y su control con aceites esenciales de orégano (*Lippia berlandieri*) y clavo (*Syzygium aromaticum*).

Muestreo: en los meses de octubre y noviembre de 2016, se recolectaron muestras de raíces en árboles de aguacate (*Persea americana* Mill. var. Hass) bajo presión de inóculo que presentaban sintomatología característica de muerte descendente conocida como tristeza del aguacate. El sitio de recolección fue la huerta experimental del INIFAP ubicada en San Juan Nuevo Parangaricutiro, Michoacán, cuyas condiciones climáticas semicálidas, subhúmedas con lluvias en verano, oscilan entre los 1200 a 1600 mm de precipitación y temperaturas de 10 a 28 °C (García, 1981).

Se realizó un muestreo dirigido cercano al área de goteo a una profundidad de 30 cm en cuatro puntos equidistantes. Con ayuda de una pala recta se tomaron las muestras de raíz (2 a 6 mm de diámetro), con presencia de daño (tejido necrosado color café oscuro) y se colocaron en bolsas de polietileno previamente rotuladas con los datos de la huerta, municipio y georreferenciación, posteriormente se transportaron al laboratorio de fitopatología del departamento de Parasitología Agrícola en la Universidad Autónoma Agraria Antonio Narro (UAAAN).

Aislamiento de los fitopatógenos: se lavaron las raíces con agua destilada estéril para fragmentarlas en trozos no mayores a 0.5 cm, con un bisturí estéril se realizó un corte longitudinal seleccionando los límites de tejido sano y enfermo, los cortes de raíz se lavaron en solución de hipoclorito de sodio al 1% durante 3 min, seguido de tres lavados con agua destilada estéril y se colocaron en papel absorbente previamente esterilizado. Posteriormente, se sembraron en medio selectivo V8[®]-PARPH colocando cuatro trozos de raíces en forma horizontal en cajas Petri de 8.5 cm de diámetro; tres cajas por muestra, dando un total de 12 raíces por árbol muestreado y finalmente los aislados se incubaron a 28 °C por tres días en obscuridad total (Fierro, 2011).

Purificación y multiplicación: Se transfirieron a medio de cultivo V8[®]-Agar (Erwin y Ribeiro, 1996), cepas con crecimiento característico de *P. cinnamomi*. La técnica de purificación utilizada fue por punta de hifa por triplicado, colocadas el centro de la caja Petri, fueron selladas con filme plástico sellador (*cling wrap*) y se incubaron a 28 °C en cámara bioclimática durante 72 h en el laboratorio de Fitopatología del Departamento de Parasitología Agrícola.

Identificación morfológica y molecular: la esporulación del patógeno se indujo con tiempo de incubación de 7 días y temperatura controlada de 28 °C ± 2, se identificaron morfológicamente considerando micelio cenocítico, hialino, con presencia de oogonio y crecimiento coraloides, coincidiendo con lo reportado por Erwin y Ribeiro (1996) y molecularmente mediante la técnica PCR-ITS, extrayendo ADN de acuerdo con la metodología de Doyle y Doyle (1990), a partir de 0.2 g de micelio del cultivo puro con buffer de lisis (EDTA 50 mM, pH 8.5; Tris HCl 100 mM, pH 8; NaCl 50 mM; SDS 2%).

La visualización del ADN se realizó en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (GenScript[®]). La amplificación de la región ITS se llevó a cabo con los iniciadores ITS1 (5'-TCCGTAGGTGAACCTGCGG-3') e ITS4 (5'-TCCTCCGCTTATTGATATGC-3'). De igual manera se visualizó el producto de la reacción por medio de electroforesis en gel de agarosa al 2% teñido con GelRed (GenScript[®]) y el producto del PCR se mandó secuenciar al laboratorio de diagnóstico fitosanitario UA-LAB.

Bioensayos: los aceites esenciales (AE) se obtuvieron de hojas de orégano (*Lippia berlandieri*) (T1) y botones florales de clavo (*Syzygium aromaticum*) (T2), mediante a la técnica de arrastre de vapor (Ortuño, 2006). Se determinó la efectividad biológica de los AE sobre *P. cinnamomi* con la metodología del medio de cultivo V8[®]-Agar envenenado con diferentes concentraciones 5, 45, 80, 200, 400 y 800 ppm con cuatro repeticiones cada una y un testigo absoluto, se agregó alcohol, tween 80 y goma xantana como agentes emulsificantes.

La siembra se realizó transcurridas las 24 h colocando explantes de 5 mm de diámetro en el centro de las cajas Petri y se incubaron en oscuridad total a 28 ± 2 °C. Para registrar el crecimiento micelial, se midió el crecimiento radial cada 24 h en los cuatro puntos cardinales de las cajas y finalizó cuando los testigos absolutos (TA) del fitopatógeno llenaron la caja Petri. Se calculó el porcentaje de inhibición en *P. cinnamomi* empleando la fórmula utilizada por Ochoa *et al.* (2012) la cual consiste en determinar el porcentaje mediante la razón de la diferencia de los tratamientos y el testigo, respecto al crecimiento del testigo.

Análisis estadístico: en los bioensayos, se determinó la concentración media inhibitoria y sus límites fiduciales al 95% mediante una regresión Probit por el método de máximas verosimilitud. Los análisis se realizaron utilizando el programa estadístico R 3.4.

Derivado del aislamiento e identificación morfológica y molecular de los fitopatógenos obtenidos de los muestreos realizados en la huerta experimental bajo presión de inóculo, se lograron obtener diferentes cepas de la misma especie coincidiendo con las claves de identificación de Erwin y Ribeiro (1996) para *P. cinnamomi*, confirmando la identificación mediante comparar los productos de la secuenciación con los registros de la base de datos del GenBank (Cuadro 1).

Cuadro 1. Caracterización molecular de los aislamientos de las secuencias reportadas en el banco de genes con las secuencias intergénicas (ITS) de los genes rDNA.

Cepa ¹	Núm. de acceso ²	Especie	Similaridad ³	Origen ⁴
Pc-33	LN846114.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	Islas Canarias
Pc-41	LN846114.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	Islas Canarias
Pc-42	KP183223.1	<i>Phytophthora cinnamomi</i>	99%	Australia B

¹= nomenclatura para los diferentes aislamientos; ²= número de acceso en la base de datos del NCBI (National Center of Biotechnology Information); ³= índice de similitud entre las secuencias de las especies aisladas y las especies comparadas; ⁴= origen geográfico de los aislados.

Referente a la inhibición obtenida con los aceites esenciales, las regresiones son altamente significativas en los tratamientos evaluados ($\alpha = 0.05$) a que a mayor concentración se observó una reducción en el crecimiento de *P. cinnamomi* (Figura 1). La concentración media inhibitoria estimada para el aceite esencial de orégano fue 59.36 ppm, obteniendo una inhibición de 100% contra el crecimiento micelial del Oomiceto a una concentración de 800 ppm.

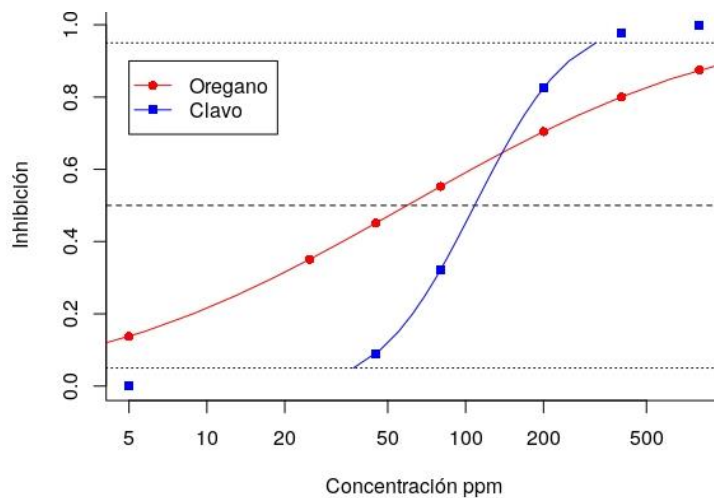


Figura 1. Inhibición de *P. cinnamomi* con aceite esencial de orégano y clavo a diferentes concentraciones.

En *P. infestans*, fitopatógeno perteneciente al mismo género, Soyly *et al.* (2006) Reportó inhibición total con aceite esencial de orégano a una dosis de $0.3 \mu\text{g ml}^{-1}$, investigaciones similares refieren el uso de este aceite para el control del Deuteromicetos, Cueto *et al.* (2010) presenta resultados de la acción fungicida del aceite y extracto etanólico de orégano sobre *Fusarium oxysporum*, sin embargo la acción antifúngica pueden variar según la biología del patógeno: por ejemplo, García *et al.* (2006) reportó una inhibición de 100% a una concentración de 100 ppm en *Aspergillus flavus*, cuyo valor de CI_{50} es más bajo respecto a nuestra investigación. Por otra parte, Carrillo *et al.* (2010) atribuye su efecto fungicida asociándolo con el contenido de timol y carvacrol.

Estos compuestos de unidades terpénicas presentes en los aceites esenciales de algunas especies de la familia Lamiaceae, actúan causando alteraciones en la morfología y agregados hifales, provocando una reducción del crecimiento mediante la lisis entre la pared y la membrana celular del agente patógeno (Kordal *et al.*, 2008).

El carvacrol aumenta la fluidez de la membrana causando fuga de protones e iones de potasio, lo que resulta en un colapso del potencial de membrana y la inhibición de la síntesis del ATP (Fisher y Phillips, 2008). Respecto al aceite esencial AE clavo (T2), presentó una CI_{50} más alto que AE orégano siendo 1.824x mayor (Cuadro 2); sin embargo, al observar su CI_{95} , este valor es menor respecto a T1 (AE orégano), considerando la Figura 1, esto se debe a la homogeneidad de la susceptibilidad del patógeno al aceite esencial (T2), la cual se encuentra con menor cantidad de aceite, diferente de T1, el cual requiere mayor concentración para incrementar la inhibición, actualmente, este aceite esencial es utilizado en la agricultura para contrarrestar otros fitopatógenos como *Phytophthora nicotianae* (Browsers y Locke, 2004). *S. aromaticum* obtenidos por destilación tradicional y asistido por microondas, es eficiente para inhibir el desarrollo de *Alternaria solani* y *Colletotrichum gloeosporioides* en 30 y 10% aislados de tomate y papaya, respectivamente (Ramírez *et al.*, 2016). Por otra parte, Damián *et al.* (2010) reportaron que el extracto de *Artemisa* sp., inhibe 100% del crecimiento micelial de *Phytophthora cactorum*, *P. capsici*, *P. cinnamomi* y *P. mirabilis*, así como 60% de *P. infestans*, a una dosis 100 ppm, esta información difiere a los resultados del presente estudio se necesitan mayores concentraciones para el control de *P. cinnamomi*.

Cuadro 2. Concentración media inhibitoria de los aceites esenciales sobre *P. cinnamomi*.

Tratamiento	n	gl	ppm				Ec. Pred.	P valor
			CI ₅₀	LFI - LFS	CI ₀₅	CI ₉₅		
<i>Lippia berlandieri</i>	24	5	59.36	26.84-114.09	1.437	2451.75	y= -1.8+1.01	6.5e ⁻⁰⁶
<i>Syzygium aromaticum</i>	24	5	108.3	87.29-134.06	36.862	318.208	y= -7.15+3.51	1.71e ⁻¹¹

N= número de repeticiones; gl= grados de libertad; CI= concentración inhibitoria, LFI y LFS limite fiducial superior e inferior al 95%; Ec. pred.= ecuación de predicción, P valor, valor de probabilidad ($\alpha= 0.05$).

Raina (2001) por cromatografía de gases evaluó la composición del aceite de clavo, señalando que el alilbenceno eugenol es el principal compuesto con 94%, cuyo modo de acción propicia la disrupción de la actividad citoplasmática de la membrana aumentando su permeabilidad no específica, además sugiere que eugenol posee actividad inhibitoria de la ATPasa (Gutiérrez *et al.*, 2017). Ambos tratamientos son agentes potenciales de control que pueden ser incluidos en programas de manejo de la tristeza del aguacatero causada por *P. cinnamomi*, los compuestos y metabolitos secundarios de las diferentes especies botánicas juegan un papel importante en su resistencia contra plagas, por lo cual, las investigaciones sobre las propiedades antimicrobianas de los aceites esenciales permiten descubrir nuevos agentes para el control de fitopatógenos de forma orgánica (Kordali *et al.*, 2007; Lee, 2007).

Conclusiones

De acuerdo con los resultados obtenidos, el medio de cultivo Centeno-agar fue el más eficiente para el aislamiento y proliferación de *Phytophthora cinnamomi* obteniendo un mayor crecimiento de estructuras morfológicas. Los aceites esenciales de clavo (*Syzygium aromaticum*) y orégano (*Lippia berlandieri*) son una alternativa botánica para el control del oomiceto *P. cinnamomi* por su actividad fungicida por lo que pueden incluirse en programas de manejo integrado de enfermedades, a un costo más bajo que agroquímicos convencionales.

Literatura citada

- AALPAUM. 2016. Asociación agrícola local de productores de aguacate de Uruapan, Michoacán. <http://www.aalpaum.com>.
- Abdel-Monahim, M. F.; Abo-Elyousr, K. A. M. and Morsy, K. M. 2011. Effectiveness of plant extracts on suppression of damping-off and wilt diseases of lupine (*Lupinus termis* Forsik). Crop Prot. 30:185-191.
- Bajpai, V. K. and Kang. S. C. 2010. Antifungal activity of leaf essential oil and extracts of *Metasequoia glyptostroboides* Miki ex Hu. J. Am. Oil Chem. Soc. 87:327-336.
- Benites, N. P.; Meléndez, E. and Stashenco, E. E. 2009. Composición química y actividad antibacteriana del aceite esencial de hojas de *Piper lanceaefolium*, planta usada en Colombia. Boletín Latinoamericano y del Caribe de plantas medicinales y aromática. 8(4):301-304.
- Bowers, J. and Locke, J. C. 2004. Effect of formulated plant extracts and oils on population density of *Phytophthora nicotiana* in soil and control of Phytophthora blight in the greenhouse. Plant. Dis. 88:11-16.

- Carrillo, Y. A.; Gómez, M. I.; Cotes, J. M. y Nústez, C. E. 2010. Efecto de algunos aceites esenciales sobre el crecimiento de *Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary en condiciones de laboratorio. *Agron. Colomb.* 28(2):245-253.
- Celis, F. A.; Mendoza, F. C. y Pachón, S. E. 2012. Plantas aromáticas silvestres promisorias por su contenido de aceites esenciales. Universidad de Cundinamarca. Ed. Produmedios. Bogotá, DC. Colombia. 56 p.
- Coffey, M. D. 1992. *Phytophthora* root rot of avocado. *In: Plant.* 22:423-444.
- Cueto, W. M. C.; Rivas-Morales, C.; Alanís-Guzmán, M. G.; Oranday-Cárdenas, A.; Amaya-Guerra, C. A.; Núñez-González, A.; Samaniego-Gaxiola, J. A. and Cano-Ríos, P. 2010. Antifungal properties of essential oil of mexican oregano (*Lippia berlandieri*) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Rev. Mex. Micol.* 31:29-35.
- Damián, B. L. M.; Martínez, M. R. E.; Salgado, G. R. and Martínez, P. M. M. 2010. *In vitro* antioomycete activity of *Artemisia ludoviciana* extracts against *Phytophthora* spp. *Boletín Latinoamericano y del Caribe de Plantas Medicinales y Aromáticas.* 9(2):136-142.
- Doyle, J. and Doyle, J. L. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus.* 12:13-15.
- Erwin, D. and Ribeiro, O. 1996. *Phytophthora* diseases worldwite. American Phytopathological Society Press, St. Paul, Minnesota. 269-280 pp.
- FAOSTAT. 2015. Food and Agriculture Organization of the United Nations.
- Fisher, K. and Phillips, C. 2008. Potential antimicrobial uses of essential oils in food: is citrus the answer? *Trends Food Sci Technol.* 19:156-64.
- García, E. 1981. Modificaciones al sistema de clasificación climática de Köppen, Adaptado para las Condiciones de la República Mexicana. 3ª Ed. Offset. Lario (Ed). SA. 252 p.
- García-Camarillo, E.; Quezada-Viay, M.; Moreno-Lara, J.; Sánchez-Hernández, G.; Moreno-Martínez, E. y Pérez-Reyes, M. 2006. Actividad antifúngica de aceites esenciales de canela (*Cinnamomum zeylanicum* Blume) y orégano (*Origanum vulgare* L.) y su efecto sobre la producción de aflatoxinas en nuez pecanera [*Carya illinoensis* (F.A. Wangerh) K. Koch]. *Rev. Mex. Fitopatol.* 24(1):8-12.
- Gogoi, R.; Baruah, P. and Nath, S. C. 1997. Antifungal activity of the essential oil of *Lisea cubeba* Pers. *J. Essential Oils Res.* 9:213-215.
- Gutiérrez-Jiménez, E.; Pedroza-Sandoval, A.; Martínez-Bolaños, L.; Samaniego-Gaxiola, J. A. and García-González, F. 2017. Effect of natural oils against *Mycosphaerella jiensis* under *in vitro* conditions and detection of active plant chemicals. *Rev. Mex. Fitopatol.* 36(1).
- Kordal, S.; A. Cakir, H.; Ozer, R.; Cakmakci, M.; Kesdek and Mete, E. 2008. Antifungal, phytotoxic and insecticidal properties of essential oil isolated from Turkish *Origanum acutidens* and its three components, carvacrol, thymol and poycymene. *Bioresour. Technol.* 99(18):87-95.
- Kordali, S.; Kotan, R. and Cakir, A. 2007. Screening of *in vitro* antifungal activities of 21 oxygenated monoterpenes as plant disease control agents. *Allelopathy J.* 19:373-392.
- Lee, H. 2007. Fungicidal property of active component derived from *Acorus gramineus* rhizome against phytopathogenic fungi. *Biores. Techn.* 98:1324-1328.
- Naeini, A.; Ziglari, T.; Shokri, H. and Khosravi, A. R. 2010. Assessment of growth-inhibiting effect of some plant essential oils on different *Fusarium* isolates. *J. Med. Mycol.* 20(3):174-178.
- Ochoa-Fuentes, Y. M.; Cerna, E.; Gallegos, G.; Landeros, Delgado, J. C.; Hernández, S.; Rodríguez, R. and Olalde, V. 2012. Identificación de especies de *Fusarium* en semilla de ajo en Aguascalientes, México. *Rev. Mex. Micol.* 36:27-32.
- Ortuño, M. 2006. Manual práctico de aceites esenciales, aromas y perfumes. Ed. Aiyana, 1ª edición. 121 p.

- Pérez, J. R. M. 2008. Significant avocado diseases caused by fungi and oomycetes. *The European Journal of Plant Science and Biotechnology*. 2(1):1-24.
- Ponce, A. G.; Del Valle, C. and Roura, S. I. 2004. Evaluation of plant essential oil as natural postharvest disease control of tomato (*Lycopersicon esculentum* L.). *Inter. Soc. Hortic. Sci.* 628:737-745.
- R Core Team. 2018. R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. URL. <https://www.R-project.org/>.
- Raina, V. K.; Srivastava, S. K.; Aggarwal, K. K.; Aggarwal, K. V. and Syamasundar, S. K. 2001. Essential oil composition of *Syzygium aromaticum* leaf from Little Andaman, India. *Flavour Fragr. J.* 16:334-336.
- Ramírez-González, S.; López-Báez, O.; Espinosa-Zaragoza, S. y Wong-Villarreal, A. 2016. Actividad antifúngica de hidrodestilados y aceites sobre *Alternaria solani*, *Fusarium oxysporum*, *Colletotrichum gloesporioides*. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 7(8):1879-1891.
- Reyna, T. T. 1983. Consideraciones sobre el cultivo del aguacate *Persea americana* Mill. en Atlixco, Puebla. *Invest. Geog.* 13:55-103.
- SAGARPA. 2016. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Desarrollo Social, Pesca y Alimentación. Sistema de Información agroalimentaria y pesquera. Boletín Informativo. México, DF. <https://www.sagarpa.gob.mx/siap>.
- SIAP. 2017. Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera. SAGARPA. México. <https://www.siap.gob.mx>.
- Soylu, E. M.; Soylu, S. and Kurt, S. 2006. Antimicrobial activities of the essential oils of various plants against tomato late blight disease agent *Phytophthora infestans*. *Mycopathol.* 161(2):119-128.
- Tajkarimi, M.; Ibrahim, S. and Cliver, D. 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. *Food Control.* 21(19):1199-1218.
- Téliz, O. D. 2000. El aguacate y su manejo integrado. Primera edición, Mundi-Prensa. México, DF. 219 p.
- Téliz, O. D. y Marroquín, P. F. 2007. Importancia histórica y socioeconómica del aguacate. *In: Téliz, O. D. y Mora, A. (Eds.). El aguacate y su manejo integrado. 2ª (Ed.). Mundi-Prensa. México. 3-16 pp.*
- Whiley, A.W.; Schaer, By. y Wosltenholme, B. N. 2007. El Palto, botánica producción y usos. Ediciones Universitarias de Valparaíso. Pontificia Universidad Católica de Valparaíso Chile. 364 p.
- Wilson, C. L.; Ghaouth, A.; Wisniewski, M. E. and Wisniewski, M. E. 1999. Prospectin in mature's storehouse for Biopesticides. *Rev. Mex. Fitopatol.* 17:49-53.
- Zentmyer, G.; Ohr, H. and Menge, J. 1994. Compendium of tropical fruit diseases. The American Phytopathological Society. 76 p.