

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICA



Estrategias bioquímicas para la producción de compuestos con actividad biológica inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos que afectan a cultivos del mango en la región de La Plazuela, Irupana La Paz.

Tesis de Maestría Presentado por:

Lic. Marisel Mercedes Mamani Mamani

LA PAZ-BOLIVIA

2018

UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS Y BIOQUÍMICAS
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FÁRMACO BIOQUÍMICA
MAESTRÍA EN CIENCIAS BIOLÓGICAS Y BIOMÉDICAS
MENCION DE BIOTECNOLOGÍA



Estrategias bioquímicas para la producción de compuestos con actividad biológica inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos que afectan a cultivos del mango en la región de La Plazuela, Irupana La Paz.

Tesis de Maestría Presentado por:

Lic. Marisel Mercedes Mamani Mamani

Tutor(es): María Teresa Álvarez Aliaga PhD.

Ms Sc Danitza Xiomara Romero Calle


LA PAZ-BOLIVIA

2018

APROBACION DEL TUTOR

En mi carácter de Tutora del trabajo presentado por la licenciada Marisel Mercedes Mamani Mamani titulada en Bioquímica, para optar el título de Magister Scientiarum, consideramos que dicho trabajo reúne los requisitos y méritos suficientes para ser sometido a la evaluación por parte del jurado externo examinador que se designó.

En la ciudad de La Paz, a los 30 días del mes de Marzo del año 2017



María Teresa Álvarez Aliaga PhD.



Ms Sc Danitza Xiomara Romero Calle

Dedicatoria:

El presente trabajo está dedicado para Rosmery Yujra de Condori (†), por ser la base que me ayudo a llegar hasta aquí, a mis padres: Eusebio Mamani y Petrona Mamani, por estar conmigo, apoyarme, guiarme y enseñarme a levantarme en cada caída que la vida me dé.

Resumen

Hoy en día, la pérdida de cultivos debido a ataques de plagas sigue siendo uno de los principales problemas de la agricultura mundial. En Bolivia, se ha determinado que aproximadamente 70% de la producción agropecuaria y frutícola se ve afectada por plagas y fitopatógenos propios de cada región. En La Plazuela (Irupana - La Paz) región principalmente frutícola; se ve afectada por pérdidas anuales del 70 % de las cosechas de mango, traduciéndose en una pérdida económica de Bs. 4.868.650,00. Esta pérdida se debe esencialmente a la manipulación inadecuada, presencia de la mosca de la fruta americana y a enfermedades ocasionados por fitopatógenos de origen fúngico. El empleo de microorganismos con capacidad inhibitoria de crecimiento de fitopatógenos fúngicos es una alternativa que nace a raíz del manejo desmesurado de agentes químicos para el control de plagas y enfermedades en cultivos agrícolas. El presente trabajo tiene como objetivo estudiar estrategias bioquímicas para la producción de compuestos con actividad biológica inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos que afectan a cultivos del mango en la región de La Plazuela, Irupana La Paz. Para ello, la metodología comprende cinco etapas: 1) identificación de fitopatógenos a partir de muestras con síntomas de enfermedad recolectados en la región de La Plazuela - Irupana, 2) preparación de extractos orgánicos de ajo, 3) optimización del medio de cultivo para obtener el filtrado crudo bacteriano de *Bacillus subtilis* cepa YHPL-BJ y la optimización de las condiciones físicas y biológicas del medio de cultivo para obtener el filtrado crudo fúngico de *Trichoderma harzianum*, cepa Bol 12 QD, 4) Evaluación de la actividad inhibitoria del crecimiento de los compuestos en estudio sobre los fitopatógenos aislados e identificados 5) ensayos de genotoxicidad y fitotoxicidad de los compuestos con actividad biológica inhibitoria. Resultado: Se identificaron tres fitopatógenos 1) *Colletotrichum sp.* (Agente causal de la antracnosis), *Fusarium verticillioides* (agente causal de la escoba de la bruja) y *Neopestalotiopsis sp.* (Agente causal de la mancha foliar). El porcentaje de inhibición de estos fitopatógenos fue del 100% cuando se utilizó extracto de ajo en vinagre de vino tinto, filtrado bacteriano crudo de *Bacillus subtilis* inoculado en caldo de papa suplementado con urea y el filtrado crudo fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12QD obtenido en condiciones de luz LED violeta Y 120 rpm. Y por último las pruebas de genotoxicidad y fitotoxicidad realizadas con los extractos orgánicos de ajo, filtrado bacteriano y

el filtrado fúngico no mostraron efectos genotóxico ni fitotóxicos a las concentraciones estudiadas, obteniendo de esta manera compuestos con actividad inhibitoria de crecimiento amigable para el medio ambiente

Palabras clave: *Allium sativum*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium verticillioides* y *Neopestalotiopsis sp.*

Abstract

Now days the loss of crops due to the pest attacks remains one of the main agricultural problems around the world. In Bolivia, it has been determined that approximately 70% of agricultural and fruit production is affected by pests and phytopathogens typical of each region. In La Plazuela (Irupana - La Paz) a mainly fruit-producing region, is affected by annual losses of 70% of the mango harvests, resulting in an economic loss of Bs. 4.868.650, 00. This loss is essentially due to inadequate handling, presence of the American fruit fly and diseases caused by phytopathogens of fungal origin. The use of microorganisms with capacity to inhibit for the growth of fungal phytopathogens is an alternative that arises from the excessive handling of chemical agents for pest control and diseases in agricultural crops. The present work has the objective of studying biochemical strategies for the production of compounds with inhibitory activity against phytopathogens that affect mango crops in the region of La Plazuela, Irupana La Paz. To full fill these requirements the methodology included five stages: 1) identification of phytopathogens from samples with disease symptoms collected in La Plazuela - Irupana region, 2) preparation of organic extracts of garlic, 3) chemical optimization of culture media to obtain the bacterial crude filtrate of *Bacillus subtilis* strain YHPL-BJ and the optimization of the physical and biological conditions of the culture medium to obtain the fungal crude filtrate of *Trichoderma harzianum*, strain Bol 12 QD, 4) Evaluation of the inhibitory activity of the compounds under study against isolated and identified phytopathogens 5) genotoxicity and phytotoxicity assays of compounds with inhibitory biological activity. Results: Three phytopathogens were identified 1) *Colletotrichum sp.* (Causal agent of anthracnose), *Fusarium verticillioides* (causal agent of the witch's broom) and *Neopestalotiopsis sp.* (causative agent of leaf spot). The percentage of inhibition of these phytopathogens was 100% when garlic extract in red wine vinegar, crude bacterial filtrate of *Bacillus subtilis* inoculated in potato broth supplemented with urea and was used the fungal crude filtrate of *Trichoderma harzianum* strain Bol 12QD obtained in Violet

LED light conditions and 120 rpm. Finally, genotoxicity and phytotoxicity tests with organic extracts of garlic, bacterial filtrate and fungal filtrate did not show genotoxic effects nor phytotoxic effects at the concentrations studied, thus obtaining compounds with environmentally friendly growth inhibitory activity.

Key words: *Allium sativum*, *Bacillus subtilis*, *Trichoderma harzianum*, *Colletotrichum sp.*, *Fusarium verticillioides* y *Neopestalotiopsis sp.*

Indicé

I. Introducción.....	1
II. Antecedentes	3
1. Aspectos generales de Irupana y daño económico.	3
Provincia de Sud Yungas	3
2. Problemática del mango.....	4
3. Agroquímicos.....	6
4. Estrategias de control biológico.....	7
• <i>Allium sativum</i> (Ajo).....	7
• <i>Bacillus subtilis</i>	8
• <i>Trichoderma</i>	9
III. Justificación	11
IV. Hipótesis de investigación.	13
Hipótesis nula.....	13
Hipótesis alternativa.....	13
V. Objetivos	14
1. General.....	14
2. Especifico.....	14
VI. Materiales y metodología	15
1. Material biológico.....	15
• Microorganismos antagonicos.....	15
• Colecta de muestras contaminadas con fitopatógenos.	15
2. Metodología	15
2.1. Caracterización morfológica y molecular de las cepas de fitopatógenos fúngicos.....	15

• Identificación morfológica	15
• Identificación molecular.....	16
2.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos orgánicos de ajo	18
• Obtención de los extractos orgánicos de ajo.	18
• Determinación de la concentración mínima.....	18
• Determinación de los compuestos biológicamente activos de los extractos orgánicos de ajo.	19
2.3. Determinación de la actividad biológica inhibitoria de los filtrados de cultivos de <i>Bacillus subtilis</i> cepa YHPL-BJ.....	19
• Establecimiento de cultivos en Batch en medio PDA de <i>Bacillus subtilis</i> cepa YHPL -BJ. .	19
• Establecimiento de cultivos en Batch en medio de cultivo PDA modificado de <i>Bacillus subtilis</i> cepa YHPL -BJ.....	20
• Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM).	20
2.4. Determinación de la actividad biológica inhibitoria los filtrados de los cultivos de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa BOL 12QD.	21
• Establecimiento de cultivos en Batch en medio PDA de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa BOL 12QD.....	21
• Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los filtrados fúngicos.....	22
2.5. Determinación de la actividad fitotóxica y genotóxica.....	22
• Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga <i>Lactuca sativa L.</i>	22
• Ensayo de Ames.	23
3. Determinación analítica.	23
• Recuento de esporas fúngicas.....	23
• Cinética de crecimiento fúngico.....	24
• Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).....	24

• Determinación de Kjeldahl.....	25
• Determinación de la actividad biológica inhibitoria.....	26
• Determinación de la actividad enzimática.....	26
○ Actividad Celulolítica.....	26
○ Actividad proteolítica.....	27
VII. Resultado y discusión.....	28
1. Identificación de los fitopatógenos fúngicos que afectan a los cultivos de <i>Mangifera indica</i> L.(mango) en la localidad de Irupana.....	28
• Identificación de <i>Colletotrichum sp.</i> (Causante de la enfermedad Antracnosis).....	28
➤ Identificación de <i>Fusarium sp.</i> (Causante de la enfermedad Escoba de bruja).....	30
➤ Identificación de la <i>Pestalotia sp.</i> (Causante de la enfermedad Mancha foliar).....	32
2. Concentración inhibitoria mínima de los extractos de ajo frente a fitopatógenos del mango. 34	
2.1. Actividad antifúngica frente a <i>Neopestalotiopsis spp.</i>	36
2.2. Actividad antifúngica frente a <i>Colletotrichum sp.</i>	38
2.3. Actividad antifúngica frente a <i>Fusarium verticillioides.</i>	40
3. Actividad biológica inhibitoria de los filtrados de cultivo de <i>Bacillus subtilis</i> cepa YHPL-BJ. 44	
4. Actividad biológica inhibitoria de los filtrados de cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa BOL 12QD.....	49
VIII. Conclusiones.....	61
IX. Bibliografía.....	63
X. Anexos.....	72

Índice de tablas

1. Plagas que afectan los cultivos en los Yungas La Plazuela.	4
2. Muestra y cantidad de reactivos para la digestión.	25
3. Porcentaje de inhibición de los filtrados fúngicos a diferentes condiciones de cultivo de <i>Trichoderma harzianum</i> cepa Bol 12QD, frente a <i>Colletotrichum sp.</i> , <i>Fusarium verticillioides</i> y <i>Neopestalotiopsis spp.</i>	52
4. Ensayo de test de Ames. Cepa TA 98 y TA 100, de los compuestos extracto de ajo en vinagre de manzana, filtrado crudo bacteriano de <i>Bacillus subtilis</i> y filtrado crudo fúngico de <i>Trichoderma harzianum</i> .	61
5. Ensayo de lechuga (<i>Lactuca sativa L.</i>), de los compuestos orgánicos de ajo, filtrado crudo bacteriano de <i>Bacillus subtilis</i> y filtrado crudo fúngico de <i>Trichoderma harzianum</i> .	62

Índice de figuras

Figura 1. Características macroscópicas de <i>Colletotrichum sp.</i> , Crecimiento radial: Aspecto micelial algodonoso con micelio aéreo aglomerado oscuro y compacto de color rosa salmón.	30
Figura 2. Identificación microscópica de los conidios de <i>Colletotrichum sp.</i> , tinción realizada con colorante vegetal. Se puede observar la presencia de conidios con bordes redondos y presencia de vacuolas.	31
Figura 3. Características macroscópicas de <i>Fusarium sp.</i> Crecimiento radial: aspecto micelial blanquecino disperso como un fieltro con una zona central de funículos.	32
Figura 4. Características microscópicas de <i>Fusarium. sp</i> Se observa macroconidios curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda.	32
Figura 5. Características macroscópicas de <i>Pestalotiopsis sp.</i> , Crecimiento radial: aspecto micelial ralo con la presencia de conidióforo de color negro de aspecto gomoso.	33
Figura 6. Identificación microscópica de <i>Pestalotiopsis sp.</i> Se observa esporas con 2 a 3 tabiques, con la célula central de color marrón con extremos hialinos.	34
Figura 7. Diagrama de cajas de los diferentes tratamientos antifúngicos que demuestran el porcentaje de inhibición media contra <i>Neopestalotiopsis spp.</i>	39
Figura 8. Diagrama de cajas de los diferentes tratamientos antifúngicos que demuestran el porcentaje de inhibición media contra <i>Colletotrichum sp.</i>	41
Figura 9. Diagrama de cajas de los diferentes tratamientos antifúngicos que demuestran el porcentaje de inhibición media contra <i>Fusarium verticillioides.</i>	43
Figura 10. Estructura química de la alicina	44
Figura 11. Diagrama de cajas de los diferentes tratamientos antifúngicos que demuestran el porcentaje de inhibición media contra <i>Colletotrichum sp.</i>	47
Figura 12. Diagrama de cajas de los diferentes tratamientos antifúngicos que demuestran el porcentaje de inhibición media contra <i>Fusarium verticillioides.</i>	48
Figura 13. Diagrama de cajas de los diferentes tratamientos antifúngicos que	49

demuestran el porcentaje de inhibición media contra *Neopestalotiopsis spp.*

Figura 14. Diseño experimental multivariado: Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Colletotrichum sp.* de acuerdo a la interacción entre las condiciones de cultivo de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD: agitación, luz y co-cultivo en medio caldo papa dextrosa 53

Figura 15. Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de *Colletotrichum sp.*, originado por efecto del filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD, producido a diferentes condiciones: agitación y luz violeta. 54

Figura 16. Diseño experimental multivariado: Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* de acuerdo a la interacción entre las condiciones de cultivo de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD: agitación, luz y co-cultivo en medio caldo papa dextrosa. 55

Figura 17. Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de *Fusarium verticillioides*, originado por efecto del filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD, producido a diferentes condiciones: agitación y luz violeta. 56

Figura 18. Diseño experimental multivariado: Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Neopestalotiopsis spp.*, de acuerdo a la interacción entre las condiciones de cultivo de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD: agitación, luz y co-cultivo en medio caldo papa dextrosa. 57

Figura 19. Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de *Neopestalotiopsis spp.*, originado por efecto del filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD, producido a diferentes condiciones: agitación y luz violeta. 58

I. Introducción

Hoy en día la pérdida de cosechas por ataques de plagas sigue siendo uno de los principales problemas de la agricultura mundial. En Bolivia el sector agrícola y frutícola presenta el 60 % de la incidencia de enfermedades (hongos, bacterias y virus) y plagas de importancia económica en cada región (MDRyT, 2010) generando pérdidas cuantiosas en este sector.

En el departamento de La Paz, la provincia de los Yungas y parte de la provincia Inquisivi constituyen parte de los valles interandinos de la cordillera que se caracterizan por tener mejores condiciones climáticas con respecto a otras regiones del departamento. Son lugares húmedos en su mayor parte cubierta por exuberante vegetación, teniendo como principales cultivos coca, frutas y en menor cantidad cultivos como tubérculos y maíz (IETA, 2012). Por otra parte, esta región enfrenta riesgos derivados de la topografía del territorio en la que predominan las pendientes, a este riesgo en la producción se suma la presencia de plagas y enfermedades en la producción agrícola.

Las plantas tienden a ser atacadas por enfermedades y plagas, siendo uno de los agentes principales la mosca de la fruta (*Anastrepha fraterculus*) la cual inicia el daño cuando la hembra ovipone en los frutos, dejando así una puerta de entrada a microorganismos patógenos que comienzan su acción de descomposición, formándose alrededor una mancha decolorada; los huevos cumplen su ciclo larvario alimentándose de la pulpa, lo cual favorece los procesos de oxidación y maduración prematura de la fruta originando una pudrición del fruto que queda inservible para el mercado desencadenando pérdidas en las cosechas (J.Katherine Valderrama, 2005).

En la provincia Sud Yungas localidad Irupana - La Plazuela región frutícola, donde se cultivan mangos, café, mandarinas, duraznos, paltas y maracuyá, entre otras frutas, se ve afectada por pérdidas anuales del 70 % en las cosechas de mango, traducándose en una pérdida económica de 4,868,650.00 Bs. Esta pérdida se debe esencialmente a la manipulación inadecuada a la presencia de la mosca de la fruta americana (*Anastrepha fraterculus*) como también a la presencia de enfermedades por fitopatógenos fúngicos e.g. (*Colletotrichum sp.*, *Fusarium sp.*, y *Pestalotia sp.*) (Eduardo, 2014).

Los métodos para el manejo de las enfermedades y plagas de los cultivos son mediante el uso de fungicidas y plaguicidas de origen químico los cuales traen como consecuencia intoxicación crónica en el hombre y problemas de contaminación ambiental, lo cual se manifiesta entre otros efectos nocivos en una mayor incidencia de plagas y enfermedades de los cultivos. Si bien se conoce los daños causados a la salud por los pesticidas, no se conoce la magnitud exacta que éstos llegan a tener.

En el último siglo el uso indiscriminado de productos químicos como pesticidas produjo un desequilibrio, afectando indirectamente a especies animales y en forma directa a las personas, pero eso no se evidenció sino años después, obligando a que sean estos pesticidas retirados del mercado, tal es el ejemplo del DDT (FAO, 2002).

Todo esto ha conducido a la búsqueda y el desarrollo de alternativas utilizando medios biológicos, en este caso el uso de compuestos biológicos obtenidos a partir de insectos, bacterias, hongos y plantas actualmente se está estudiando con gran profundidad cuales deberán tener la capacidad de inhibir o controlar la presencia de hongos fitopatógenos y/o tener efecto disuasivo a la ovoposición de la mosca de la fruta.

El presente estudio tiene como propósito producir compuestos con actividad antifúngica a partir de extractos orgánicos de ajo, filtrado bacteriano de *Bacillus subtilis* y filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa BOL 12 QD. Para cumplir dicho propósito, se establecerán estudios de actividad biológica (antibiosis), de los diferentes compuestos en estudio y, por último, la evaluación del efecto genotóxico y fitotóxico de estos compuestos bioactivos.

II. Antecedentes

1. Aspectos generales de Irupana y daño económico.

Los Yungas y parte de la provincia Inquisivi constituyen parte de los valles interandinos de la cordillera que se caracterizan por tener mejores condiciones climáticas con respecto algunas regiones del departamento. Son lugares húmedos en su mayor parte cubiertos por exuberante vegetación, teniendo como principales cultivos coca, frutas y en menor cantidad cultivos como tubérculos y maíz.

Provincia de Sud Yungas

Abarca una superficie aproximada de 10.000 km², con una población de 105.013,00 habitantes (MDRyT, 2010), de los cuales 17.216 personas habitan en las capitales de los municipios y la mayoría (85.103 personas) se encuentran en el resto de los municipios.

Ingresos Económicos: El ingreso mensual promedio de la región yungueña es de Bs. 1.726,00, monto que varía de acuerdo al contexto geográfico, debido a que, en las capitales, el ingreso medio mensual es de Bs. 2.307,00 monto que es mayor al promedio mensual del resto de los municipios donde es de Bs. 1.580,00

Actualmente en la región Yungueña de La Paz el 55 % son cultivos de coca seguida de cultivos de naranja (10%), banana (7%), papaya (2 %) y otros (26%). Por otro lado, en la provincia Inquisivi el 12% constituyen cultivos de chirimoya seguida de papa (17%), zapallo (8 %) y otros (63 %) (IETA, 2012). Estas regiones enfrentan riesgos derivados de la topografía del territorio en la que predominan las pendientes, sumado a la presencia de plagas y enfermedades en la producción agrícola.

En la actualidad en la región de los Yungas el 65 % agricultores encuentran en los agroquímicos el método de control más utilizado, tales como: tamaron 50 LS (insecticida), stermin 600 SL (insecticida), folidol M-72 (insecticida), ridomil gold 68WD (fungicida), etc., químicos que deterioran los suelos y ocasionan daños en la salud tanto del productor (en la aplicación), como del consumidor por sus efectos citotóxicos, genotóxico y teratógeno (Eduardo, 2014).

Tabla 1. Plagas que afectan los cultivos en los Yungas La Plazuela

Plaga	Nombre científico	% de ataque	Cultivo
Mosca de la fruta	<i>Anastrepha fraterculus.</i>	100	Mango, Cítricos, Palto
Broca	<i>Hypothenemus hampei</i>	21	Café, Mango
Escama blanca	<i>Aulacaspis tubercularis</i>	45	Mango, Cítricos
Polilla	<i>Cryptoblabes gnidiella</i>	11	Mango, Tomate, Maíz
Ticona	<i>Helicoverpa gelotopoeon</i>	15	Mango, Maíz, Vainitas
Yaja	<i>Phyllocnistis citrella</i>	23	Cítricos, Tomate

Fuente: CICBP- 2012.

2. Problemática del mango

Uno de los cultivos de importancia es el mango (*Mangifera indica L.*) este fruto, que ha sido cultivado por más de 4 mil años en la India, presenta diferentes formas salvajes con pequeños frutos y largas hojas; es originario de una vasta zona que se extiende desde la India hasta Filipinas y fue diseminado alrededor de la cintura intertropical en el siglo XVII por los navegantes europeos. El cultivo se adaptó a las condiciones climatológicas, en el continente americano a tal grado que con el paso de los años es uno de los componentes paisajísticos más comunes, sin contar que nuestro continente es el segundo productor de mango. La malformación del mango fue registrada por vez primera en el año de 1891 por la presidencia de Bombay en la India. Aparentemente pasó desapercibida hasta que en 1953 se señaló su gravedad en todas las zonas productoras importantes de dicho país. El primer reporte data de 1983, en el cual se señala su incidencia en aproximadamente un 12% de los árboles establecidos. En 1989 la incidencia rebasó los árboles plantados, causando una reducción en la producción de hasta del 60 %.

Actualmente la población de Irupana cuenta con 105.013 ha/10000 Km² del cual 60% de esta población se dedica al cultivo frutícola dando una población de 63.008 ha. Suponiendo que el 20% de esta población se dedica al cultivo de mango.

La producción neta de mango es de 64.300 TM/anuales, la producción neta comercializada es de 19.300 TM/anuales y la pérdida por mal manejo, ataque de plagas y enfermedades es de 45.000 TM/anuales.

Se ha reportado que 19.300 TM equivalen a 34.900 cajas de mango, y que cada caja tiene un costo de 60 Bs esto nos da un total de 2.094.000,00 Bs/anuales de ganancia neta comercializada. Pero si consideramos que 45.000 TM equivalen a 81.373 cajas y la caja cuesta 60 Bs se tiene una pérdida por mal manejo, plagas y enfermedades de 4.882.380 Bs/anuales. Dándonos un supuesto total de pérdidas del 70% de la producción bruta de mango por mal manejo, presencia de plagas y enfermedades, y un 30% de ganancia bruta neta comercializada de mango.

Con estos datos las provincias del Sureste del Departamento de La Paz, solicitaron a la UMSA, a través de la Gobernación del Departamento, el apoyo y asistencia técnica para el Control de Plagas que están atacando a la producción frutícola de la región, haciendo que los volúmenes de producción reduzcan considerablemente y que se traducen en menores ingresos económicos. Para dar respuesta a esta solicitud fue creado el Centro de Investigación y Control Biológico de plagas, mediante resolución del Honorable Consejo Universitario No 715/2009, el cual inicio sus actividades en la gestión 2011, desde esa fecha se llevó a cabo estudios sobre la problemática de los cultivos de mango. En ese estudio se determinó la presencia de dos plagas: la mosca de la fruta (*Anastrepha fraterculus*) y la antracnosis (*Colletotrichum spp.*).

- **La mosca de la fruta** (*Anastrepha fraterculus*), inicia el daño cuando la hembra ovipone, dejando así una puerta de entrada a microorganismos patógenos oportunistas, como ciertos hongos fitopatógenos que coadyuvan en la descomposición, formándose alrededor una mancha decolorada; los huevos inician y terminan su ciclo larvario dentro del fruto alimentándose de la pulpa, lo cual favorece los procesos de oxidación y maduración prematura de la fruta originando una pudrición del fruto quedando

inservible para el mercado (J.Katherine Valderrama, 2005). Este daño genera aproximadamente el 40 % de las pérdidas económicas ya que puede llegar a ser desapercibido durante la cosecha y la misma manipulación, lo que puede producir pérdidas en la comercialización. Además el principal daño indirecto se debe a la restricción impuesta por otros países a la exportación de fruta con riesgo de haber sido atacado por esta plaga.

- **La Antracnosis** es una enfermedad fúngica y su distribución es mundial; se presenta en todas las aéreas donde se cultiva mango, aunque su importancia varía en cada país. En Bolivia la enfermedad no se encuentra registrada, de acuerdo a la sintomatología que presenta esta enfermedad se indica la presencia de la enfermedad en los cultivos de mango, cítricos, palta entre otros productos. El agente causal es un hongo de los géneros *Colletotrichum (Gloeosporium)* o *Glomerella* que está presente durante todo el ciclo de cultivo; afecta diferentes partes de la planta e incluso causa daños post cosecha; en floración puede ocasionar la pérdida total de la producción (Bailey & Jeger, 1992). Las características de la enfermedad es la presencia de manchas negras necróticas (Agrios, 2005). El impacto socio económico que tiene la enfermedad en los cultivos es alto, existe reportes que evidencian pérdidas del 60 por ciento de la producción de la fruta (Orozco, y otros, 2007)

3. Agroquímicos.

Los tratamientos químicos empleados previo a la cosecha destinados a reducir los niveles de inoculo en el campo incluyen oxiclورو de cobre y benomilo. Las aplicaciones pre-cosecha de benomilo están actualmente restringida, si la fruta está destinada a ciertos mercados de exportación. Además, estudios realizados para determinar la incidencia de resistencia a benomilo, thiabendazol y prochloraz utilizando un ensayo *in vitro*. Reportaron que el 17,7 % fueron resistente a benomilo, de los cuales el 8,5 % fueron altamente resistentes y el 9,2 % moderadamente resistentes (Sanders, Korsten, & Wehner, 2000). Manejo tradicional con agroquímicos sintéticos ha ocasionado diversos problemas como la toxicidad a los productores (Whalen, y otros, 2003), detención de exportaciones por residuos en producto de consumo y daños al medio ambiente, así como afectación de organismos benéficos (Anderson, y otros, 2003). Otro aspecto importante es que los microorganismos fitopatógenos han generado

resistencia al ingrediente activo de algunos fungicidas sintéticos (Cooke, y otros, 2003), como respuesta a la presión de selección debido a las altas dosis y aplicaciones continuas, ocasionando grandes pérdidas económicas.

4. Estrategias de control biológico.

Actualmente, el control de hongos fitopatógenos requiere de aplicar técnicas alternativas y eficiente para el control de enfermedades es el uso de los productos naturales que pueden ser derivados de las plantas u obtenidos a partir de cultivos microbianos. Estos productos no afectan el medio ambiente ya que sus residuos son fáciles de degradar, son potenciales de utilizar en el control de patógenos de productos agrícolas en postcosecha, y permiten la obtención de productos agrícolas con calidad de exportación (Wilson y otros, 1997).

El control biológico surgió como una alternativa al uso de fungicidas para cultivos en campos y pos cosecha y ha comprendido el uso de cepas tales como *Cándida famata*, *Bacillus subtilis*, *Pla10*, *Meyerozyma guilliermondii*, *Meyerozyma caribbica*, *Trichoderma harzianum*, *Debaryomyces hansenii*, entre otras, que son eficaces en el control de las enfermedades fúngicas en plantas. Sin embargo, el uso de estos agentes biológicos puede determinar cambios en el ecosistema donde son aplicados y actuar como microorganismos oportunistas ante una deficiencia nutricional en las plantas provocando deterioro en las mismas. De igual manera, estos agentes biológicos podrían demostrar efectos tóxicos en el medio ambiente y el ser humano. Es así que una alternativa al uso de estos agentes es el empleo de fermentos o extractos de cultivos microbianos o de plantas que potencialmente presentan actividad biológica inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos.

A continuación, se detallan antecedentes referidos al empleo de fermentos o extractos de cultivos microbianos o de plantas que potencialmente presentan actividad biológica inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos:

- ***Allium sativum* (Ajo).**

El ajo es reconocido por sus propiedades medicinales como su acción bactericida, antiviral y antifúngica, así como su efecto positivo como diurético, expectorante y la prevención de hemorroides (Artigas, 2003), además de ser considerado una de las 20 hortalizas principales a nivel mundial.

Compuestos activos

El principal elemento activo en el ajo es la alicina, que actualmente se cree que mejora la inmunidad, previene el cáncer y las enfermedades cardiovasculares, y funciona como antibiótico. En los últimos años, ha habido continuas investigaciones e informes sobre los efectos físicos y medicinales de la alicina. De las diferentes partes de ajo, la mayor concentración de alicina se encuentra en el bulbo, luego las hojas, y finalmente la raíz. Diferentes órganos y diferentes partes en una misma etapa de crecimiento contienen diferentes contenidos de alicina debido a las diferencias en la actividad de aliina y aliinasa (Rabinkov, y colaboradores, 1995).

Se encontró que la alicina en su forma pura exhibía: i) actividad antibacteriana contra una amplia gama de bacterias Gram-negativas y Gram-positivas, incluyendo cepas enterotoxigénicas multiresistentes de *Escherichia coli*; ii) actividad antifúngica, particularmente contra *Candida albicans*; iii) actividad antiparasitaria, incluyendo algunos parásitos protozoarios intestinales humanos importantes tales como *Entamoeba histolytica* y *Giardia lamblia*; y iv) actividad antiviral (Ankri & Mirelman, 1999).

Naupari Amparo en el 2007, determinó la acción antifúngica de *Allium sativum* (ajo) y Fluconazol sobre *Candida albicans in vitro*. Se mostraron concentraciones de 5, 10, 20, 40 y 80 mg/ml del extracto. Los resultados hallados evaluaron que el extracto de *Allium sativum* en todas las concentraciones experimentadas afecta el crecimiento de *C. albicans*. La Concentración Mínima Inhibitoria (90 %) es de 20 mg/ml, con una letalidad de 0,73.

- ***Bacillus subtilis*.**

Otro microorganismo estudiado es *Bacillus subtilis*, ya que se ha demostrado de forma independiente sus potencialidades como control biológico de patógenos (Hu , y colaboradores, 2008). En este sentido se conoce que entre los mecanismos a través de los cuales ocurre este proceso se encuentran las relaciones de competencia, la producción de antibióticos, de enzimas y de otras sustancias como sideróforos, que permiten a estos microorganismos ejercer su capacidad biocontroladora (Bais , y colaboradores, 2006).

La acción biocontroladora de *B. brevis* y *B. subtilis* está mediada por la producción de metabolitos antibióticos capaces de actuar sobre microorganismos de diversa etiología, lo que se conoce como antibiosis. Los péptidos que produce estos microorganismos y que tienen esta acción son variados y representan un grupo no muy heterogéneo entre sí de metabolitos activos que afectan directamente a algunos fitopatógenos como *Fusarium oxysporum* (Bohg & Ristow, 1986). A pesar de que la antibiosis es el mecanismo antagónico más utilizado por los microorganismos biocontroladores para inhibir a un fitopatógeno, no es el único, de hecho, los antagonistas no tienen un solo modo de acción y esto les brinda una característica importante para ser usados como agentes de control biológico, estos incluyen la competencia por espacio o por nutrientes, las interacciones directas con el patógeno (micoparasitismo y lisis enzimática) y la inducción de resistencia” (Cook & Baker, 1983).

- ***Trichoderma*.**

Las especies de *Trichoderma* actúan como hiperparásitos competitivos que producen metabolitos antifúngicos y enzimas hidrolíticas a los que se le atribuyen los cambios estructurales a nivel celular, tales como vacuolización, granulación, desintegración del citoplasma y lisis celular, encontrados en los organismos con los que interactúa. Las especies del género *Trichoderma* son los antagonistas más utilizados para el control de enfermedades de plantas producidas por hongos, debido a su ubicuidad, a su facilidad para ser aisladas y cultivadas, a su crecimiento rápido en un gran número de sustratos y a que no atacan a plantas superiores (Papavizas, 1985).

Las especies de *Trichoderma sp.*, producen enzimas extracelulares, sustancias antibióticas de naturaleza volátil y no volátil; a su vez son fuertes antagonistas por el espacio y nutrientes frente a otros fitopatógenos, promoviendo el crecimiento de las plantas, induciéndoles resistencia sistémica (Hermosa MR, 2000). Por tal razón, estas cepas han adquirido un valor comercial importante, sus resultados efectivos durante su aplicación y la aparición de nuevas tecnologías para la producción masiva y desarrollo de productos a base de este hongo.

En estudios previos realizados en el IIFB, con el *Trichoderma harzianum* cepa Bol12 QD, se evaluó que este microorganismo tiene efecto biocontrolador sobre los patógenos que afectan a los cultivos de tomate; los porcentajes de inhibición del crecimiento micelial de los fitopatógenos varió desde 38.8 a 81.3% en *A. solani* y desde 16.3 a 85.5% en *P. infestans*.

Considerándose al *Trichoderma* como agente promisorio en el control biológico de las enfermedades que ocasionan estos fitopatógenos (Puño Ramon, 2011).

III. Justificación

La diversidad de pisos ecológicos del país, por su variada topografía permite la producción de una gran variedad de especies frutales las cuales pueden ser afectadas por el ataque de plagas como las moscas de la fruta y enfermedades fúngicas como la antracnosis que ocasionan daños en la producción agropecuaria de nuestro país.

En el departamento de La Paz en la provincia Sud Yungas, se reportó un 70 % de pérdidas por mala manipulación y plagas, valorado en Bs. 4.868.650,00 estos datos son estimativos del año 2012. Si consideramos que se comercializan un 30% de la producción que aproximadamente son 34.900 cajas, las pérdidas representan un valor de Bs. 1.745.000,00/año, que genera esta actividad económica.

Sin embargo, la producción frutícola está decayendo debido al incremento de la producción de la hoja de coca, monocultivos y de suelos desgastados, además el surgimiento de plagas; por lo que el excesivo e irracional uso de los pesticidas puede también dar lugar al resurgimiento de las plagas y/o a la aparición de plagas resistentes. Muchos de los pesticidas químicos sintéticos especialmente los antiguos han sido retirados del mercado por problemas a la salud de acuerdo a la legislación de seguridad. El uso de agroquímicos agrava el problema no solo porque aumenta el costo de producción sino porque también se eliminan insectos benéficos como los insectos polinizadores, reduciendo la producción de frutas y dejando residuos de plaguicidas con efectos tóxicos para los consumidores y productores.

El presente trabajo de investigación tiene la finalidad de proporcionar respuestas inmediatas a la problemática de la región, a través de la producción de compuestos biológicamente activos. El propósito es producir metabolitos bioactivos o un extracto con actividad antifúngica a partir de extractos orgánicos de *Allium sativum* (Ajo), filtrado bacteriano de *Bacillus sp.*, y filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa BOL12QD y de esta manera contar con un producto o productos que no sean tóxicos y sean amigables para el medio ambiente, para poder controlar el crecimiento de fitopatógenos de forma natural y sin causar daño al ecosistema.

De esta forma se evitará el uso indiscriminado de insecticidas y el desgaste de suelos. Asimismo, se podría prevenir la presencia de plagas en los cultivos frutícolas de la región, reduciendo los índices de pérdida de producción frutícola y trabajando en coordinación con

instituciones involucradas, productores y consumidores incrementado sus volúmenes de producción sin plagas y mejorando su calidad de vida.

IV. Hipótesis de investigación.

La inhibición del crecimiento de los fitopatógenos fúngicos del mango es mayor al 60%, cuando son utilizados los compuestos biológicamente activos producidos a partir de extractos orgánicos de ajo, filtrado bacteriano de *Bacillus subtilis* y filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa BOL 12 QD.

Hipótesis nula.

Los compuestos biológicamente activos producidos a partir de extractos orgánicos de ajo, filtrado bacteriano de *Bacillus subtilis* y filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa BOL 12 QD., no presentan actividad biológica inhibitoria del crecimiento de los fitopatógenos fúngicos del mango.

Hipótesis alternativa.

La combinación de compuestos biológicamente activos producidos a partir de extractos orgánicos de ajo, filtrado bacteriano de *Bacillus subtilis* y filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa BOL 12 QD., presentan actividad biológica inhibitoria del crecimiento de los fitopatógenos fúngicos del mango, mayor al 60%.

V. Objetivos

1. General

Producir compuestos biológicamente activos con actividad antifúngica a partir de extractos orgánicos de ajo, filtrado bacteriano de *Bacillus subtilis* y filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa BOL 12 QD.

2. Específico

1. Identificar a los fitopatógenos fúngicos que atacan a los cultivos de *Mangifera indica* L. (mango) en la localidad de Irupana (Prov. Sud Yungas-La Paz).
2. Determinar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos orgánicos de *Allium sativum* como agente inhibidor del crecimiento de *Colletotrichum sp.*, *Fusarium verticillioides* y *Neopestalotiopsis sp.*
3. Optimizar las condiciones químicas del cultivo de *Bacillus subtilis*. Cepa YHPL-BJ para la producción de compuestos biológicamente activos, sobre el crecimiento de *Colletotrichum sp.*, *Fusarium verticillioides* y *Neopestalotiopsis spp.*
4. Optimización de las condiciones físicas y biológicas del cultivo de *Trichoderma harzianum*. cepa BOL 12 QD para la producción de compuestos biológicamente activos, sobre el crecimiento de *Colletotrichum sp.*, *Fusarium verticillioides* y *Neopestalotiopsis spp.*
5. Determinar el efecto genotóxico y fitotóxico de los filtrados fúngicos (cepa BOL 12 QD), bacterianos (Cepa YHPL-BJ) y extractos de *Allium sativum*.

VI. Materiales y metodología

1. Material biológico

- **Microorganismos antagonistas**

- ✓ Cepa de *Trichoderma harzianum* BOL 12QD, número de acceso en NCBI Gen Bank KY644517 proporcionado por el cepario del Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímicas (IIFB), facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas, Universidad Mayor de San Andrés.
- ✓ Cepa de *Bacillus subtilis* YHPL-BJ, cepa aislada de hojas de plátano provenientes de La Plazuela Irupana, tipificada morfológica, fisiológica y genéticamente en el Instituto de Investigaciones Farmaco Bioquímica.

- **Colecta de muestras contaminadas con fitopatógenos.**

- ✓ Tres muestras de hojas y cinco muestras de frutos de mango (*Mangifera indica* L.) que presentaban uniformidad apariencia y tamaño fueron recolectadas de cinco puntos equidistantes al azar, durante el periodo de cosecha (octubre 2016) en la localidad de La Plazuela – Irupana provincia Sud Yungas (región de mayor productor manguifera).

2. Metodología

2.1. Caracterización morfológica y molecular de las cepas de fitopatógenos fúngicos.

- **Identificación morfológica**

Las muestras de hojas y frutos de mango fueron codificadas y se procedió al lavado individual de las mismas con agua corriente. Seguidamente se sumergieron durante 2 min en una solución de hipoclorito de sodio al 2,5%. Se procedió a enjuagar las muestras tres veces utilizando agua destilada estéril. Una vez secas las muestras, se procedió a escindir una porción de aprox. 5 mm² de la lesión típica de la infección presentada en el tejido vegetal. Cinco porciones de tejido infectado fueron colocadas en una caja Petri con medio PDA cloranfenicol (Anexo 1). Las cajas se rotularon y se colocaron a incubar en condiciones asépticas a 27 +/- 1°C durante 15 días y el crecimiento micelial fúngico fue verificado cada 24 h. Se procedió a observar el crecimiento micelial de las muestras, donde transcurrido 10 días

de incubación algunas muestras llenaron caja. Se tomó una muestra de aprox. 5 mm² de cada una de las porciones miceliales y se sembraron en cajas Petri con medio PDA cloranfenicol.

Las muestras sembradas se incubaron por 15 días, para realizar el lavado monospórico. A los cultivos fúngicos que presentaron esporulación se les adicionó 2 mL de solución fisiológica al 0.9% de NaCl. Seguidamente, se agitó manualmente con movimientos circulares la caja Petri con la solución generando una suspensión de esporas. Esta suspensión se recolectó en viales estériles, para proceder a realizar diluciones 1/10 para un volumen final de 1000 µL. Seguidamente se colocaron 100 µL de la dilución en las cajas Petri de 9 cm de diámetro cada una con 10 mL de agar-agua (Anexo 2). Las cajas Petri así inoculadas se rotularon y se dejaron a incubar en condiciones asépticas a 27 +/- 1°C durante 24 h. Al cabo de los cuales se realizaron observaciones al estereomicroscopio para detectar la germinación de las conidias. Luego se procedió a seleccionar y tomar una conidia la cual se transfirió a una nueva caja Petri con PDA cloranfenicol. Las cajas se rotularon y se colocaron a incubar en condiciones asépticas a 27 +/- 1 °C durante 15 días. Los cultivos fueron observados diariamente para registrar: 1) Coloración de las cepas, 2) Tipo de crecimiento micelial y 3) Aspecto del micelio. Para la identificación microscópica se realizó la técnica de la cinta adhesiva transparente. Esta técnica consiste en adherir una cinta adhesiva transparente sobre la superficie del micelio de la colonia crecida en la caja Petri con medio PDA. Una vez adherido, se coloca sobre el portaobjeto, el cual contiene una gota de colorante vegetal (Anexo 3). Para luego observar en el microscopio utilizando el objetivo de 40X. Seguidamente las muestras axénicas identificadas a través de claves taxonómicas fueron repicadas por triplicado. Y por último para la identificación molecular se realizaron lavados con solución fisiológica 0.9 % de NaCl de las muestras axénicas identificadas. La suspensión obtenida fue centrifugada a 8500 rpm durante 5 min, para la obtención del pellet y su posterior análisis.

- **Identificación molecular.**

Para la identificación molecular se realizó la secuenciación del gen ITS. Inicialmente, se realizó la extracción del material genético, para ello se utilizó 1 mL de la suspensión de esporas, se centrifugó a 8500 rpm por 5 min, se realizaron tres lavados con solución fisiológica, se adicionó al pellet 500 µL de solución de lisis TSE (0.5 M Tris, 0.1M NaCl, 5% SDS) agitándose vigorosamente e incubó a 65°C por 1h; pasado el tiempo se adicionaron 50

μL de solución Tris (2M, pH 7) con 150 μL de 5M NaCl y se centrifugó a 10 000 rpm por 10 min. El sobrenadante fue trasvasado a un tubo eppendorf con 800 μL de etanol absoluto, mezclándose por inversión e incubándose en hielo por 20 min, seguidamente se centrifugó a 13 000 rpm por 15 min. El sobrenadante fue eliminado y posteriormente se adicionó al pellet 100 μL de buffer de lavado (70%) etanol y se centrifugó 13 000 rpm por 30 min. Este procedimiento se realizó dos veces, posteriormente se evaporó el buffer restante a 55°C h, se resuspendió el pellet con 100 μL de agua bi-distilada y la suspensión final se conservó a 4 °C. Finalmente se realizó la cuantificación del ADN.

A partir de las distintas muestras extraídas y purificadas de ADN se amplificaron por PCR fragmentos de los primers ITS1 (5' TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3') e ITS4 (5' TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3') para identificación de la secuencia ribosomal interna, y que amplifican una región de 400pb aprox. Se utilizaron 20 μL de mix para la amplificación, (Anexo 4). Las condiciones de amplificación del ADN por PCR fueron: *Desnaturalización inicial* a 94 °C por 15 min, seguida de 35 ciclos de *Desnaturalización* a 94°C por 1 min, *Alineamiento* a 55°C por 2 min, y *Elongación de la cadena* a 72°C por 2 min, y finalmente, la *Elongación* final a 72 °C por 10 min. Para cada reacción se utilizó un control negativo equivalente a un volumen de agua destilada estéril. Posteriormente se realizó la corrida electroforética en geles de agarosa al 1.5%. Los amplicones del gen ITS fueron purificados mediante el protocolo Applied Biosystems, se utilizaron cebadores diseñados para la PCR de secuenciación, la cual se realizó por el método de Sanger en un secuenciador 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems). Se analizó la similitud de las secuencias obtenidas y búsqueda de base de datos del gen *ITS* con el programa BLAST, utilizando el portal del NCBI en la página web <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>. Se creó un fichero de texto con las secuencias del gen ITS depositadas en el Gen Bank. Se utilizó el programa Bio Edit v7 (Hall, 1999; Hall, 2004) para el múltiple alineamiento del gen *ALS3* de *C. maltosa* y *C. albicans* con el método Cluscal W, posteriormente se realizó el análisis filogenético con el método neighbour joining (NJ) del programa MEGA 6.

2.2. Determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) de los extractos orgánicos de ajo

- **Obtención de los extractos orgánicos de ajo.**

Las cabezas de ajo (*Allium sativum*) variedad New York White, se obtuvieron del Mercado Miraflores, ubicado en la Avenida Saavedra de la ciudad de La Paz. Para la obtención de los extractos orgánicos de ajo se procedió a obtenerlos por maceración. Para lo cual se emplearon 60 g de bulbos de ajo (*Allium sativum*), que fueron maceradas con 60 mL de vinagre (vinagre de manzana San Lorenzo, grado de acidez al 5 % procedencia Cochabamba Bolivia ó vinagre de vino tinto San Lorenzo, grado de acidez al 6 % procedencia Cochabamba Bolivia ó vinagre de uva Toscano, grado de acidez al 4 % procedencia Santa Cruz Bolivia), la maceración se realizó por un lapso de 6 días con intervalos de 24 h. tomando alícuotas de 10 mL del extracto orgánico que fueron maceradas con 60 mL solvente orgánico consistente en vinagre. Luego se determinó la concentración del extracto de *Allium sativum* por el método de pérdida por secado (donde se tomó una alícuota del extracto y se evaporó a sequedad bajo condiciones controladas). Seguidamente se realizó la determinación de la concentración inhibitoria mínima (CIM) frente a los fitopatógenos.

- **Determinación de la concentración mínima.**

Dieciocho extractos orgánicos de ajo fueron evaluados mediante el CIM en tubos. Una vez determinada la concentración óptima del extracto orgánico se realizó la técnica de vertido en placa donde en cada caja Petri de 10 mL de capacidad, se colocó 1,75 mg/mL del extracto orgánico de ajo en medio de cultivo PDA a pH 5.6. Posteriormente se inoculó 100 μ

L de esporas de los fitopatógenos aislados a una concentración de 1×10^6 esp./mL en pozos de 6 mm de diámetro situado al centro de las cajas Petri, para evaluar la actividad inhibitoria de crecimiento, utilizando como control positivo los fungicidas químicos Antracol (ingrediente activo Propineb), Ram Caf (ingrediente activo oxiclóruo de cobre) y Coctel químico [DELTAMETRINA (insecticida de amplio espectro), Kocide-101 (fungicida), WUXAL (fertilizante especial NPR), Agral (mojante y dispersante tenso activo); relación 0,6:5:2,3:2,3 μ L/mL respectivamente] a una concentración de 100 mg/mL cada uno y un control negativo de solo medio PDA con 100 μ L de esporas de los fitopatógenos aislados a una concentración

de 1×10^6 esp/mL en el pozo. Seguidamente se incubaron las cajas Petri a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 días.

La determinación de la actividad inhibitoria del crecimiento se evaluó la medición del crecimiento del frente hifal realizando las mediciones en las 8 direcciones cardinales con la ayuda de una regla milimetrada desde el borde del inoculó a la punta del micelio. La determinación de la actividad inhibitoria se realiza mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del 100 %.

- **Determinación de los compuestos biológicamente activos de los extractos orgánicos de ajo.**

Los extractos orgánicos de ajo en vinagre de manzana, vinagre de vino tinto y vinagre de uva que presentaron mayor porcentaje de inhibición fueron evaluados a través de cromatografía en capa fina. La siembra de las muestras se realizó en placas de $10 \times 5 \times 0.20$ mm de gel de sílice, la fase móvil usada fue de ácido acético: agua: butanol (6:2:2).

2.3. Determinación de la actividad biológica inhibitoria de los filtrados de cultivos de *Bacillus subtilis* cepa YHPL-BJ.

- **Establecimiento de cultivos en Bach en medio PDA de *Bacillus subtilis* cepa YHPL-BJ.**

Se activó la cepa de *Bacillus subtilis* en medio PDA (Anexo 5) se incubó a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ por 3 días. Transcurrido el tiempo de incubación de las cepas, éstas fueron inoculadas en 50 mL del medio de cultivo líquido modificado Luria Bertani, (Anexo 6). Para esto fue usada un asa bacteriológica con la cual se procedió a realizar un raspado de la biopelícula producida por la bacteria en la caja de Petri con medio de cultivo PDA. Posteriormente se incubó durante 24 horas a 30°C y 100 rpm utilizando un agitador orbital. Transcurrido este tiempo se procedió a inocular 500 μL del cultivo bacteriano por cada 500 mL de caldo papa dextrosa (Anexo 7). Seguidamente se procedió a tomar una muestra de 12 mL cada 12 horas. Se tomaron 2 mL de la muestra para evaluar la cinética de crecimiento de la bacteria, mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 540 nm de longitud de onda y 10 mL fueron utilizados para evaluar la actividad inhibitoria, para lo cual se trabajó con el sobrenadante de los filtrados bacterianos,

obtenidos por centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y filtración a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.22 µm. El filtrado obtenido se almacenó en viales de ámbar y se mantuvo a una temperatura de 4 °C hasta su utilización en la determinación del CIM.

- **Establecimiento de cultivos en Bach en medio de cultivo PDA modificado de *Bacillus subtilis* cepa YHPL -BJ.**

Se realizó modificaciones al medio PDA mediante la adición separada de dos fuentes de nitrógeno. Esta adición se ajustó de acuerdo a la relación C: N (100:5) para bacterias aerobias.

Se emplearon tres matraces de 500 mL para cada fuente de nitrógeno. Cada matraz contenía 200 mL de medio PDA modificado con la adición separada de dos fuentes de nitrógeno: 1) Cloruro de amonio y 2) Urea. Seguidamente se inocularon 100 µL de *Bacillus subtilis* a la concentración de 0.5 Mac Farland por cada 100 mL de medio de cultivo. Posteriormente se incubó a 30 °C y 100 rpm utilizando un agitador orbital. Seguidamente se procedió a tomar una muestra de 12 mL cada 12 horas. Se tomaron 2 mL de la muestra para evaluar la cinética de crecimiento de la bacteria, mediante la medición de la densidad óptica (DO) a 540 nm de longitud de onda y 10 mL fueron utilizados para evaluar la actividad inhibitoria, utilizando el sobrenadante de los filtrados bacterianos, obtenidos por centrifugación a 4000 rpm durante 15 minutos a 4 °C y filtrados a través de un filtro de nitrocelulosa de 0.22 µm. El filtrado obtenido se almacenó en viales de ámbar y se mantuvo a una temperatura de 4 °C hasta su utilización en la determinación del CIM.

- **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM).**

Una vez determinada la concentración óptima del filtrado bacteriano se realizó la técnica de vertido en placa donde en cada caja Petri de 10 mL de capacidad, se colocó 300 µL del filtrado y 9.7 mL de medio PDA a pH 5.6. Posteriormente se inocularon 100 µL de esporas de los fitopatógenos aislados a una concentración de 1×10^6 esp/mL en pozos de 6 mm de diámetro situado al centro de las cajas Petri, para evaluar la actividad inhibitoria de crecimiento, utilizando como control positivo los fungicidas químicos Antracol (ingrediente activo Propineb), Ram Caf (ingrediente activo oxiclورو de cobre) y Coctel químico [DELTAMETRINA (insecticida de amplio espectro), Kocide-101 (fungicida), WUXAL (fertilizante especial NPR), Agral (mojante y dispersante tenso activo); relación

0,6:5:2,3:2,3 $\mu\text{L}/\text{mL}$ respectivamente] a una concentración de 100 mg/mL cada uno y un control negativo de solo medio PDA con 100 μL de esporas de los fitopatógenos aislados a una concentración de 1×10^6 esp/mL en el pozo. Seguidamente se incubaron las cajas Petri a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 15 días.

La determinación de la actividad inhibitoria del crecimiento se determinó mediante la medición del crecimiento del frente hifal realizando las mediciones en las 8 direcciones cardinales con la ayuda de una regla milimetrada desde el borde del inóculo a la punta del micelio. La determinación de la actividad inhibitoria se realiza mediante el cálculo del porcentaje de inhibición del 100 %.

2.4. Determinación de la actividad biológica inhibitoria los filtrados de los cultivos de *Trichoderma harzianum* cepa BOL 12QD.

- **Establecimiento de cultivos en Batch en medio PDA de *Trichoderma harzianum* cepa BOL 12QD.**

La cepa liofilizada de *Trichoderma harzianum* cepa BOL 12 QD fue reconstituida con 2 mL de solución fisiológica al 0.9 % NaCl, posteriormente se toma una parte del cultivo reconstituido y con un asa se inoculó en cajas Petri con medio PDA y cloranfenicol, dejando incubar a 25°C hasta el desarrollo de la colonia.

Se estableció un diseño experimental consistente en tres variables y sus niveles: agitación (120 rpm y sin agitación), luz (luz LED violeta y luz blanca) y co-cultivo (Adición de esporas de *Colletotrichum sp.* y *Fusarium verticillioides*). Para esta fermentación se utilizaron doce matraces Erlenmeyer con capacidad de 500 mL, teniendo un volumen efectivo de 200 mL por cada Erlenmeyer. La concentración de *Trichoderma harzianum* fue de 1×10^6 esp/mL, concentración que fue ajustada mediante el recuento de esporas. Se inoculó 100 μL de esta concentración por cada 100 mL de caldo papa dextrosa. El experimento fue llevado a cabo en cuatro ensayos: 1) tres matraces inoculados se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ sin agitación 2) tres matraces inoculados se incubaron a $28 \pm 1^\circ\text{C}$ sin agitación en una cámara con luz LED violeta (intensidad luminosa = 250 a 300 mcd; longitud de onda 420 nm), 3) tres matraces inoculados se incubaron a 30°C a 120 rpm y 4) tres matraces se incubaron a 30°C a 120 rpm en una cámara con luz LED violeta (intensidad luminosa = 250 a 300 mcd; longitud de onda

420 nm). Se incubó por 14 días, para luego realizar la extracción de los compuestos con actividad biocontroladora. Una vez concluida la incubación se centrifugó por 20 minutos a 4 °C y 5000 rpm, para luego filtrar el sobrenadante de *T. harzianum* BOL 12 QD, con filtro de nitrocelulosa de 0.45 µm. El filtrado obtenido se almacenó en viales de ámbar y se mantuvo a una temperatura de 4 °C hasta su utilización en la determinación de la CIM.

- **Determinación de la concentración mínima inhibitoria (CIM) de los filtrados fúngicos.**

De las muestras filtradas y guardadas se realizaron diluciones para evaluar CIM y de esta manera determinar cuál es la concentración óptima para inhibir a los fitopatógenos en estudio. Una vez determinada la concentración óptima del filtrado fúngico se realizó la técnica de vertido en placa donde en cada caja Petri de 10 mL de capacidad, se colocó 2 mL del filtrado y 8 mL de medio PDA a pH 5,6. Posteriormente se inoculó 100 µL de esporas de los fitopatógenos aislados a una concentración de 1×10^6 esp/mL en pozos de 6 mm de diámetro situado al centro de las cajas Petri, para evaluar el porcentaje de inhibición de crecimiento. Seguidamente se incubaron las cajas Petri a 28 +/- 1 °C durante 15 días.

La determinación de la actividad inhibitoria del crecimiento fúngico fue evaluada mediante el cálculo del porcentaje de inhibición.

2.5. Determinación de la actividad fitotóxica y genotóxica.

- **Ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L.**

Se procedió a realizar el ensayo de toxicidad aguda con semillas de lechuga para la evaluación fitotóxica de los extractos orgánicos de ajo, los filtrados bacterianos y los filtrados fúngicos. En este sentido, se prepararon 45 cajas de Petri con papel filtro. El ensayo se lo realizó por triplicado, para el extracto orgánico de ajo se empleó 1,75 mg/mL del extracto, para los filtrados bacterianos se utilizó 31 µL/mL y para el filtrado fúngico se utilizó 250 µL/mL. El volumen empleado para cada caja de Petri fue de 2 mL de cada una de las muestras en estudio. Como control positivo se empleó agua destilada. Seguidamente se colocaron 5 semillas de lechuga (*Lactuca sativa*) en las placas Petri con una pinza, teniendo cuidado de que estuvieran bien separadas entre sí para permitir la elongación de las radículas. Las placas fueron tapadas

y se colocaron en la cámara oscura cubriéndolas de la luz inmediatamente. Se dejaron en incubación durante 72 horas a una temperatura de 22 +/- 2 °C.

- **Ensayo de Ames.**

Se empleó el protocolo clásico de incorporación en placa descrito por Maron y Ames, 1983. Se trabajaron con las cepas de *Salmonella typhimurium* TA 98 y TA 100 conservadas a -80 °C. Primeramente se realizó el requerimiento de histidina y biotina (*his-*); para esta técnica se empleó el medio mínimo Vogel Bonner con glucosa, suplementado con biotina para la siembra de las cepas por la técnica de agotamiento. Luego se procedió a la mutación *rfa*, para esto se mezcló 0,1 mL de cultivo saturado de la cepa TA 98 ó TA 100 con 2 mL de agar blando atemperado a 47 °C, seguidamente se vertió sobre una placa de Luria Broth (LB), en el centro de la placa se colocó papel filtro de un diámetro de 5 mm con 10 µL de la solución cristal violeta al 0,1 %, la presencia de un halo de inhibición indica la existencia de la mutación. En un vial estéril se añadió 0,1 mL del extracto orgánico de ajo a una concentración de 1,75 mg/mL del extracto, para los filtrados bacterianos se utilizó la concentración de 31 µL/mL y para el filtrado fúngico se utilizó la concentración de 250 µL/mL. Luego se añadió 0,1 mL del cultivo saturado fresco de las cepas TA 98 y TA 100. Por último, se añadió 0,5 mL de tampón fosfato a pH 7,3 se homogenizó y añadió 2 mL de agar blando previamente suplementado con la solución de trazas de biotina/histidina 0,5 mM. Se incubó a 37° C por 48 h.

Cálculo del índice de mutagenicidad:

$$IM = \frac{N^{\circ} \text{ colonias revertantes inducidas}}{N^{\circ} \text{ colonias revertantes espontáneas}}$$

3. Determinación analítica.

- **Recuento de esporas fúngicas.**

Para el recuento de esporas fúngicas se adicionaron 2 mL de solución fisiológica al 0.9 % de NaCl a los cultivos fúngicos evaluados. Luego se procedió a homogenizar mediante movimientos circulares para suspender las esporas y con la ayuda de una micropipeta se recolectó la suspensión de esporas en tubos roscas. De la suspensión se tomó 10 µL para

cargar la cámara de Neubauer. Se realizó el recuento en el cuadrante central que tiene 25 cuadrados pequeños subdivididos en 16 partes, de los cuales se usan para el recuento los cuatro laterales y uno central. El enfoque se realiza primero con el objetivo 10X y luego con el 40X se hace el recuento de las esporas. Se suman el N° de esporas de los 5 cuadrantes, en ambos hemiprismas, se saca el promedio y se multiplica por el factor de dilución que es de 50000

$$\frac{\# \text{ de esporas}}{5 \text{ cuadrantes}} \times 50\,000$$

- **Cinética de crecimiento fúngico.**

Para medir la cinética (velocidad) de crecimiento se utilizó un sacabocados estéril de 6mm de diámetro con el cual se realizaron pozos en el centro de la placa Petri con medio PDA. Seguidamente se inoculó 1×10^6 esp/mL de las cepas fúngicas en estudio. Se incubaron las placas Petri a 28 ± 1 °C hasta que el micelio alcanzo el borde de la caja Petri (19 cm de diámetro). El crecimiento del frente hifal se midió cada 24 h con una regla milimetrada por el reverso de la placa Petri desde el borde del inóculo hasta la punta del micelio.

- **Determinación de la Demanda Química de Oxígeno (DQO).**

Para la evaluación del DQO del medio caldo papa se utilizó el método de flujo cerrado, como se detalla en la tabla 2 de acuerdo a la norma internacional ISO 6060: 1989. Water Quality Determination of the chemical oxygen demand.

Tabla 2: Muestra y cantidad de reactivos para la digestión.

<i>RECIPIENTE DE DIGESTION (16*150mm)</i>	<i>DE</i>	<i>VOLUMEN DE MUESTRAS (mL)</i>	<i>SOLUCION DE DIGESTIÓN (mL)</i>	<i>REACTIVO DE ACIDO SULFÚRICO (mL)</i>
<i>Blanco no digerido (H2Od)</i>	<i>digerido</i>	2.5	1.5	3.5
<i>Blanco (H2Od)</i>	<i>digerido</i>	2.5	1.5	3.5
<i>Muestra</i>		2.5	1.5	3.5

Después de adicionar los reactivos, se mezcló los tubos con la ayuda del vortex, la digestión de las muestras se realizó por 2 h a 150°C en el termoblock exceptuando el blanco no digerido. Luego se removió del digestor los tubos y se dejó enfriar a temperatura ambiente. La titulación se realizó con el standard de sulfato ferroso amonio (solución FAS) en constante agitación. Se usó 2 gotas de ferroína como indicador. La solución viró de azul verdoso a café rojizo.

Cálculos:

$$COD(mgO_2/L) = \frac{(A - B) * M * 8000}{mL \text{ muestra}}$$

Dónde:

A= mL FAS usado para el blanco digerido

B= mL FAS usado para la muestra

M= molaridad del FAS

8000= peso en miliequivalentes de oxígeno*1000mL/L

$$M = \frac{0.1 * mL \text{ Cr}_2O_7}{mL \text{ FAS (BND)}}$$

Dónde:

0.1= molaridad de la solución estándar del Cr₂O₇

mL Cr₂O₇= 1.5mL

mL FAS (BND)= mL FAS usado para el blanco no digerido

- **Determinación de Kjeldahl**

La determinación de nitrógeno se realizó mediante Kjeldahl este método consta de tres etapas: digestión, destilación y titulación.

Para realizar la digestión se trabajó en tubos para Kjeldahl en el cual se pesó 1.5 mL de las muestras líquidas en estudio a esta solución se le añadió dos catalizadores sulfato cúprico pentahidratado 0.1 gramos y sulfato de potasio 0.9 gramos, por último, se añadió 3 mL de ácido sulfúrico concentrado. Se dejó incubar en el termoblock a 400 °C por 2 horas. Para llevar a cabo la destilación se adicionó 10 mL de agua destilada a los tubos donde se llevó a cabo la destilación, seguidamente se ajustó el tubo sobre el soporte del equipo Kjeldahl. Luego en un matraz de 200 ml de capacidad, se colocó 25 mL de ácido bórico al 4% y 15 gotas de

indicador para Kjeldahl (naranja y rojo de metilo), se colocó el matraz sobre el platillo del equipo, asegurándose que la manguera está sumergida en el matraz. Paso seguido con el dispensador se añadió 10 mL de hidróxido de sodio al 40 %, luego se prendió el equipo a una potencia de 20 para comenzar la destilación. Una vez que se obtenga un volumen de 100 mL en el matraz se procedió a realizar la titulación a punto final, se empleó HCl al 0.1 N, el pH al cual se llegó fue de 3.5, con el volumen gastado se procedió a realizar los cálculos. Donde por cada equivalente de HCl es igual a un equivalente de nitrógeno.

- **Determinación de la actividad biológica inhibitoria.**

La determinación de la actividad inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos fúngicos se realizó por visualización de crecimiento del frente hifal, realizando las mediciones en las ocho orientaciones cardinales, con ayuda de una regla milimetrada desde el borde del inóculo a la punta del micelio. La medición de la actividad inhibitoria se realiza mediante el cálculo del porcentaje de inhibición:

$$\% \text{ inhibición} = \frac{(DCC - DCT)}{DCC} * 100$$

DCC: Crecimiento hifal del testigo

DCT: Crecimiento hifal del tratamiento

- **Determinación de la actividad enzimática.**

- **Actividad Celulolítica.**

La actividad celulolítica se midió para evaluar el comportamiento enzimático de los filtrados crudos bacterianos y fúngicos por la técnica de DNS según Miller (1959), consiste en un tubo blanco, tubo control, tubo test. El tubo blanco contiene sustrato 450 µL, agua 50 µL. El tubo control 450 µL de sustrato CMC, el tubo test contiene 50 µL de la muestra de cultivo previamente filtrada con filtros de celulosa de 0.22 µm, 450 µL de sustrato CMC. Los tubos fueron incubados a 50 °C por 60 min, luego los tubos se colocaron directamente en hielo para detener la reacción, después se añadió a cada tubo según el orden siguiente: al tubo blanco se añadió la solución de DNS 750 µL, al tubo control muestra del sobrenadante del cultivo 50 µL, solución de DNS 750 µL, al tubo test solución de DNS 750 µL, se incubaron los tubos a

90 °C por 5 min se dejó enfriando a temperatura ambiente. Se leyó al espectrofotómetro a una longitud de 540 nm.

○ **Actividad proteolítica.**

La actividad proteasa se midió para evaluar el comportamiento enzimático de los filtrados crudos bacterianos y fúngicos por el método de la Azocaseína (Manoj , Indira , & Donald , 1988). A 1 mL de la muestra previamente filtrada (enzima) se añadió 1 mL al 0.5% (p/v) de azocaseína (sustrato) en buffer tris-HCl (200 mM pH 7.4). Esta preparación se realizó para evaluar la reacción enzima sustrato durante 60 min a 30 °C. Transcurrido el tiempo de incubación se detuvo la reacción adicionando 2 mL al 10% (p/v) de ácido tricloroacético para posteriormente ser centrifugado a 10000 rpm por 10 min. Se tomó el sobrenadante y se leyó al espectrofotómetro a una longitud de onda de 380 nm.

Diseño experimental

Se trabajó con compuestos con actividad antifúngica a partir de extractos orgánicos de ajo, filtrado bacteriano de *Bacillus subtilis* y filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa BOL 12 QD, enfrentados a *Colletotrichum sp.*, *Fusarium verticillioides* y *Neopestalotiopsis spp.* Las cepas se obtuvieron del Laboratorio de Biotecnología fúngica. Los resultados fueron analizados con ANOVA unifactorial para los extractos orgánicos de ajo en vinagre y filtrado crudo bacteriano de *Bacillus subtilis* y para el análisis estadístico del filtrado crudo fúngico se empleó una regresión múltiple. El número de repeticiones por experimento fue por triplicado.

VII. Resultado y discusión

1. Identificación de los fitopatógenos fúngicos que afectan a los cultivos de *Mangifera indica* L. (mango) en la localidad de Irupana.

De las muestras de mango con síntomas de enfermedad recolectadas de la localidad de La Plazuela Irupana, se aisló tres fitopatógenos. La identificación se realizó a través de claves taxonómicas mediante observaciones macroscópicas, microscópicas y por último se realizó la identificación molecular de los microorganismos aislados.

A continuación, se describe la identificación taxonómica de los tres microorganismos aislados e identificados.

- **Identificación de *Colletotrichum* sp. (Causante de la enfermedad Antracnosis).**

Para la identificación del *Colletotrichum* las características macroscópicas de los aislamientos (figura 1). De acuerdo a las observaciones realizadas durante un periodo de 15 días de incubación. El micelio de los hongos aislados inicialmente de color blanco, se tornó color salmón o rosado al tiempo de la esporulación. El crecimiento del microorganismo fue de forma radial, presentando un aspecto micelial predominante algodonoso, presencia de micelio aéreo que al aglomerarse genera una masa micelial oscura y compacta por su esporulación rápida, El color de las colonias fue característico del *Colletotrichum* (Adaskaveg & Hartin, 1997). Trabajos realizados indican que las características que se presentan en aislamientos de *C. acutatum* y *C. gloeosporioides* presentaban tonalidades salmón y grisáceas de acuerdo a la descripción realizada por Simmonds 1965 para *C. acutatum* y por Arx 1957, 1981; Morgue, 1971; Sutton 1980, Baxter 1983. Sin embargo, la morfología de la colonia del *Colletotrichum* varía entre y dentro de las especies, además está sujeto a variaciones por características como el medio, el sustrato y los cambios de temperatura entre otros (Adaskaveg & Hartin, 1997; Freeman, Katan, & Shabi, 1998).



Figura 1. Características macroscópicas de *Colletotrichum sp.*, Crecimiento radial: Aspecto micelial algodonoso con micelio aéreo aglomerado oscuro y compacto de color rosa salmón.

En la identificación microscópica se observó las conidias de los aislados de *Colletotrichum sp.*, los cuales son cilíndricos con extremos redondeados y el tamaño vario de 16 a 18 μm de largo y 3 a 4 μm de ancho como se muestra en la figura 2. En la mayoría de las formas conidiales que se presentaron durante la caracterización de los aislamientos se aprecia vacuolas de gran tamaño. La variación en la forma de las conidias entre aislamientos de *Colletotrichum*, por el método tradicional de clasificación y en términos generales se ha descrito que las conidias de *C. gloeosporioides*, son de forma cilíndrica y las de *C. acutatum* son fusiformes respectivamente. Muchos autores indican una gran variación en la forma de la espora; Landener y colaboradores (1999) menciona que las conidias de *C. acutatum* pueden ser cilíndricas con uno o ambos lados agudos o con un extremo terminado en punta (Landener y otros, 1999).

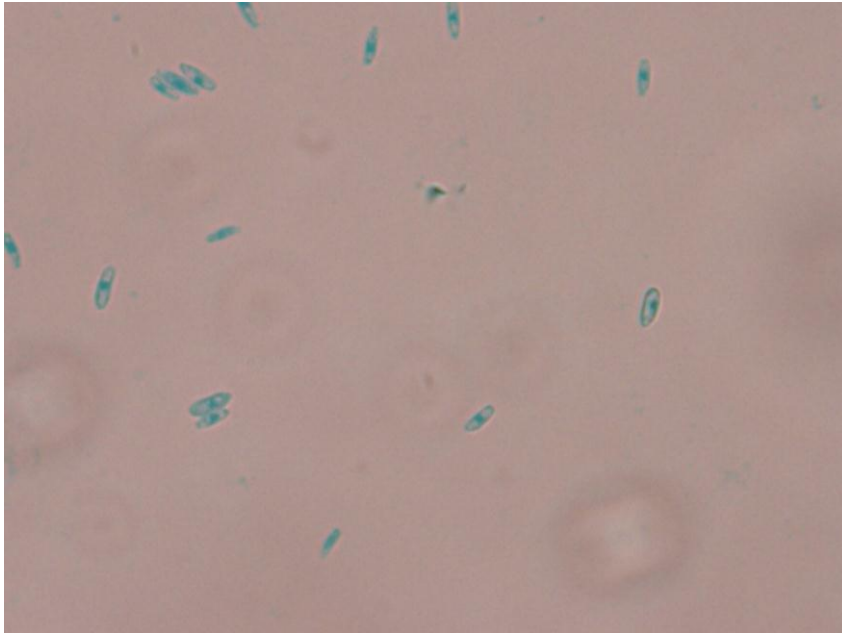


Figura 2. Identificación microscópica de los conidios de *Colletotrichum* sp., tinción realizada con colorante vegetal. Se puede observar la presencia de conidios cilíndricos con bordes redondos y presencia de vacuolas.

➤ **Identificación de *Fusarium* sp. (Causante de la enfermedad Escoba de bruja)**

Para la identificación del *Fusarium* se observó las características macroscópicas de los aislamientos (Figura 3). De acuerdo a las observaciones realizadas durante un periodo de 15 días de incubación, el aspecto micelial predominante fue disperso como un fieltro con una zona central de funículos, de color blanquecino y con el tiempo la presencia de conidios produce un pigmento color amarillento pálido. El color de las colonias fue característico del *Fusarium* y de acuerdo a la descripción realizada por Guzmán (1977), el cual describe la presencia de colonias blanquecinas que producen un pigmento color vino que gradualmente difunde en el medio.

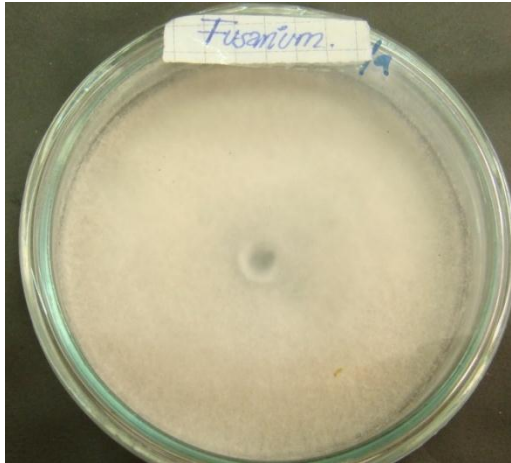


Figura 3. Características macroscópicas de *Fusarium* sp. Crecimiento radial: aspecto micelial blanquecino disperso como un fieltro con una zona central de funículos.

En la identificación microscópica se observó los microconidios formando cadenas largas, ovales con una base aplanada en su mayoría, algunos presentaron un septo, el tamaño fue de 15 a 18 μm de largo y 3 a 4 μm de ancho (Figura 4). Se puede apreciar que en la mayoría de los aislamientos se presentó al menos dos tipos de forma conidial, observándose macroconidios y microconidios.



Figura 4. Características microscópicas de *Fusarium*. Se observa macroconidios curvados, pluriseptados, con una célula apical más o menos puntiaguda.

➤ **Identificación de la *Pestalotia* sp. (Causante de la enfermedad Mancha foliar).**

Para la identificación de la *Pestalotia* las características macroscópicas de los aislamientos (Figura 5). De acuerdo a las observaciones realizadas durante el periodo de 15 días de incubación, el desarrollo micelial predominante fue disperso blanquecino con la presencia de conidióforos negros de aspecto gomoso que a los 15 días cubrían la mayor parte de las cajas de petri. Trabajos realizados en Arabia Saudita, reportan la identificación como fitopatógeno del mango a *Pestalotiopsis mangiferae* (Mordue, 1980), las características de crecimiento en medio PDA fue la presencia de colonias blancas y luego de 10 a 12 días de incubación las colonias se tornan de color gris. *Pestalotiopsis mangiferae* fue consistentemente detectado en todos los cultivos de mango. Según un trabajo realizado por Jeewon y colaboradores (2004), en el género *Pestalotiopsis* ha existido una sobre estimación de especies, ya que se ha detectado en la descripción de nuevas especies una alta especificidad en la relación hospedante patógeno. El mismo autor plantea que se podría dar el caso que una especie de *Pestalotiopsis* afecte a más de un hospedante.

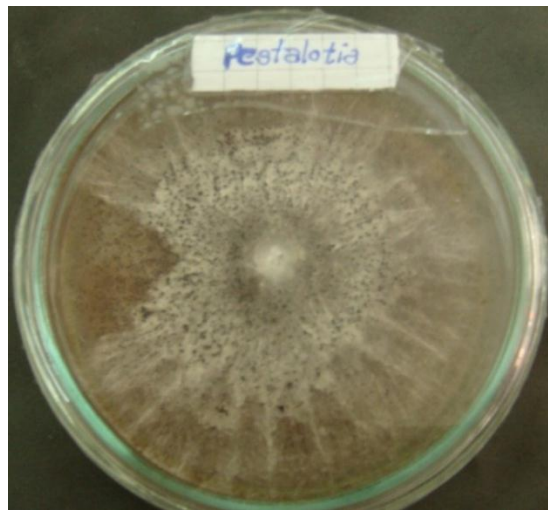


Figura 5. Características macroscópicas de *Pestalotiopsis* sp., Crecimiento radial: aspecto micelial ralo con la presencia de conidióforo de color negro de aspecto gomoso.

En la identificación microscópica se observó alargados y multiseptados, en su mayoría presentan de 3 – 5 tabiques con la célula central de color marrón y los extremos hialinos, teniendo las apicales dos o más apéndices, como se observa en la figura 6. Los tamaños de los conidios van de 28 a 33 μm de largo y de 5 a 8 μm de ancho.



Figura 6. Identificación microscópica de *Pestalotiopsis sp.* Se observa esporas con 2 a 3 tabiques, con la célula central de color marrón con extremos hialinos.

Dada la complejidad en la identificación de las especies de *Fusarium* y *Pestalotia* se utilizaron criterios de caracterización tanto morfológicos como moleculares para tal fin, los cuales resultan complementarios.

Luego de la extracción, purificación, amplificación y secuenciación de la región ITS comprendida entre los ITS1 (5'TCC GTA GGT GAA CCT TGC GG 3') e ITS4 (5'TCC TCC GCT TAT TGA TAT GC 3'). Las secuencias obtenidas fueron analizadas en el BLAST (NCBI National Center for Biotechnology Information). El análisis de secuenciación del fragmento del gen ITS de *Fusarium* cepa Bol 15 YFMM presentó una homología del 99 % (E-valué: 0,00E+00) fue identificada como *Fusarium verticillioides*. En el caso de la cepa Bol 15 YHMM *Pestalotia* presentó una homología del 100 % (E-valué: 3,00E-123) fue identificada como *Neopestalotiopsis sp.* El análisis filogenético mediante el método neighbour-Joining del gen ITS presentó una mayor distancia filogenética de *Neopestalotiopsis spp.*, en relación a *Fusarium solani*, lo cual indicaría que la secuencia presentaría más variaciones de este gen (anexo 8).

De acuerdo a los resultados obtenidos se pudo identificar a *Fusarium verticillioides* como fitopatógeno del mango, este microorganismo es el agente causal del daño producido a nivel de los tallo y pudrición de la mazorca en el maíz en las zonas de producción en todo el mundo (Leslie & Summerell , 2006). Aunque *F. verticillioides* es sobre todo un patógeno del maíz, a menudo se ha asociado con otras enfermedades de los cereales, pero estas asociaciones todavía no se han verificado debido a la confusión taxonómica con otras especies de *Fusarium*. Además, estudios realizados en la identificación de las especies de *Fusarium* aisladas en asociación con malformación del mango en Australia, las especies de *Fusarium* aisladas de tejidos de mango con síntomas de malformación típicos, putativos o sospechosos en Australia (NT, WA o QLD) entre 2007 y 2012 fueron aislados e identificados como *F. anthophilum*, *F. fujikuroi*, *F. incarnatum*, *F. mangiferae*, *F. oxysporum*, *F. parvisorum*, *F. proliferatum*, *F. pseudocircinatum*, *F. scirpi*, *F. solani*, *F. verticillioides*, y tres especies no descritas.

De *Neopestalotiopsis spp.*, no se encontró reportes sobre este microorganismo como agente causal de enfermedad en los cultivos de mango. Sin embargo, las especies de *Pestalotiopsis* son fitopatógenos comunes que causan una variedad de enfermedades, incluyendo lesiones de chancro, decapitación de los brotes, manchas foliares, picadura de la aguja, picadura de la punta, tizón gris, clorosis severa, putrefacción de frutas y diversas enfermedades pos-cosecha (Crous , Summerell , & Swart, 2011; Zhang , Maharachchikumbura , & Wei, 2012). Las especies de *Pestalotiopsis* también reducen la producción y causan pérdidas económicas en la manzana, el arándano, el coco, la castaña, el jengibre, la vid, la guayaba, la avellana, el mango, la orquídea, el melocotón, el rambután, el té y la manzana debido a la enfermedad (Ismail , Cirvilleri , & Polizzi , 2013; Ren , Li , & Qi , 2013).

2. Concentración inhibitoria mínima de los extractos de ajo frente a fitopatógenos del mango.

Es sabido que las plantas sintetizan una variedad de compuestos bioactivos en tejidos vegetales como metabolitos secundarios que tienen actividad antifúngica para detener o inhibir el desarrollo de crecimiento de micelios, la inhibición de la germinación o reducir la esporulación de patógenos fúngicos. El proceso de extracción de metabolitos secundarios a partir de extractos de plantas es variable, puede realizarse utilizando diferentes disolventes,

dependiendo de su polaridad. Se considera que estos compuestos obtenidos a partir de plantas son biodegradables y seguros para su uso como una alternativa para el control de enfermedades en un sistema de producción tradicional (Wilson , Solar , El Ghaouth , & Wisniewski , 1997; Hernández, Bautista, & Velázquez del valle, 2007; Bautista, Barrera, Bravo, & Bermúdez, 2002).

El ajo (*Allium sativum*) es una de las plantas medicinales más antiguas utilizadas por diferentes culturas. Informes del ajo se remontan al siglo XVI AC, en el papiro Ebers de Egipto, donde se reporta más de 20 alimentos afectados por fitopatógenos los cuales fueron remediados eficazmente por los extractos crudo de ajo (Block, 1985). La medicina natural actual recomienda utilizar el ajo para tratar las parasitosis y otras enfermedades intestinales. Muchos estudios de laboratorio han confirmado las propiedades antibacterianas, antimicóticas, antivirales, inmuno estimulantes y antioxidantes del ajo (Imai, Ide, Nagae, Moriguchi, Matsuura, & Itakura, 1994). El daño de un bulbo de ajo por trituración o corte induce la liberación de la enzima vacuolar aliinasa, por intermedio de la catálisis de la enzima aliinasa sufre una conversión de la aliina en alicina (Lanzotti, 2006). Se sabe desde hace mucho tiempo que el proceso de extracción aumenta la potencia, la biodisponibilidad de diversas hierbas crudas y elimina características indeseables y tóxicas. En algunas civilizaciones los bulbos de ajo fueron empaquetados en varios disolventes, como el alcohol, el vino, la leche y el vinagre, con la finalidad de extraer varios ingredientes bioactivos libres de compuestos irritantes, ácidos y oxidantes en el ajo crudo (Amagase & Milner, 1993).

Es por eso que para determinar la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos de *Allium sativum* se trabajó con vinagre como solvente para el proceso de maceración. Se empleó el vinagre porque tiene propiedades conservantes en los alimentos a nivel de la industria alimenticia. Esto quiere decir que en un medio ligeramente ácido las moléculas estarán no disociadas y sin carga, por lo que podrá atravesar sin demasiados problemas la membrana celular de muchos hongos. En el citoplasma el pH es de 7,5, por lo que el vinagre se disociará y hará que baje el pH del medio intracelular. Si baja el pH las enzimas dejan de funcionar y la célula se muere. Por eso el vinagre es un conservante tan eficiente (Mulet , 2011). Esta es una de las razones por las cuales se trabajó con diferentes tipos de vinagre: vinagre de manzana, vinagre de vino tinto y vinagre de uva para el proceso de maceración. Otra variable de estudio

fue el tiempo de maceración óptima en el cual se pueda extraer la mayor cantidad de compuestos bioactivos que presentan actividad antifúngica.

2.1. Actividad antifúngica frente a *Neopestalotiopsis spp.*

De acuerdo a los resultados obtenidos en el CIM se realizó la técnica de dilución en placa para evaluar el porcentaje de inhibición de *Neopestalotiopsis spp.*, empleando los diferentes extractos de ajo en vinagre a diferentes tiempos de maceración. La concentración del extracto fue de 1.4 mg /mL. Los datos estadísticos obtenidos para los extractos de ajo en vinagre de manzana como solvente (anexo 9) indican que no existe diferencia significativa entre los diferentes tiempos de maceración y que el extracto que presentó el mayor porcentaje de inhibición fue el de la maceración por un día con 31 % de inhibición. En el caso de los extractos de ajo en vinagre de vino tinto como solvente (anexo 10), los datos estadísticos nos indican que, si hay diferencia significativa entre los diferentes tiempos de maceración, siendo así que el tercer día de maceración presenta un porcentaje de inhibición de 31 %. Por último, los ensayos realizados con los extractos de ajo en vinagre de uva como solvente (anexo 11), por los datos estadísticos se pudo concluir que sí existe diferencia significativa entre los diferentes tiempos de maceración siendo el cuarto día de maceración el que presenta un 42 % de inhibición frente a la *Neopestalotiopsis spp.* Los tiempos de maceración pueden diferir de un solvente al otro, esto se debe a que el proceso de extracción aumenta la potencia y la biodisponibilidad de diversos compuestos bioactivos y también elimina características indeseables y tóxicas.

Con estos resultados se concluyó que la maceración del ajo en vinagre de manzana por un día presenta una inhibición del 31 %, la maceración del ajo en vinagre de vino tinto por tres días presenta una inhibición del 31 % y por último la maceración del ajo en vinagre de uva por cuatro días presenta una inhibición del 42 % frente a la *Neopestalotiopsis spp.* Siendo que los macerados obtenidos en estas condiciones son adecuados para inhibir el crecimiento de este fitopatógeno. En búsqueda de un extracto capaz de inhibir eficazmente a la *Neopestalotiopsis spp.*, se seleccionaron a estos tres descritos, los cuales presentaron porcentajes de inhibición altos. Para incrementar el porcentaje de inhibición de la *Neopestalotiopsis spp.* se incrementó la concentración del extracto a 1.75 mg/mL, realizando

asimismo la evaluación de los fungicidas químicos para comparar cual es la eficiencia de estos compuestos químicos en comparación con los extractos propuestos.

La capacidad de inhibir el crecimiento de *Neopestalotiopsis spp.*, a través del empleo de compuestos químicos como ser el antracol, ram caf y el coctel químico presentaron los siguientes porcentajes de inhibición 0, 9 y 0 % respectivamente, en comparación con los extractos orgánicos de ajo en los cuales presentan un porcentaje de inhibición del 100%, siendo los extractos de ajo en vinagre más efectivos que los mismos compuestos químicos. Para corroborar estos datos se realizó una serie de pruebas estadísticas. La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene en la cual se rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad anti fúngica frente a *Neopestalotiopsis spp.* ($p < 0.001$). Para la evaluación de ANOVA unifactorial estos datos revela que hay diferencia significativa en los porcentajes de inhibición, de acuerdo con los tratamientos empleados frente a *Neopestalotiopsis spp.* ($p < 0.01$), y con las pruebas post-hoc de Games Howell (Anexo 12), se observa que las diferencias significativas se encuentran entre los grupos Antracol y los diferentes extractos de ajo en vinagre al igual que Ram caf, Coctel químico y Vinagre como control solvente ($p < 0.01$). Como se puede apreciar en el diagrama de cajas (figura 7), se muestra la diferencia entre las medias de los tratamientos con extractos orgánicos de ajo y los controles químicos.

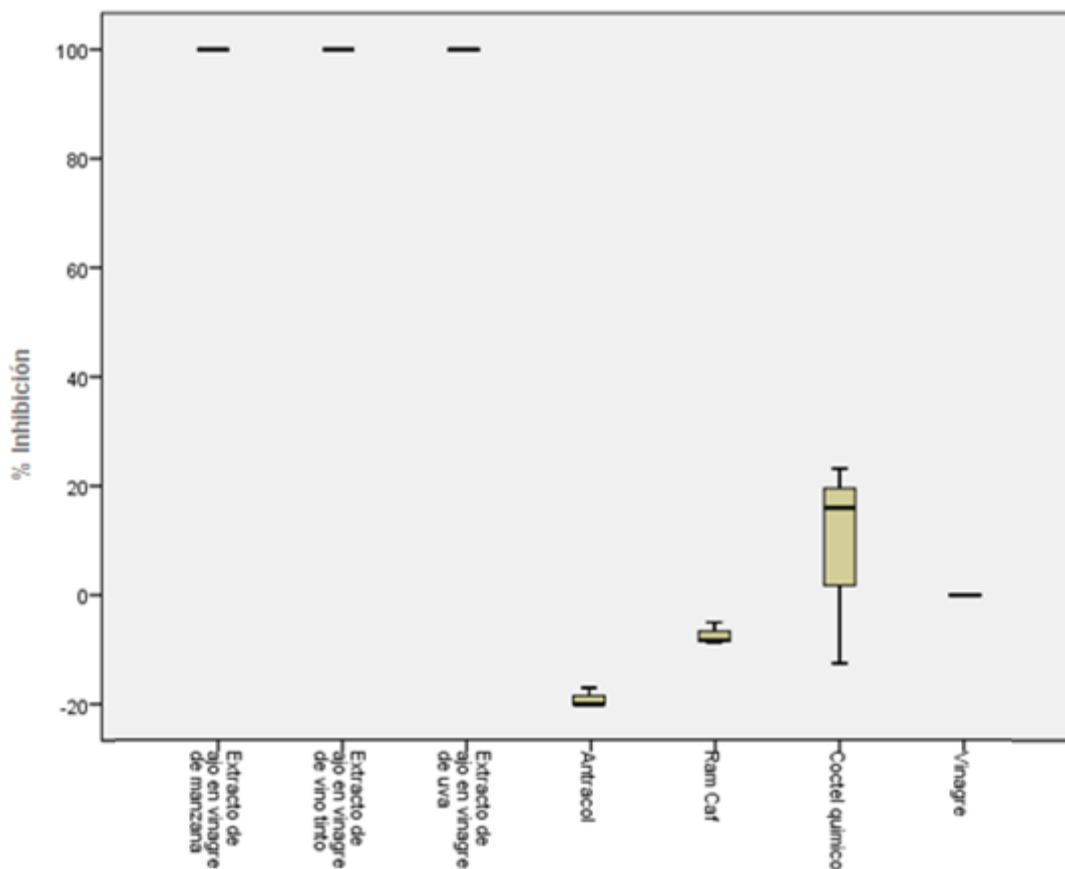


Figura 7. Diagrama de cajas de los diferentes tratamientos antifúngicos que demuestran el porcentaje de inhibición media contra *Neopestalotiopsis spp.*

Fungicidas químicos = Antracol, Ram Caf y Coctel químico. Extractos orgánicos de ajo = Extracto de ajo en vinagre de manzana, extracto de ajo en vinagre de vino tinto y extracto de ajo en vinagre de uva. Control negativo = vinagre.

2.2. Actividad antifúngica frente a *Colletotrichum sp.*

De acuerdo a los resultados obtenidos en el CIM se realizó la técnica de dilución en placa para evaluar el porcentaje de inhibición de *Colletotrichum sp.*, empleando los diferentes extractos de ajo en vinagre a diferentes tiempos de maceración, a una concentración de 1.4 mg/mL del extracto. Los datos estadísticos obtenidos para los extractos de ajo en vinagre de manzana como solvente (anexo 13) indican que existe diferencia significativa entre el primer y tercer día de maceración en comparación con el segundo, cuarto y quinto día de maceración; siendo el primer día de maceración el tiempo óptimo para inhibir en un 100 % a *Colletotrichum sp.* En el caso de los extractos de ajo en vinagre de vino tinto como solvente (anexo 14), se estableció de acuerdo a los datos estadísticos que existe diferencia significativa entre el tercer, cuarto y primer día de maceración en comparación con el quinto y segundo día de maceración;

siendo el tercer día de maceración el tiempo óptimo para inhibir en 99 % seguido del cuarto y primer día con un 96 y 95 % respectivamente. En los extractos de ajo en vinagre de uva como solvente (anexo 15) y de acuerdo al análisis estadístico, se determinó que existe diferencia significativa entre el cuarto día de maceración con 99 % de inhibición en comparación con el primer, quinto, segundo y tercer día de maceración con un porcentaje de inhibición de 77, 65, 61 y 49%, respectivamente. Una posible explicación a la disminución del porcentaje de inhibición del extracto orgánico del primer día de maceración en comparación con los subsiguientes, podría ser la inestabilidad de la alicina al ser un compuesto órgano sulfurado, citotóxico, liposoluble, altamente inestable y volátil, asumiendo que la actividad inhibitoria del crecimiento se deba a esta molécula. Además, la alicina está ausente en extractos envejecidos de ajo y aunque su concentración en ajo macerado fresco es alta, se descompone rápidamente para generar otros derivados órgano sulfurados como son el ajoeno y ditiínas. Se cree que tal vez el grado de acidez de los diferentes solventes puede interferir en la extracción de la alicina y derivados órgano sulfurado como son el ajoeno y ditiínas, además el hecho de que la alicina sea altamente volátil puede interferir en los resultados.

Con estos resultados obtenidos se concluyó que la maceración por un día en vinagre de manzana presenta una inhibición del 100 %, la maceración con vinagre de vino tinto por tres días presenta una inhibición del 99 % y por último la maceración con vinagre de uva por cuatro días presenta una inhibición del 99 % frente a *Colletotrichum sp.* Siendo que los macerados obtenidos en estas condiciones fueron adecuados para inhibir el crecimiento de este fitopatógeno. Pero debido a que el porcentaje de inhibición de los extractos de ajo en vinagre frente a la *Neopestalotiopsis spp.*, fueron menores al 50 %, se incrementó la concentración de los extractos a 1.75 mg/mL. Si comparamos la capacidad de inhibición de los compuestos químicos como ser el antracol, ram caf y el coctel químico sobre el crecimiento de *Colletotrichum sp.*, se obtienen porcentajes de inhibición de 44, 13 y 69 %, respectivamente, en comparación con los extractos orgánicos de ajo los cuales presentan un porcentaje de inhibición del 100%, siendo los extractos orgánicos de ajo más efectivos que los mismos compuestos químicos. Para corroborar estos datos se realizó una serie de pruebas estadísticas. La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad inhibitoria de crecimiento frente al *Colletotrichum sp.* ($p < 0.05$). Mediante el ANOVA unifactorial estos

datos revela que existe diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, de acuerdo con los porcentajes de inhibición que presenta cada tratamiento frente a *Colletotrichum sp.* ($p < 0.01$), como se puede apreciar en el diagrama de cajas (figura 8), el cual refleja la diferencia entre las medias de los tratamientos con extractos orgánicos de ajo y los controles químicos.

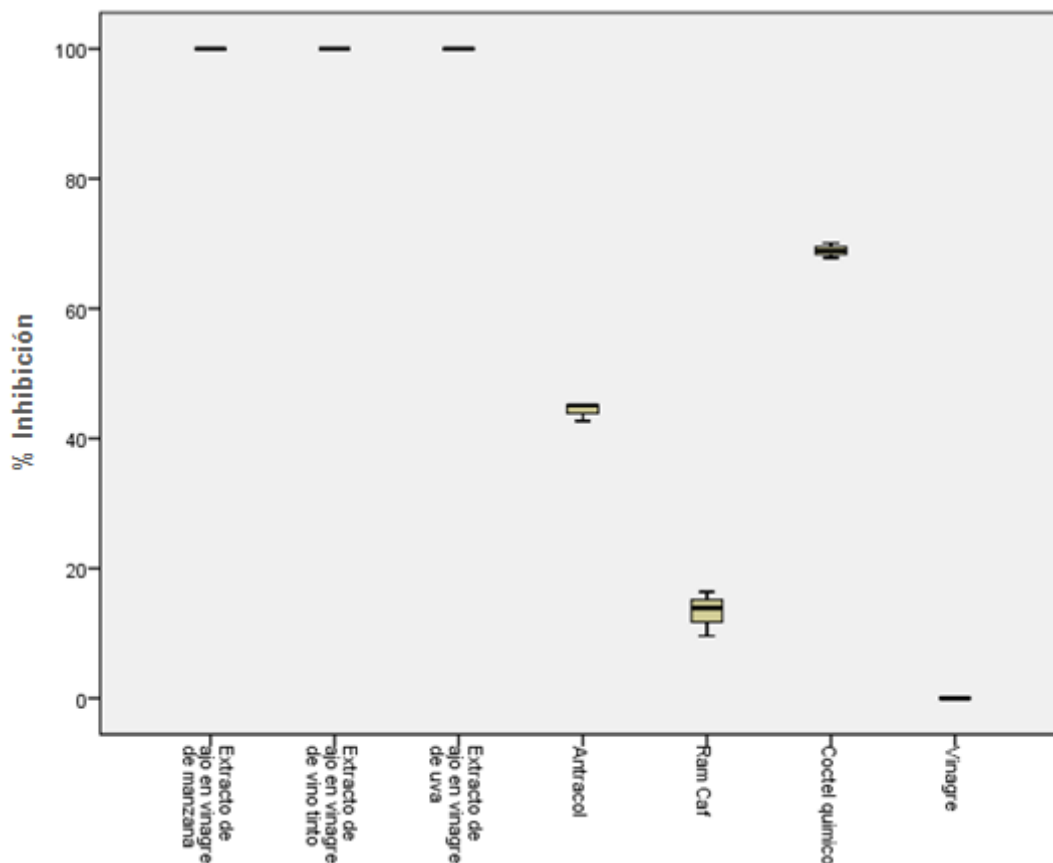


Figura 8. Diagrama de cajas de los diferentes tratamientos antifúngicos que demuestran el porcentaje de inhibición media contra *Colletotrichum sp.* Fungicidas químicos = Antracol, Ram Caf y Coctel químico. Extractos orgánicos de ajo = Extracto de ajo en vinagre de manzana, extracto de ajo en vinagre de vino tinto y extracto de ajo en vinagre de uva. Control negativo = vinagre.

2.3. Actividad antifúngica frente a *Fusarium verticillioides*.

De acuerdo a los resultados obtenidos en el CIM se realizó la técnica de dilución en placa para evaluar el porcentaje de inhibición de *Fusarium verticillioides*, empleando los diferentes extractos de ajo en vinagre a diferentes tiempos de maceraciones, a una concentración de 1.4 mg /mL del extracto. Los datos estadísticos obtenidos para los extractos de ajo en vinagre de manzana como solvente (anexo 16) indican que diferencia significativa entre el cuarto, quinto

y primer día de maceración en comparación con el segundo y tercer día de maceración; siendo los porcentajes de inhibición de 98, 98 y 97 % respectivamente para inhibir al *Fusarium verticillioides*. En el caso de los extractos de ajo en vinagre de vino tinto como solvente (anexo 17), por los datos estadísticos se pudo concluir que existe diferencia significativa entre segundo y tercer día de maceración en comparación con el cuarto, quinto y primer día de maceración; siendo el segundo día de maceración el tiempo óptimo para inhibir en un 100 % seguido del tercer día con un 99 %. Y por último, los ensayos realizados con los extractos de ajo en vinagre de uva como solvente (anexo 18) y de acuerdo al análisis estadístico, se determinó que existe diferencia significativa entre el primer y cuarto día de maceración con un 97 y 69 % de inhibición en comparación con el tercer, quinto y segundo día de maceración con un porcentaje de inhibición de 66, 62 y 55 % respectivamente.

Con estos resultados obtenidos se concluyó que la maceración de ajo en vinagre de manzana por un día presenta una inhibición del 97 %, la maceración de ajo en vinagre de vino tinto por tres días presenta una inhibición del 99 % y por último la maceración de ajo en vinagre de uva por cuatro días presenta una inhibición del 69 % frente al *Fusarium verticillioides*. Siendo que los macerados obtenidos en estas condiciones adecuados para inhibir el crecimiento de este fitopatógeno. En búsqueda de un compuesto capaz de inhibir a los tres fitopatógenos se incrementó la concentración del extracto a 1,75 mg/mL, Si comparamos la capacidad de inhibir el crecimiento de *Fusarium verticillioides*., a través del empleo de compuestos químicos como ser el antracol, ram caf y el coctel químico los cuales presentaron porcentajes de inhibición de 54, 18 y 61 % respectivamente y lo comparamos con los extractos orgánicos de ajo los cuales presentaron porcentajes de inhibición del 100%, siendo los extractos orgánicos de ajo más efectivos que los mismos compuestos químicos. Para corroborar estos datos se realizó la prueba de homogeneidad de varianzas de Levene la cual rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad antifúngica frente al *Fusarium verticillioides*. (Estadístico: 5.780; df1:6 y df2:14: $p < .05$). Mediante el ANOVA unifactorial estos datos indica que hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, de acuerdo con los porcentajes de inhibición que presenta cada tratamiento empleados frente al *Fusarium verticillioides*. (F: 7449.198; $p < 0.01$). Y para las pruebas post-hoc de Games Howell (Anexo 19), se observa que las diferencias significativas que se encuentran entre los grupos Antracol y los diferentes extractos de ajo en

vinagre al igual que Ram caf, Coctel químico y Vinagre como control solvente ($p < 0.01$), como se puede observar en el diagrama de cajas (figura9), el cual refleja la diferencia entre los diferentes extractos y los controles químicos.

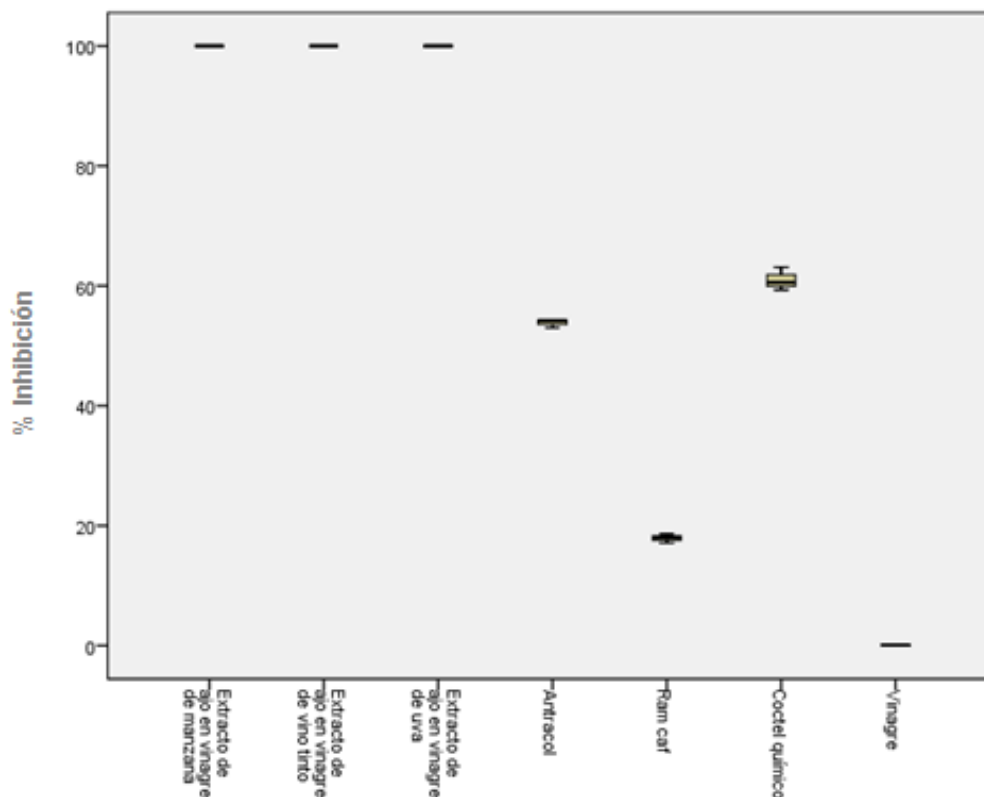


Figura 9. Diagrama de cajas de los diferentes tratamientos antifúngicos que demuestran el porcentaje de inhibición media contra *Fusarium verticillioides*. Fungicidas químicos = Antracol, Ram Caf y Coctel químico. Extractos orgánicos de ajo = Extracto de ajo en vinagre de manzana, extracto de ajo en vinagre de vino tinto y extracto de ajo en vinagre de uva. Control negativo = vinagre.

Al unir el amplio espectro de potencial antifúngico, la fuerte capacidad alelopática y la facilidad de disponibilidad del extracto, el ajo ofrece una opción muy atractiva para ser considerado como fungicida natural para una mayor producción y una protección significativa contra la variedad de enfermedades fúngicas. Sin embargo, la exploración e identificación de los compuestos activos del ajo varían dependiendo del tipo de solvente que se emplee para la extracción. Por tal razón se realizó cromatografía en capa fina para comparar los diferentes extractos y evaluar cuántos compuestos fue extraído empleando como solvente orgánico al vinagre. Con la ayuda de cromatografía en capa fina se evidenció la presencia de dos

compuestos, el ajoeno y la alicina (Rf: 0.8 y 0.6, respectivamente). Estos compuestos se obtienen como resultado del procesamiento del ajo por maceración, trituración y su posterior hidratación, activando la enzima vacuolar aliinasa que actúa sobre la aliina citosólica inodora para generar la alicina, en presencia de solventes orgánicos sufre una serie de transformaciones originando otras especies químicas, especialmente ajoenos (Lawson, Wood, & Hughes, 1991). La alicina (Figura 10) es el tiosulfonato más abundante del ajo que contribuye en mayor proporción a conferirle su olor característico (Kerckhoffs, Brouns, Hornstra, & Mensik, 2002; Okada, Tanaka, Fujita, Sato, & Okajima, 2005).

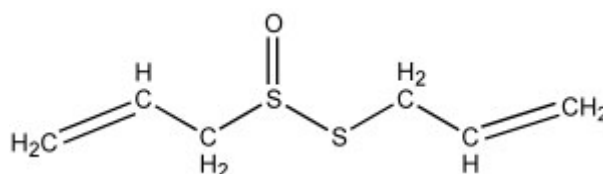


Figura 10. Estructura química de la alicina

Los extractos orgánicos de ajo inhibieron significativamente el crecimiento de los 3 fitopatógenos en estudio. La alicina es el principal compuesto orgánico sulfurado entre los diversos grupos sulfurados que constituyen los extractos de bulbo de ajo. Diversos autores demostraron la actividad antifúngica de los compuestos alicina y ajoeno en modelos mitóticos *in vitro*. Los mecanismos químicos subyacentes a la acción antimicrobiana de la alicina son poco conocidas, pero se sabe que alteran al aminoácido libre L -cisteína mediante la formación de alil-disulfo (Miron , Listowsky, & Wilchek, 2010). La mayoría de los compuestos azufrados del ajo tienen efectos variados sobre el desarrollo del crecimiento de micelios de hongos y el efecto sobre la tasa de esporulación y la inhibición de la germinación que van desde un efecto fungistático hasta una inhibición completa. Los extractos vegetales aplicados en estado crudo o como fracción afectan el desarrollo de colonias fúngicas para inhibir parcial y totalmente en ensayos de laboratorio a bajas concentraciones de compuestos bioactivos, además de afectar la incidencia y severidad como tratamiento para aumentar la vida útil de productos con excelentes resultados

Estudios realizados en los compuestos activos de ajo y cebolla indicaron que estos compuestos son capaces de destruir las células fúngicas, disminuyendo la captación de oxígeno, reduciendo el crecimiento celular, inhibiendo la síntesis de lípidos, proteínas y ácidos

nucleicos, cambiando el perfil lipídico de la membrana celular e inhibiendo la síntesis de la pared celular fúngica (Gupta & Porter, 2001). Se ha reportado que el efecto antimicrobiano del vinagre es fuerte en las bacterias, pero débil en los hongos y que el extracto de ajo en vinagre encurtido, como el extracto de ajo tiene una fuerte actividad antimicrobiana contra bacterias y los hongos *Aspergillus niger* y *Aspergillus flavus* (Yang, Wei, Cao, Zhao, & Wang, 2008). Trabajos realizados por López y colaboradores (2005) con extractos acuosos de ajo (*Allium sativum*), Arbusto de Creosota (*Larrea tridentata*) y clavo (*Syzygium aromaticum*) inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, *Rhizoctonia solani* y *Verticillium dahlia*. Según Verástegui y colaboradores (1996) los alcaloides aislados de las hojas de ruda (*Ruta graveolens*), presentaron mayor actividad fungicida contra *Colletotrichum* y *Fusarium*. Con los resultados obtenidos y todos los trabajos expuestos podemos indicar que los extractos de plantas generalmente se consideran más aceptables y menos peligrosos que los productos sintéticos y pueden usarse como tratamiento antifúngico alternativo (Guerrero, Solís, Hernández, Flores, Sandoval, & Jasso, 2007).

3. Actividad biológica inhibitoria de los filtrados de cultivo de *Bacillus subtilis* cepa YHPL-BJ.

Para el control de fitopatógenos se aplican diversos fungicidas de acción protectora y también de carácter sistémico (Almandoz, Pico, Pérez, Rodríguez, & Parra, 2000). Aunque el principal método de manejo de las enfermedades causadas por *Colletotrichum* sp., *Fusarium verticillioides* y *Neopestalotiopsis* spp., ha sido el control químico, los problemas de contaminación ambiental han impactado negativamente en la biodiversidad de los agroecosistemas, así como en la seguridad y salud pública; el uso inadecuado de los agroquímicos ha conducido a la búsqueda y desarrollo de nuevas alternativas. Los fungicidas se han utilizado en alta frecuencia para controlar estas enfermedades, pero la dificultad en el control químico está aumentando debido al rápido desarrollo de la resistencia a fungicidas (Chastagner & Riley, 1990). Por lo tanto, el control biológico que implica dos o más mecanismos es una alternativa para el uso práctico en el control de enfermedades causadas por una serie de fitopatógenos. *Bacillus subtilis* es uno de los microorganismos eficaces en el control de las enfermedades de las plantas (Nagórska, Bikowski, & Obuchowski, 2007). Se ha informado que *B. subtilis* no sólo puede inhibir el crecimiento de hongos patógenos produciendo diversas enzimas líticas y antibióticos, sino también pueden inducir resistencia

sistémica de las plantas aumentando las actividades de varias enzimas relacionadas con la defensa de las plantas (Baysal , Caliskan , & Yesilova, 2008; Santoyo , Orozco-Mosqueda , & Govindappa, 2012). Estas características proporcionan a *B. subtilis* ventajas potenciales sobre los otros microorganismos antagonistas en la producción y conservación de agentes de control biológico (Nagórska , Bikowski , & Obuchowski, 2007).

En esta investigación se utilizó el filtrado crudo de *Bacillus subtilis*, para evaluar su actividad biológica inhibitoria del crecimiento de fitopatógenos. Se procedió a evaluar diferentes filtrados crudos de cultivos de *Bacillus subtilis* obtenidos a diferentes tiempos de incubación y con modificaciones químicas del medio. Los filtrados crudos que presentaron el 100% de inhibición del crecimiento de los fitopatógenos sujetos de este estudio, fueron obtenidos a las 192 horas de incubación de *Bacillus subtilis* en caldo papa, a las 36 horas de incubación en caldo papa suplementado con urea y a las 54 horas de incubación en caldo papa suplementado con cloruro de amonio.

El porcentaje de inhibición de los diferentes filtrados crudos bacterianos de *Bacillus subtilis* fue del 100% frente a *Colletotrichum sp.*, siendo los filtrados bacterianos más efectivos que los mismos compuestos químicos. Para corroborar estos datos se realizó una serie de pruebas estadísticas. La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos frente al *Colletotrichum sp.* ($p = 0.01$). En el ANOVA unifactorial estos datos indican que hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, de acuerdo con los porcentajes de inhibición que presenta cada tratamiento frente al *Colletotrichum sp.* ($p < 0.01$), como se puede apreciar en el diagrama de cajas (figura 11), el cual refleja la diferencia entre los diferentes filtrados bacterianos crudos y los controles químicos.

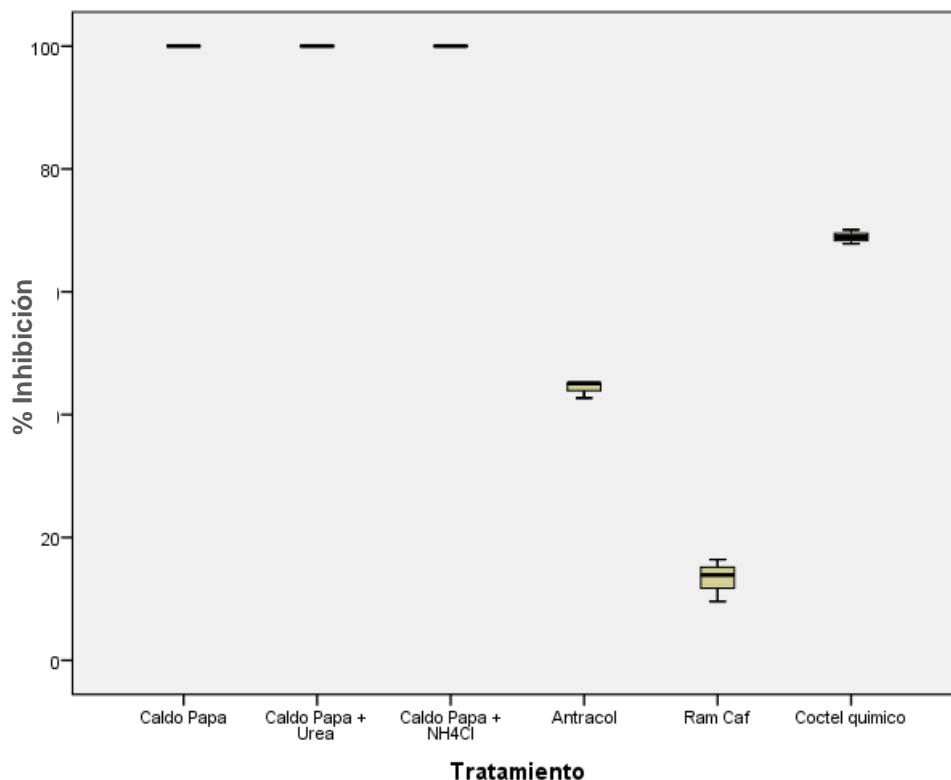


Figura 11. Diagrama de cajas de los diferentes tratamientos antifúngicos que demuestran el porcentaje de inhibición media contra *Colletotrichum sp.* Fungicidas químicos = Antracol, Ram Caf y Coctel químico. Filtrados bacterianos crudo del cultivo de *Bacillus subtilis* inoculados en Caldo papa, caldo papa suplementado con urea y caldo papa suplementado con cloruro de amonio.

El porcentaje de inhibición de los filtrados bacterianos de *Bacillus subtilis* frente a *Fusarium verticillioides* fue del 100%, siendo los filtrados bacterianos más efectivos que los mismos compuestos químicos. Corroborando estos datos se realizó una serie de pruebas estadísticas. La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad inhibitoria frente al *Fusarium verticillioides*, ($p < 0.01$). Con ANOVA unifactorial estos datos indican que hay diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, de acuerdo con los porcentajes de inhibición que presenta cada tratamiento frente al *Fusarium verticillioides*, ($p < 0.01$), como se puede apreciar en el diagrama de cajas (figura 12), el cual refleja la diferencia entre los diferentes filtrados bacterianos crudos y los controles químicos.

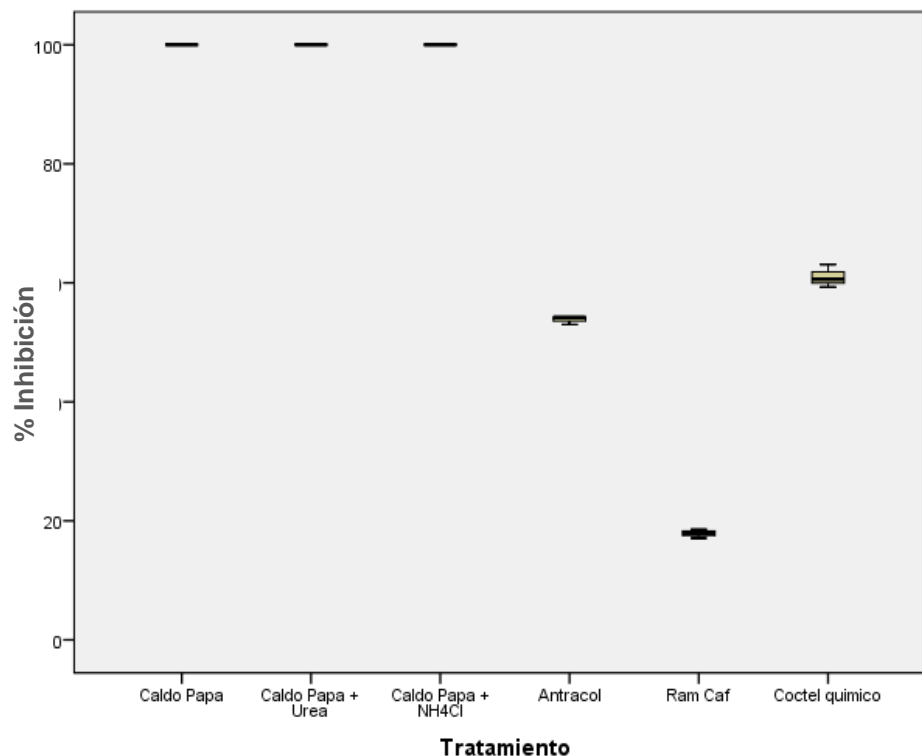


Figura 12. Diagrama de cajas de los diferentes tratamientos antifúngicos que demuestran el porcentaje de inhibición media contra *Fusarium verticillioides*. Fungicidas químicos = Antracol, Ram Caf y Coctel químico. Filtrados bacterianos crudo de *Bacillus subtilis* inoculados en Caldo papa, caldo papa suplementado con urea y caldo papa suplementado con cloruro de amonio.

Y por último si comparamos el porcentaje de inhibición de los filtrados bacterianos de *Bacillus subtilis* frente a *Neopestalotiopsis spp.*, los compuestos químicos como el antracol, ram caf y el coctel químico presentan porcentajes de inhibición de 0, 9 y 0 % respectivamente en cambio los filtrados presentan un porcentaje de inhibición del 100%, siendo los filtrados más efectivos que los mismos compuestos químicos. Corroborando estos datos se realizó una serie de pruebas estadísticas. La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene rechaza la hipótesis de igualdad de varianzas entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad inhibitoria frente al *Neopestalotiopsis spp.*, ($p < 0.01$) y en el ANOVA unifactorial los datos indica que **hay** diferencia significativa entre los diferentes tratamientos, de acuerdo con los porcentajes de inhibición que presenta cada tratamiento frente a *Neopestalotiopsis spp.*, ($p < 0.01$) como se puede apreciar en el diagrama de cajas (figura 13), el cual refleja la diferencia entre los diferentes filtrados bacterianos crudos y los controles químicos.

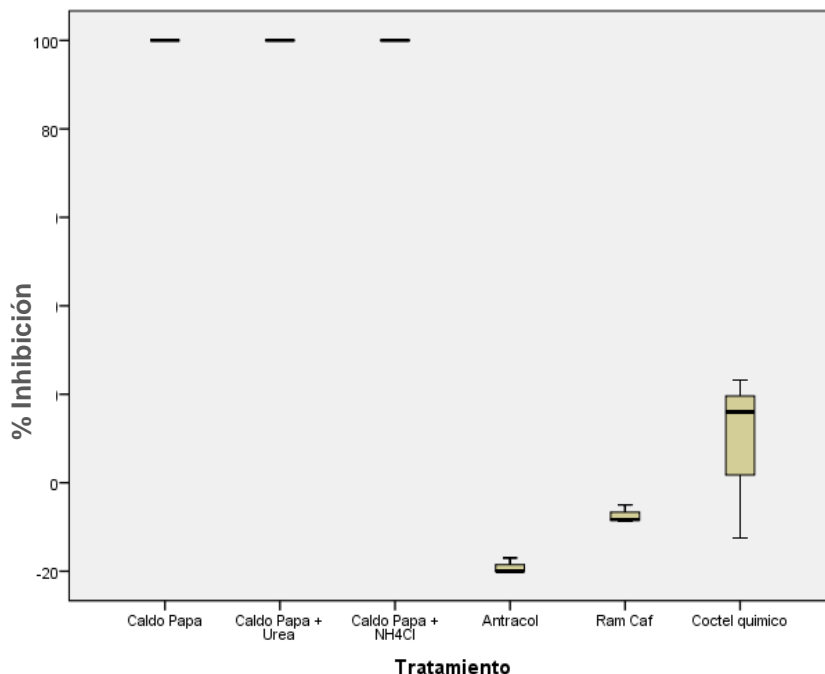


Figura 13. Diagrama de cajas de los diferentes tratamientos antifúngicos que demuestran el porcentaje de inhibición media contra *Neopestalotiopsis spp.* Fungicidas químicos = Antracol, Ram Caf y Coctel químico. Filtrados bacterianos crudos de *Bacillus subtilis* inoculados en Caldo papa, caldo papa suplementado con urea y caldo papa suplementado con cloruro de amonio.

Al evaluar el amplio espectro de potencial antifúngico de los filtrados bacterianos crudos de *Bacillus subtilis*, se tiene una opción muy atractiva para considerar a estos filtrados compuestos biológicamente activos. Sin embargo, la exploración e identificación de los compuestos activos del filtrado pueden comprender una serie de compuestos activos entre enzimas y metabolitos secundarios. Por tal razón se realizó determinaciones enzimáticas proteolíticas y celulolíticas, mediante las cuales se determinó que la mayor actividad proteolítica fue de 12.990,68 UI/mL (216.511,36 nkat) en el filtrado bacteriano del medio caldo papa suplementado con cloruro de amonio, seguido del filtrado bacteriano del medio caldo papa suplementado con urea con un valor de 12.908,01 UI/mL (215.133,5 nkat), y cuando solo se emplea el filtrado bacteriano del medio caldo papa la actividad disminuye dando un valor de 2.188,98 UI/mL (36.483 nkat). Para el caso de la actividad celulolítica la mayor actividad se presentó en el filtrado bacteriano suplementado con urea dando un valor de 2.361,98 UI/mL, seguido del filtrado bacteriano suplementado con cloruro de amonio con un

valor de 2.352,54 UI/ml, pero cuando el filtrado bacteriano no se encuentra suplementado el valor disminuye a 134,72 UI/ml. Las especies del género *Bacillus* son un grupo importante con aplicación en biotecnología, ya que tienen interés como fuente de producción de enzimas extracelulares. Diversos estudios han señalado que el género *Bacillus* produce enzimas hidrolíticas como proteasas, celulasas y quitinasas lo cual ha permitido su aplicación en la industria y en control biológico respectivamente. Las proteasas podrían jugar un papel dentro del proceso antagónico de los organismos, ya que se ha observado que podrían estar involucradas dentro del proceso de patogenicidad de hongos hacia insectos (Lopez, Carbonell, & Gomez, 2002). Estudio realizado por Tekalign Kejela (2016) quien con su equipo de trabajo aisló un total de 42 especies de *Bacillus*, encontró que la especie *Bacillus* (BT42), era capaz de antagonizar los efectos patógenos de *Colletotrichum gloeosporioides* y *Fusarium oxysporum*. El mecanismo de acción de la inhibición de los hongos patógenos resultó ser efectos sinérgicos de metabolitos secundarios, enzimas líticas extracelulares conocidas (quitinasa y β -1, 3-glucanasa), que están correlacionadas con la inhibición del crecimiento micelial de los hongos además de la presencia de sideróforos. En una revisión de estudios similares, *Bacillus* sp., cepa RMB7, que tiene una actividad antifúngica de amplio rango mostró una inhibición del crecimiento micelial de 71% y 78% de *F. oxysporum* y *C. gloeosporioides* respectivamente (Ali y colaboradores 2014). Trabajos realizados por Kim y colaboradores (2003) empleando el filtrado bacteriano de *Bacillus subtilis*, mediante la técnica de difusión en papel, observaron que cinco de las siete cepas produjeron halos entre 0.13 y 0.26 cm. mediante el método de discos en difusión en agar generando halos de inhibición contra varios patógenos incluyendo *C. gloeosporioides*, también reportaron la estabilidad del filtrado bacteriano cuando este es sometido a 80 °C durante 1 h manteniendo su actividad antifúngica. Otros trabajos han reportado que fracciones de iturina A y fengicina producidas por *Bacillus subtilis* CMB32 producen halos de inhibición en *C. gloeosporioides* (Kim y colaboradores, 2010).

4. Actividad biológica inhibitoria de los filtrados de cultivo de *Trichoderma harzianum* cepa BOL 12QD.

Las condiciones de cultivo de microorganismos sometidos a factores de stress de tipo físico químico y/o nutricional facilitan la síntesis de moléculas biológicamente activas inhibitoras del crecimiento de otros microorganismos. En biotecnología la mayoría de los productos se obtienen usando una cepa pura, sin embargo, en la naturaleza la mayoría de los

microorganismos se encuentran formando parte de comunidades microbianas, en las que se obtienen productos mediante la combinación de vías metabólicas de diferentes microorganismos. Una de las razones por la cual se realiza co-cultivos es para inducir la producción de metabolitos bioactivos como respuesta a la amenaza del fitopatógeno fúngico sobre el *T. harzianum* obteniendo un coctel con actividad fungicida. En este sentido, la influencia de los parámetros físicos, químicos y biológicos en los cultivos en batch de *T. harzianum* cepa Bol 12 QD, ha sido estudiada en el presente trabajo, demostrando el papel que juegan estos factores externos como internos en la actividad biológica inhibitoria de los filtrados crudos de cultivo frente a los fitopatógenos *Colletotrichum sp.*, *Fusarium verticillioides* y *Neopestalotiopsis spp.* A continuación, en la tabla 3 se detallan los efectos de cada uno de los factores independientes con luz LED violeta, agitación y co-cultivo en el comportamiento fisiológico de *T. harzianum* cepa Bol 12 QD. La combinación o el efecto individual de estas modificaciones físicas y biológicas podrán ejercer un mecanismo de stress sobre el metabolismo de *T. harzianum* induciendo la producción de moléculas bioactivas ya sean enzimas o metabolitos secundarios o ambos, mismos que potencialmente se hallan presentes en el filtrado crudo del cultivo y producen inhibición del crecimiento de hongos fitopatógenos estudiados aquí. En este sentido un diseño experimental multivariado fue establecido con la finalidad de observar la interacción de las variables analizadas, es decir, la influencia en el incremento del porcentaje de inhibición del crecimiento de *Colletotrichum sp.*, *Fusarium verticillioides* y *Neopestalotiopsis spp.*

Tabla 3. Porcentaje de inhibición de los filtrados fúngicos a diferentes condiciones de cultivo de *Trichoderma harzianum* cepa *Bol 12QD*, frente a *Colletotrichum* spp., *Fusarium verticillioides* y *Neopestalotiopsis* spp.

			% Inhibición <i>Colletotrichum</i>	% Inhibición <i>Fusarium</i>	% Inhibición <i>Neopestalotiopsis</i>
BOL 12 QD	Luz LED violeta	Sin agitación	54	43	47
		120 rpm	100	100	100
	Luz blanca	Sin agitación	36	37	32
		120 rpm	38	49	47
BOL 12 QD + <i>Colletotrichum</i>	Luz LED violeta	Sin agitación	67	79	71
		120 rpm	100	100	100
	Luz blanca	Sin agitación	54	47	43
		120 rpm	67	84	50
BOL 12 QD + <i>Fusarium</i>	Luz LED violeta	Sin agitación	89	88	79
		120 rpm	100	100	100
	Luz blanca	Sin agitación	41	76	21
		120 rpm	61	75	53

Como se observa en la figura 14, porcentajes de inhibición del 100% del crecimiento de *Colletotrichum* sp., se establecieron en condiciones de interacción de las variables Luz LED y agitación 120 rpm. No existe diferencia significativa entre la inoculación con el fitopatógeno o sin la inoculación de los mismos como agentes en el co-cultivo para poder incrementar la actividad biológica.

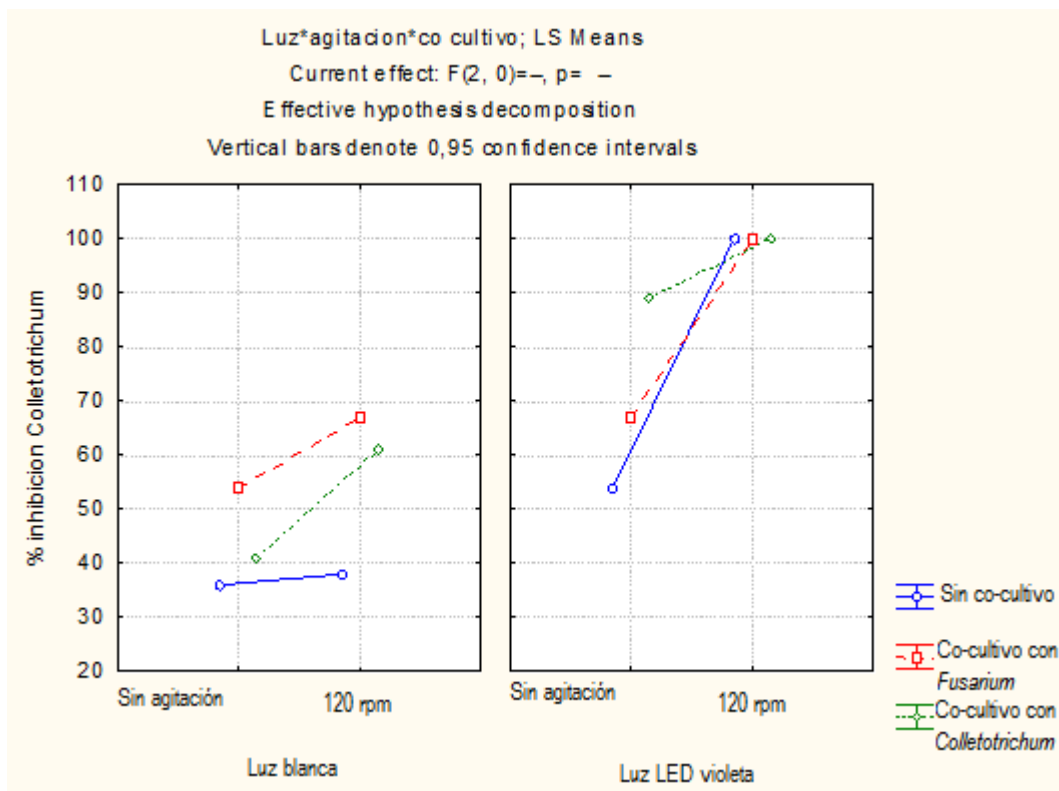


Figura 14. Diseño experimental multivariado: Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Colletotrichum sp.* de acuerdo a la interacción entre las condiciones de cultivo de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD: agitación, luz y co-cultivo en medio caldo papa dextrosa

Para corroborar estos datos se realizó una regresión múltiple en la cual el intercepto tuvo un $p = 0.001$, en condiciones de luz violeta $p < 0.001$, agitación $p = 0.01$. Siendo estas condiciones las óptimas para obtener un filtrado fúngico con actividad inhibitoria de crecimiento del 100% frente a *Colletotrichum sp.* Mediante la superficie de respuesta (figura 15) se observa el porcentaje de inhibición de los filtrados crudos fúngicos de *T. harzianum* cepa Bol 12 QD frente a *Colletotrichum sp.*, el cual indica que en condiciones de luz violeta y agitación existe un 100 % de inhibición del fitopatógeno en estudio, pero cuando las condiciones son luz violeta y sin agitación el porcentaje de inhibición es del 90 %. También se puede apreciar que sin agitación y sin luz el porcentaje de inhibición decae en un 30 a 40 % frente a *Colletotrichum sp.* Siendo la luz LED violeta una condicionante para incrementar los porcentajes de inhibición.

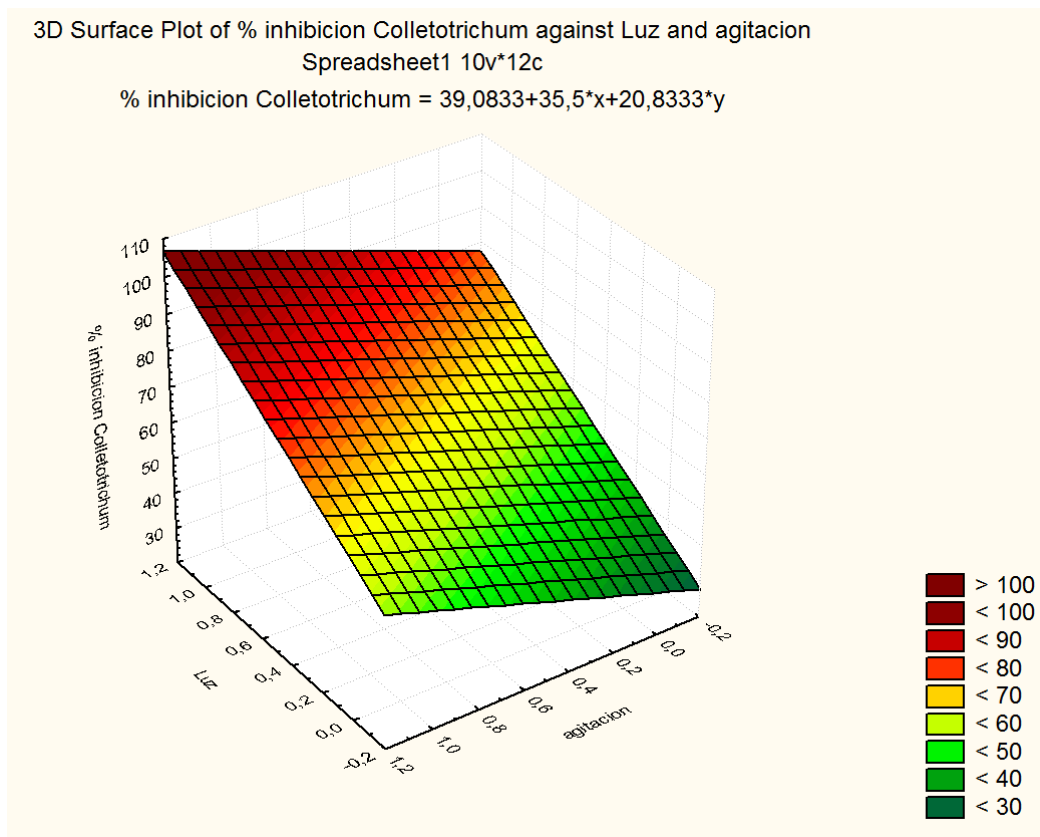


Figura 15. Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de *Colletotrichum sp.*, originado por efecto del filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD, producido a diferentes condiciones: agitación y luz violeta.

En la figura 16, porcentajes de inhibición del 100% del crecimiento de *Fusarium verticillioides*, se establecieron en condiciones de interacción de las variables Luz LED violeta y agitación 120 rpm. No existe diferencia significativa entre la inoculación con el fitopatógeno o sin la inoculación de los fitopatógenos como agente en el co-cultivo para poder incrementar la actividad biológica.

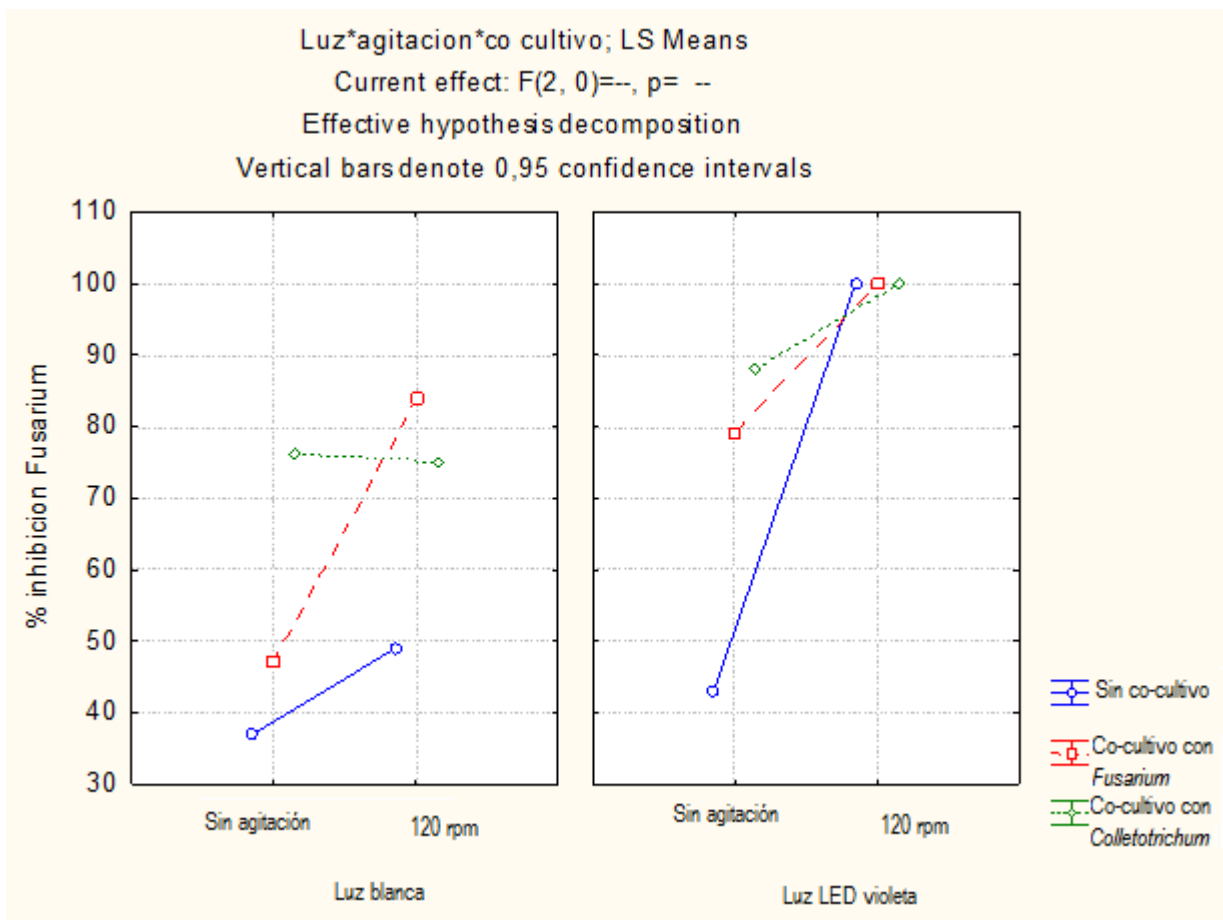


Figura 16. Diseño experimental multivariado: Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Fusarium verticillioides* de acuerdo a la interacción entre las condiciones de cultivo de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD: agitación, luz y co-cultivo en medio caldo papa dextrosa.

Para verificar estos datos se realizó una regresión múltiple en la cual el intercepto tuvo un $p = 0.001$, en condiciones de luz violeta y agitación se indica que es significativo con un $p = 0.01$ respectivamente, Siendo estas condiciones las óptimas para obtener un filtrado fúngico con actividad inhibitoria de crecimiento del 100% frente a *Fusarium verticillioides*. Mediante la superficie de respuesta (figura 17) se observa el porcentaje de inhibición de los filtrados crudos fúngicos de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD frente a *Fusarium verticillioides*, el cual indica que en condiciones de luz violeta y agitación existe un 100 % de inhibición del fitopatógeno en estudio, pero si las condiciones son luz violeta, sin agitación el porcentaje de inhibición será de 50 % siendo la agitación una condición importante para obtener resultados mayores al 50 %.

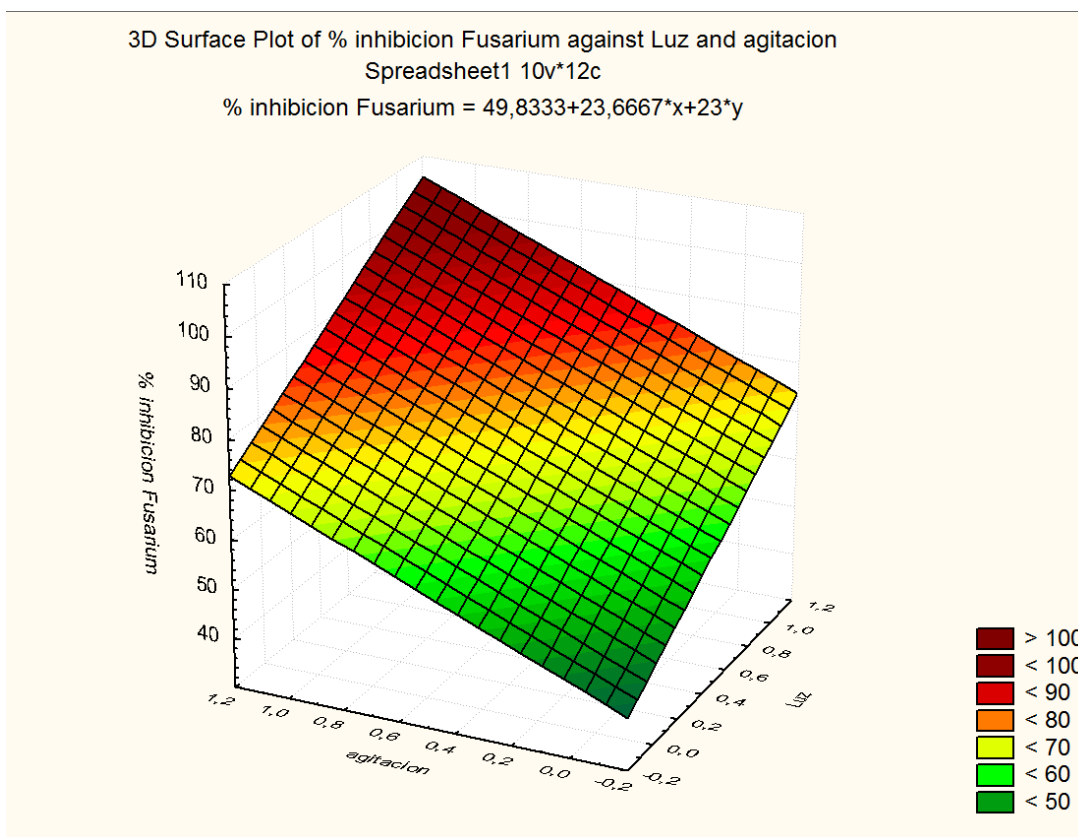


Figura 17. Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de *Fusarium verticillioides*, originado por efecto del filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD, producido a diferentes condiciones: agitación y luz violeta.

Y por último en la figura 18, porcentajes de inhibición del 100% del crecimiento de *Neopestalotiopsis spp.*, se establecieron en condiciones de interacción de las variables Luz LED y agitación 120 rpm. No existe diferencia significativa entre la inoculación con el fitopatógeno o sin la inoculación de los fitopatógenos como agente en el co-cultivo para poder incrementar la actividad biológica.

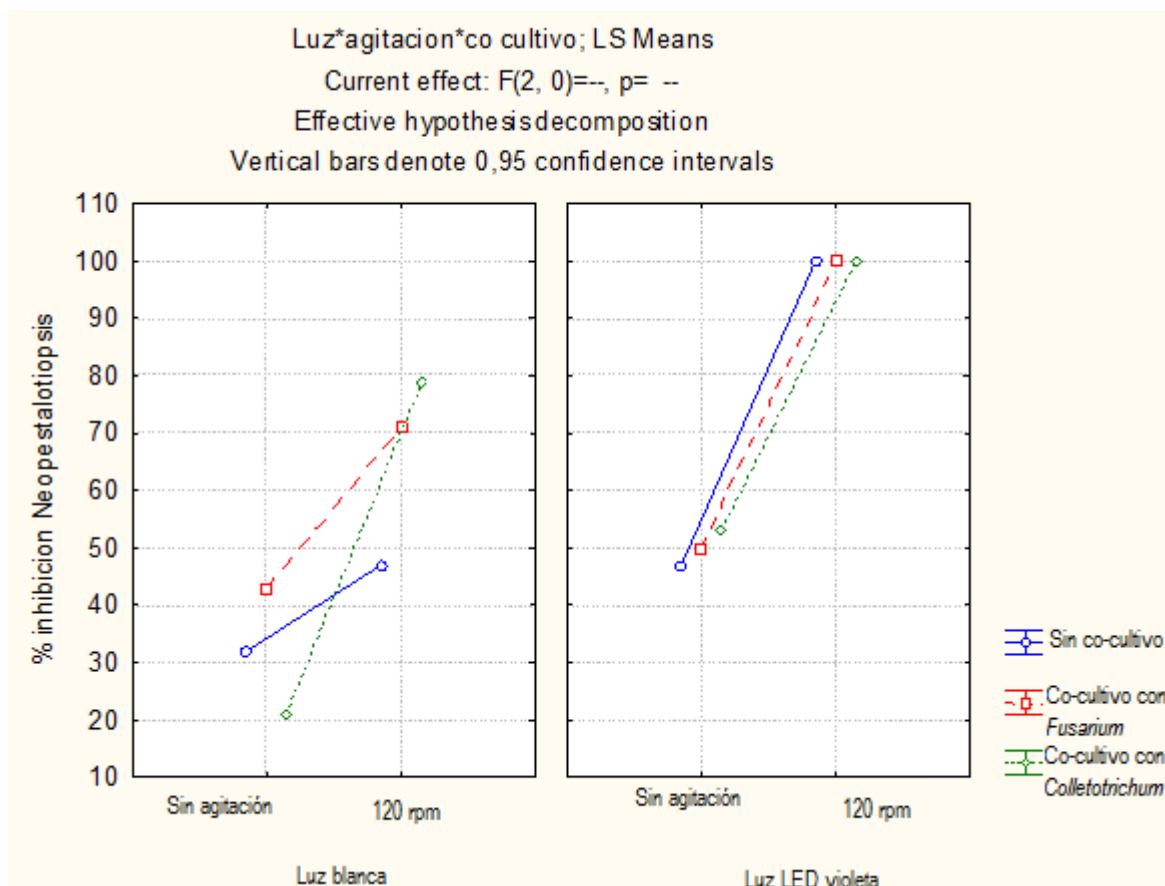


Figura 18. Diseño experimental multivariado: Porcentaje de inhibición del crecimiento de *Neopestalotiopsis* spp., de acuerdo a la interacción entre las condiciones de cultivo de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD: agitación, luz y co-cultivo en medio caldo papa dextrosa.

Para verificar estos datos se realizó una regresión múltiple en la cual el intercepto tuvo un $p < 0.01$, en condiciones de luz violeta $p < 0.001$ seguido de agitación con $p < 0.01$ en la figura 19 de superficie de respuesta podemos observar que las condiciones de luz violeta y agitación son condiciones óptimas para llegar a un 100 % de inhibición del fitopatógeno en estudio además de que si solo se emplea las condiciones de luz violeta, sin agitación el porcentaje de inhibición será de aprox. 20 % siendo la agitación una condición importante en la fermentación en batch. Siendo estas condiciones las óptimas para obtener un filtrado fúngico con actividad inhibitoria de crecimiento del 100% frente a *Neopestalotiopsis* spp. Mediante la superficie de respuesta se observa el porcentaje de inhibición de los filtrados crudos fúngicos de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD frente a *Neopestalotiopsis* spp, el cual indica que en condiciones de luz violeta y agitación existe un 100 % de inhibición del fitopatógeno en

estudio, pero si las condiciones son luz violeta, sin agitación el porcentaje de inhibición será de 80 % siendo la luz violeta un factor importante para obtener filtrados crudos fúngicos con actividad inhibitoria de crecimiento altos.

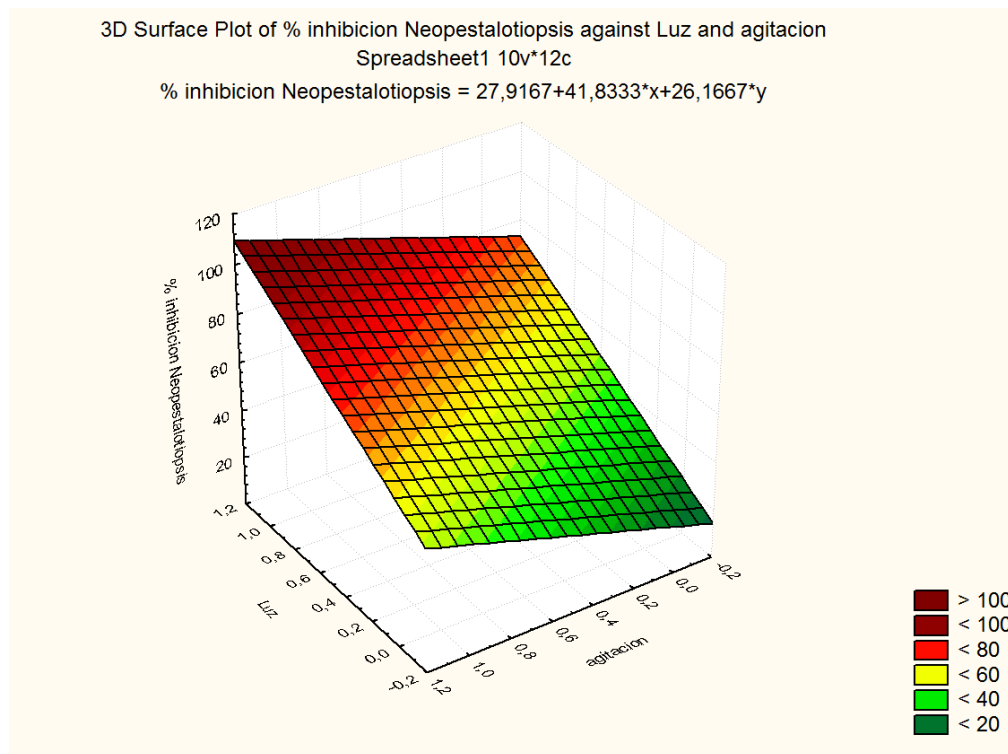


Figura 19. Superficie de respuesta del diseño factorial, porcentaje de inhibición en el crecimiento de *Neopestalotiopsis spp.*, originado por efecto del filtrado fúngico de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD, producido a diferentes condiciones: agitación y luz violeta.

El tipo y cantidad de luz que llega a recibir el hongo en su fase de conidiación es un factor en el rendimiento y la eficacia biológica. Trabajos reportados por Pérez (2007) indican que la mayoría de las especies de *Trichoderma* se usan como modelos fotomorfogénicos debido a su capacidad de conidiar después de ser expuestas a la luz, sin embargo, la variación de la luz liberaría la producción de compuestos que causarían la lisis de las paredes fúngicas. Esto se pudo mostrar indirectamente en el porcentaje de inhibición de crecimiento de los filtrados crudos fúngicos de *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD sobre *Colletotrichum sp.*, *Fusarium verticillioides* y *Neopestalotiopsis spp.*, siendo la luz LED violeta una condición significativa para la producción de compuestos biológicamente activos. Con los resultados obtenidos se puede indicar que la capacidad de inhibir a fitopatógenos fúngicos a través del

estrés por competencia de nutrientes, parecería que se ve afectada ya que el porcentaje de inhibición disminuye inhibiendo a los metabolitos del *T. harzianum*. Estudios realizados por Apaza (2008) evaluó el antagonismo y la influencia de parámetros físicos, químicos y biológicos sobre el cultivo en batch de *T. inhamatum* cepa Bol 12 QD (la especie de *Trichoderma* fue recientemente comprobada mediante identificación molecular determinando que es *Trichoderma harzianum* cepa Bol 12 QD) y la capacidad de estos sobre el control de *B. fabae*. Al emplearse filtro de luz violeta el porcentaje de inhibición en el crecimiento de *B. fabae* fue de 52.84 %, bajo el parámetro de agitación se reportó 61.11% de inhibición. En el co-cultivo con esporas de *T. inhamatum* (10^6 esp/mL) con *B. fabae* (10^2 esp/mL), la inhibición fue 51.21 % respectivamente. Además, evaluó la aplicación del fermento de *T. inhamatum*, sobre las plántulas de haba el estudio presentó significancia ($p \leq 0.05$), sobre las variables: peso de plántula, longitud de vaina, número de vaina, peso de vaina, número de grano, peso de grano verde y peso de grano seco. Continuando con estudios sobre la optimización de los fermentos fúngicos, Espinal y colaboradores (2010) mencionan que siguiendo estrategias físicas, químicas y biológicas sobre los medios de cultivo con *T. inhamatum* cepa Bol 12 QD dirigidas a incrementar su capacidad biocontroladora sobre el fitopatógeno *Botrytis cinerea*, causante de la enfermedad mancha chocolate en cultivos de haba (*Vicia faba* L.). El porcentaje de inhibición de *B. cinerea* obtenido con el fermento testigo de *T. inhamatum* Bol 12 QD fue del 40%. El crecimiento de *B. cinerea* fue inhibido en el 53% cuando se utilizó fermento obtenido con filtro de luz violeta, cuando se realizó el co-cultivo de *T. inhamatum* Bol 12 QD con *B. cinerea* (10^4 esporas/mL) contra *B. cinerea* la inhibición obtenida fue del 34%.

En el presente estudio, se puede indicar que la alta actividad de estos filtrados crudos fúngicos de *Trichoderma harzianum* cepa BOL 12QD pueden comprender una serie de compuestos activos entre enzimas y metabolitos secundarios. Por tal razón se realizó determinaciones enzimáticas proteolíticas y celulolíticas, mediante las cuales se determinó que la mayor actividad proteolítica fue 2,526.04 UI/mL (42,100.6 nkat) en el filtrado fúngico incubado en condiciones de luz violeta y agitación. La actividad proteolítica del filtrado fúngico incubado en condiciones de luz violeta, agitación y co-cultivo con *Fusarium* fue de 2,272.67UI/mL (37.877,8 nkat), y cuando se emplea el filtrado fúngico incubado en condiciones de luz violeta, agitación y co-cultivo con *Colletotrichum* la actividad proteolítica fue de 2,211.78 UI/mL (36 863 nkat). Para el caso de la actividad celulolítica la mayor actividad se presentó en el filtrado

fúngico incubado en condiciones de luz violeta y agitación fue de 190.25 UI/ml, seguido del filtrado fúngico cultivado en condiciones de luz violeta, agitación y co-cultivo con *Colletotrichum* fue de 102.48 UI/ml y por último la actividad celulolítica en el filtrado fúngico incubado en condiciones de luz violeta, agitación y co-cultivo con *Fusarium* fue de 69.26 UI/ml. El *T. harzianum* utiliza la antibiosis como mecanismo de ataque, el cual consiste en la producción de metabolitos secundarios con capacidad antibiótica (i. e. compuestos solubles en agua, volátiles y peptaboloideos), implicados en mecanismos de supervivencia del hongo (Vinale, y colaboradores, 2008). Adicionalmente, el hongo tiene la capacidad de producir compuestos inhibidores de crecimiento y es fuente de enzimas degradadoras de pared celular, tales como celulasas, quitinasas, proteasas, entre otras, lo que hacen de este microorganismo sea un buen biocontrolador y actúe como biopesticida o biofertilizante.

Determinación genotóxica y fitotóxica.

Para la evaluación del efecto genotóxico y fitotóxico se realizaron una serie de análisis con los extractos orgánicos de ajo, tanto que para el caso de los filtrados crudos bacterianos de *B. subtilis* se evaluó el efecto genotóxico y fitotóxico con el filtrado que fue incubado en medio caldo papa suplementado con urea e incubado por 36 horas y para el filtrado crudo fúngico de *Trichoderma harzianum* se realizaron los estudios con el filtrado incubado en condiciones de luz violeta y agitación (120 rpm) siendo estas condiciones óptimas para la inhibir a los fitopatógenos.

Para la determinación genotóxica mediante el ensayo de test de Ames, se utilizó como controles positivos para la cepa TA 982-Nitrofluoreno 20 µg/placa el cual presentó un índice de mutagenicidad de 84,45 y el TA 100 como controles positivos se empleó el 2-Aminofluoreno (AF) 50 µg/ placa el cual presentó un índice de mutagenicidad de 14,83. Se considera a un compuesto mutagénico si su índice de mutagenicidad es mayor o igual a 2. Como podemos observar en la tabla 4, tanto el extracto orgánico de ajo, el filtrado crudo bacteriano y el filtrado crudo fúngico son considerados compuestos no mutagénicos.

Tabla 4. Ensayo de test de Ames. Cepa TA 98 y TA 100, de los compuestos extracto de ajo en vinagre de manzana, filtrado crudo bacteriano de *Bacillus subtilis* y filtrado crudo fúngico de *Trichoderma harzianum*.

Cepa TA 98					
Muestras	Dosis	RI ± DS	IM Total	RI ± DS	IM Total
A2	480 µL/placa	22,83 ± 1,26	1,18	54,17 ± 4,06	0,93
B2	30 µL /placa	23,667 ± 1,84	1,23	47,83 ± 4,08	0,82
VM	10 µL /placa	21,33 ± 2,78	1,15	63,17 ± 8,90	1,2
VVT	16 µL /placa	20,66 ± 2,54	1.11	72,83 ± 6,10	1.4
VU	16 µL /placa	18,50± 4,3	1.00	70,67 ± 6,70	1.4
Control positivo	50 µg/ placa	1435,66 ± 172,00	84,45	796,00 ± 172,00	14,83
Control negativo		18,5 ± 2,73		52,00 ± 6,03	

A2 = Filtrado crudo fúngico de la cepa Bol 12 QD en condiciones de luz violeta y agitación. B2 = Filtrado crudo bacteriano de *Bacillus subtilis* en medio caldo papa suplementado con urea. VM= Extracto de ajo en vinagre de manzana. VVT= Extracto de ajo en vinagre de vino tinto. VU= Extracto de ajo en vinagre de uva. IR= Numero de colonias revertientes inducidas. IM= Índice de mutagenicidad. DS= Desviación estándar.

Como puntos finales para la evaluación de los efectos fitotóxico, se determinó la inhibición en la germinación, la inhibición en la elongación de la radícula y del hipocotilo de las semillas de lechuga (*Lactuca sativa L*). Es importante destacar que durante el periodo de germinación y los primeros días de desarrollo de la plántula ocurren numerosos procesos fisiológicos en los que la presencia de una sustancia tóxica puede interferir alterando la supervivencia y el desarrollo normal de la planta, siendo por lo tanto una etapa de gran sensibilidad frente a factores externos adversos (Sobrero & Ronco, 2004). Por otra parte, muchas de las otras reacciones y procesos involucrados son generales para la gran mayoría de las semillas, por lo que la respuesta de esta especie y los datos obtenidos a partir de la aplicación de esta prueba son en gran medida representativos de los efectos en la semilla o plántulas en general. A diferencia de la prueba tradicional de germinación de semillas, la evaluación del efecto de elongación de la radícula y del hipocotilo de las plántulas permite ponderar el efecto tóxico de los compuestos en estudio. Si en los resultados se llegan a inhibir completamente los procesos de elongación de la radícula o hipocotilo, constituye indicadores subletales muy sensibles para la evaluación de efectos biológicos en vegetales, aportando información complementaria al efecto en la germinación. Este ensayo es aplicado para la evaluación de la toxicidad de

compuestos puros solubles. Además, este bioensayo de toxicidad ha sido recomendado y aplicado por diferentes organismos de protección ambiental y la evaluación del efecto fitotóxico de plaguicidas sobre especies no blanco, necesarias para el registro de estos compuestos. En la tabla 5 podemos observar el porcentaje de germinación, el porcentaje de inhibición de crecimiento radicular y hipocotilo. De acuerdo a los resultados se indica que el porcentaje de germinación fue del 100 % en filtrado crudo fúngico y el extracto de ajo en vinagre de vino tinto, pero en los otros tratamientos este porcentaje disminuye siendo el extracto de ajo en vinagre de manzana el que reportó el 67 % de germinación al igual que el porcentaje de inhibición del crecimiento radicular fue del 50 % siendo el extracto de ajo en vinagre de manzana catalogado como subletal, en cambio el extracto de ajo en vinagre de uva presentó un porcentaje de inhibición del crecimiento radicular del 82 % y el porcentaje de inhibición del hipocotilo fue del 51 %, considerando a este tratamiento como un compuesto subletal esto se puede deberse a que el compuesto puede haber ocasionado un retardo de la elongación o una inhibición en el crecimiento.

Tabla 5. Ensayo de lechuga (*Lactuca sativa L*), de los compuestos orgánicos de ajo, filtrado crudo bacteriano de *Bacillus subtilis* y filtrado crudo fúngico de *Trichoderma harzianum*.

Código	Dosis	% germinación	Prom. + DS	% ICR	Prom. + DS	% ICH
A2	300 µL/mL	100	4,31± 0,65	0	0,9±0,19	0
B2	30 µL/mL	87	3,50± 0,42	18	0,78± 0,02	13
VM	10 µL/mL	67	2,14± 0,54	50	0,69±0,08	23
VVT	10 µL/mL	100	3,67 ± 0,65	14	0,85 ± 0,29	6
VU	10 µL/mL	80	0,76 ± 0,09	82	0,44± 0,09	51
Control		93	4,25±0,68	0	0,9±0,44	0

A2 = Filtrado crudo fúngico de la cepa Bol 12 QD en condiciones de luz violeta y agitación. B2 = Filtrado crudo bacteriano de *Bacillus subtilis* en medio caldo papa suplementado con urea. VM= Extracto de ajo en vinagre de manzana. VVT= Extracto de ajo en vinagre de vino tinto. VU= Extracto de ajo en vinagre de uva. ICR=Inhibición del crecimiento radicular. ICH=Inhibición del crecimiento hipocotilo.

VIII. Conclusiones

Los fitopatógenos fúngicos identificados de las muestras de mango y hojas con síntomas de enfermedad fueron *Colletotrichum sp.*, *Fusarium verticillioides* y *Neopestalotiopsis spp.*

El porcentaje de inhibición de los tres fitopatógenos en estudio fue del 100 % cuando se empleó los extractos de ajo en vinagre de manzana, extractos de ajo en vinagre de vino tinto y extractos de ajo en vinagre de uva. De los tres extractos ninguno presentó efecto mutagénico, pero solo el extracto de ajo en vino tinto indica no ser un compuesto fitotóxico y no así los otros dos extractos.

La inhibición del crecimiento de los tres fitopatógenos fue del 100% cuando se empleó los filtrados crudos bacterianos de *Bacillus subtilis*, sin embargo se considera que el empleo del filtrado crudo bacteriano incubado en medio caldo papa suplementado con urea e incubado por 36 horas es un compuesto fácil de elaborar y de menor tiempo de incubación en comparación con los filtrados incubados en medio caldo papa suplementado e incubado por 54 horas ó el medio papa sin ninguna modificación e incubado por 144 horas. Con respecto al efecto mutagénico y fitotóxico del filtrado crudo bacteriano incubado en medio papa suplementado con urea, éste es considerado un compuesto no mutagénico ni fitotóxico.

El porcentaje de inhibición de los tres fitopatógenos fue del 100% cuando se utilizó el filtrado fúngico crudo de *Trichoderma harzianum*, obtenido en condiciones de incubación con luz violeta y agitación 120 rpm. Con respecto a los ensayos de genotoxicidad y fitotoxicidad de éste filtrado se determinó que no es mutagénico ni fitotóxico siendo un compuesto amigable para el medio ambiente.

Se acepta la hipótesis de investigación, ya que los compuestos en estudio inhibieron el crecimiento de los fitopatógenos fúngicos en un porcentaje mayor al 60 %.

IX. Bibliografía.

- Adaskaveg, J., & Hartin, R. (1997). Characterization of *Colletotrichum acutatum* isolates causing anthracnose of almond and peach in California. *Phytopathology* , 979 - 987.
- Agrios, G. (2005). Plant pathology. *Elsevier Academic Press* .
- Ali , S., Hameed , S., Imran , A., Iqbal , M., & Lazarovits , G. (2014). Genetic, physiological and biochemical characterization of *Bacillus* sp.strain RMB7 exhibiting plant growth promoting and broad spectrum antifungal activities. *Microb Cell Fact.* , 144.
- Almandoz, J., Pico, V., Pérez, L., Rodríguez, F., & Parra, J. (2000). Efectividad de nuevos fungicidas para el control de *Alternaria solani* Ellis y Martin en el cultivo de la papa (*Solanum tuberosum* L.). *XIX Congreso de la Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP)* .
- Amagase, H., & Milner, J. (1993). Impact of various sources of garlic and their constituents on 7,12-dimethylbenz[a]anthracene binding to mammary cell DNA. *Carcinogenesis* , 1627–1631.
- Anderson, B., Hunt, J., Phillips, B., Nicely, P., Vlaming, V., de, Connor, V., y otros. (2003). Integrated assessment of the impacts of agricultural drainwater in the Salinas River (California, USA). *Environmental Pollution* , 523-532.
- Andrew J. F. Edmunds, M. A. (2010). Host Marking Pheromone (HMP) in the Mexican Fruit Fly *Anastrepha ludens*. *PUBMED* , 37-42.
- Ankri, S., & Mirelman, D. (1999). “Antimicrobial Properties of Allicin from Garlic”. *Microbes and Infection* , 125 - 129.
- Apaza, L. (2008). Optimización de parámetros físicos, químicos y biológicos del cultivo de *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD para una mejor producción de compuestos biológicamente activos contra *Botrytis cinerea*. *Tesis de Maestría en Ciencias Biológicas y Biomédicas. La Paz - Bolivia*.
- Artigas, J. (2003). El ajo: valiosa hortaliza como alimento y medicina. 85-91. Madrid: EDAF.
- Bailey, J., & Jeger, M. (1992). *Colletotrichum: Biology, pathology and control*. Wallingford UK : CAB International , 387.

- Bais , H., Weir, T., Perry, L., Gilroy , S., & Vivanco, J. (2006). The Role of Root Exudates in Rhizosphere Interactions with Plants and Other Organisms. *Annu Rev Plant Biol* , 233-266.
- Bautista, S., Barrera, N., Bravo, L., & Bermúdez, T. (2002). Antifungal activity of leaf and stem extracts from various plant species on the incidence of *Colletotrichum gloeosporioides* of papaya and mango fruits after storage. *Rev. Mex. Fitopatol.* , 8-12.
- Baysal , Ö., Caliskan , M., & Yesilova, Ö. (2008). An inhibitory effect of a new *Bacillus subtilis* strain (EU07) against *Fusarium oxysporum* f. sp. *radicis-lycopersici*. *Physiol. Mol. Plant Pathol* , 25–32.
- Block, E. (1985). Chemistry of garlic and onions. *Sci. Am* , 94–99.
- Bohg , A., & Ristow , H. (1986). DNA-supercoiling is affected in vitro by the peptide antibiotics tyrocidine and gramicidin. . *Eur J Biochem* , 587-591.
- Boller, E. F. (1992). Oviposition deterring pheromone of *Rhagoletis cerasi* : biological activity of 4 synthetic isomers and HMP discrimination of two host races as measured by an improved bioassay. *Entomology* , 113-119.
- Bushelman, S., Callen, J., Roth, D., & Cohen, L. (1995). Disseminated *Fusarium solani* infection. *Journal of the American Academy of Dermatology.* , 346-351.
- Chastagner, G., & Riley, K. (1990). Occurrence and control of benzimidazole and dicarboximide resistant *Botrytis* spp. on bulb crops in Western Washington and Oregon. *Acta Hort.* , 437-445.
- Cook , R., & Baker, K. (1983). The nature and practice of biological control of plant pathogens. . *The American Phytopathological Society* , 539.
- Cooke, D., Young, V., Birch, P., Toth, R., Gourlay, F., Day, J., y otros. (2003). Phenotypic and genotypic diversity of *Phytophthora infestans* populations in Scotland (1995-97). *Plant Pathology* , 181 - 192.
- Cowan, M. (1999). Plant products as antimicrobial agents. *Clin. Microbiol.* , 564 - 586.

- Crous , P., Summerell , B., & Swart, L. (2011). Fungal pathogens of Proteaceae. . *Persoonia* , 20–45.
- Edmunds AJ, A. M.-F. (2010). Host marking pheromone (HPM) in the Mexican fruit fly *Anastrepha ludens*. *PUBMED* , 37-42.
- Eduardo, G. (2014). Problemáticas del mango en la provincia Sud Yungas localidad Irupana - -La Plazuela. La Paz.
- Elmer, W. (2001). Fusarium diseases of asparagus. In: Summerell BA, Leslie JF, Backhouse D, Bryden WL, Burgess LW (eds) Paul E. APS Press St Paul MN. *Nelson Memorial Symposium* , 248-262.
- Espinal, C. (2009). Evaluación de la actividad Biocontroladora *Trichoderma inhamatum* (cepa BOL 12 QD), frente a la *Botrytis fabae* causante de la mancha de chocolate en cultivos de Haba (*Vicia faba*) La Paz Bolivia.
- FAO, C. d. (Noviembre de 2002). Código Internacional de conducta para la distribución y utilización de plaguicidas (Versión revisada). *Depositos de documentos de la FAO* .
- Freeman, S., Katan, T., & Shabi, E. (1998). Characterization of *Colletotrichum* species responsible for anthracnose disease of various fruits. *Plant Dis* , 596 - 605.
- García, N., Mamani, M., Chávez, G., & Álvarez, M. (2016). Evaluation of the enzymatic activity of *Trichoderma inhamatum* (BOL-12QD) as possible biocontroller. *Journal of the Selva Andina Research Society* , 20-32.
- Ghodrati , H., Mahmood, S., Hossein, G., Ahmadian, S., & Vahedi , F. (2008). Antiproliferative activity of chloroformic extract of Persian Shallot, *Allium hirtifolium*, on tumor cell lines. *Journal cytotechnology* , 179 - 185.
- Guerrero , E., Solís , F., Hernández, A., Flores, V., Sandoval, D., & Jasso, C. (2007). Actividad biológica in vitro de extractos de *Fluorensia cernua* D.C. en patógenos de postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. *Revista Mexicana de Fitopatología* , 48-53.

- Gupta, N., & Porter, T. (2001). Garlic and garlic-derived compounds inhibit human squalene monooxygenase. *The Journal of Nutrition* , 1662 -1667.
- Guzman, M. (1977). Micología medica. *Instituto Nacional de Salud* , 386.
- Hermosa MR, G. I.-M.-A. (2000). Molecular characterization and identification of biocontrol isolates of *Trichoderma* spp. *Appl Environ Microbiol* , 1890-1898.
- Hernández, A., Bautista, B., & Velázquez del valle, M. (2007). Prospectiva de extractos vegetales para controlar enfermedades postcosecha hortofrutícolas. *Rev. Fitotecnia Mex.* , 119-123.
- Howell , R. (2003). Mechanism employed by *Trichoderma* species in the biological control of plant diseases: the history an evolution of current concepts. *Plant Disease* , 4 – 10.
- Hu , Q., Xu, J., Song , P., Song, J., & Chen , W. (2008). Isolation and identification of a potential biocontrol agent *Bacillus subtilis* QM3 from Qinghai yak dung in China. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* , 2451-2458.
- IETA. (2012). Balance a la ultima Gestion IETA. *Revista Varianza* .
- Imai, J., Ide, N., Nagae, S., Moriguchi, T., Matsuura, H., & Itakura, Y. (1994). Antioxidant and radical scavenging effects of aged garlic extract and its constituents. *Planta Med* , 417–420.
- Ismail , A., Cirvilleri , G., & Polizzi , G. (2013). Characterisation and pathogenicity of *Pestalotiopsis uvicola* and *Pestalotiopsis clavispora* causing grey leaf spot of mango (*Mangifera indica* L.) in Italy. . *European Journal of Plant Pathology.* , 619–625.
- J.Katerine Valderrama, M. S. (2005). Mortalidad de larvas de *Anastrepha fraterculus* (Wiedemann) (Diptera: Tephritidae) en frutos de feijoa (*Acca sellowiana* Burret) sometidos a un tratamiento cuarentenario de frio. *Revista Colombia de Entomologia* , 171-176.
- Jeewon, E., Liew , & Hyde, K. (2004). Phylogenetic evaluation of species nomenclature of *Pestalotiopsis* in relation to host association. *Fungal Diversity* , 39-55.

- Kim, P., Ryu, J., Kim, Y., & ChI, Y. (2010). Production of biosurfactant lipopeptides iturin A, Fengycin, and Surfactin A from *Bacillus subtilis* CMB32 for control of *Colletotrichum gloeosporioides*. *J. Microbiol. Biotechnol* , 138-145.
- Lanzotti, V. (2006). The analysis of onion and garlic. . *Journal of Chromatography A*, 1112, , 3 -22.
- Lardener, R., Jonson, P., Plumier, K., & Pearson, M. (1999). Morphological and molecular analysis of *Colletotrichum acutatum* sensu lato. *Mycological Research* , 275 - 285.
- Lawson L. D. (1996). “The Composition and Chemistry of Garlic Cloves and Processed Garlic” . *the Science and Therapeutic Application* , 37–108.
- Lawson, L., & Wang, Z. (2005). Allicin and allicin-derived garlic compounds increase breath acetone through allyl methyl sulfide: use in measuring allicin bioavailability. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* , 1974 - 1983.
- Lawson, L., Wood, S., & Hughes, B. (1991). HPLC analysis of allicin and other thiosulfinates in garlic clove homogenates. *Planta Médica* , 263 - 270.
- Leslie , J., & Summerell , B. (2006). The *Fusarium* laboratory manual. *Blackwell Pub Pro IA* .
- López, A., López, B., Vázquez , S., Rodríguez, M., Mendoza, E., & Padrón, C. (2005). Inhibition of mycelial growth of *Fusarium oxysporum* Schlechtend. f. sp. *lycopersici* (Sacc.) Snyder and Hansen, *Rhizoctonia solani* Kühn, and *Verticillium dahliae* Kleb. by aqueous plant extracts. *Revista Mexicana Fitopatología* , 183-190.
- Lopez, V., Carbonell, T., & Gomez, S. (2002). Degradation of insect cuticle by *Paecilomyces farinosus* proteases. *Mycological Progress* , 249-256.
- M. Aluja, F. D. (2009). full details of the field trials have been reported in M. Aluja, F. Diaz Fleischer, E.F.Boller, J. Hurter. *entomol* , 102.
- M. Aluja, F. D. (2000). *Patente n° US 6555120*. USA.
- Manoj , M., Indira , D., & Donald , F. (1988). Gerson Protease production by *Bacillus subtilis* in oxygen controlled, glucose fed-batch fermentation. *Appl Microbiol Biotechnol.* , 404-408.

MDRyT, M. d. (septiembre de 2010). Plan estratégico institucional 2011-2015. Bolivia.

Miizumoto, S., Hirai, M., & Shoda, M. (2006). Production of lipopeptide antibiotic iturin A using soybean curd residue cultivated with *Bacillus subtilis* in solid-state fermentation. *Appl Microbiol Biotechnology* , 869 – 875.

Miron , T., Listowsky, I., & Wilchek, M. (2010). Reaction mechanisms of allicin and allyl-mixed disulfides with proteins and small thiol molecules. *European Journal of Medicinal Chemistry* , 1912 - 1918.

Miron, T., Listowsky, I., & Wilchek, M. (2010.). Reaction mechanisms of allicin and allyl-mixed disulfides with proteins and small thiol molecules. *European Journal of Medicinal Chemistry* . , 1912-1918.

Miron, T., Shin, I., Feigenblat, G., Weiner, L., Mirelman, D., Wilcheck, M., y otros. (2002). “A Spectrophotometric Assay for Allicin, and Alliinase (Alliin lyase) with a Chromogenic Thiol : Reaction of 4-mercaptopyridine with Thiosulfonates”. *Analytical Biochemistry* , 76-83.

Mordue , J. (1980). *Pestalotiopsis mangiferae*. CMI descriptions of pathogenic fungi and bacteria. *Commonwealth Mycological Institute*.

Mulet , J. (28 de Marzo de 2011). *Los productos naturales*. Recuperado el 21 de Marzo de 2017, de <http://www.losproductosnaturales.com/>

Nagórska , K., Bikowski , M., & Obuchowski, M. (2007). Multicellular behaviour and production of a wide variety of toxic substances support usage of *Bacillus subtilis* as a powerful biocontrol agent. . *Acta Biochim.* , 495–508.

Ocamb , C., Juzwik , J., & Martin , F. (2002). *Fusarium* spp and *Pinus strobus* seedlings root disease pathogens and taxa associated with seed. *New For* , 67.

Ogara, E. A., Hili, D. J., & Maslin, D. J. (2000). “Activities of Garlic oil, Garlic Powder, and their Diallyl Constituents against *Helicobacter pylori*“. *Applied and Environmental Microbiology* , 2269 - 2273.

- Orozco, S., Medina, U., J.J. Velazquez, M., J. Orozco, R., E. Tapia, R., & Toledo, M. (2007). Control químico de antracnosis (*Colletotrichum acutatum*) con aspersiones del fungicida Trifloxistrobin en limón mexicano. *Memoria de resúmenes 53ava reunión anual de la ISTH. Morelia, Michoacan, Mexico.* , 125.
- Papavizas , G. (1985). Trichoderma and Gliocladium: biology, ecology, and potential for biocontrol. *Annu. Rev. Phytopathol* , 23-54.
- Puño Ramon, T. E. (2011). Evaluación de la capacidad biocontroladora de metabólicos de *Trichoderma inhamatum* Bol12. *Journal of the Selva Andina Research Society. Bolivia.* , 26-33.
- Rabinkov, A., Zhu, X. Z., Grafi, G., Galili, G., & Mirelman, D. (1995). “Alliin lyase (alliinase) from Garlic (*Allium sativum*) Biochemical Characterization and cDNA Cloning”. *Applied Biochemistry and Biotechnology* , 149 - 171.
- Rajamanickam , S., Nakkeeran , S., & Sethuraman , K. (2016). Phytochemical Investigation of Medicinal Plant Showing Antifungal Activity Against Chilli (*Capsicum annum L.*) Anthracnose Caused by *Colletotrichum capsici* (Syd.) Butler and Bisby. *Indian Journals* , 2926 - 2932.
- Ramírez, L., & Marin , C. (2009). Metodologías para evaluar in vitro la actividad antibacteriana de compuestos de origen vegetal. *Scientia et Technica* , 263-268.
- Ren , H., Li , G., & Qi , X. (2013). Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing twig blight disease of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. & Zucc) in China. *European Journal of Plant Pathology.* , 451–461.
- Ren H.Y., Li G., Qi X.J. Identification and characterization of *Pestalotiopsis* spp. causing twig blight disease of bayberry (*Myrica rubra* Sieb. & Zucc) in China. *European Journal of Plant Pathology.* 2013. (s.f.). 451–461.
- Romero, D. C. (2014). Identificación molecular de la expresión de genes relacionados a la formación de biopelículas en condiciones de cultivo estresantes en las cepas *Propionibacterium*spp. y *Cándida maltosa*, Tesis de Maestría. UMSA. La Paz Bolivia. La Paz.

- Romero, M., Varo, R., Sánchez, M., & Trapero, A. (2009). Mancha Foliar de Pestalotiopsis. *Grupo de Patología Agroforestal de la Universidad de Córdoba* .
- Sanders, G., Korsten, L., & Wehner, F. (2000). Survey of Fungicide Sensitivity in *Colletotrichum gloeosporioides* from different avocado and mango production areas in South Africa. *Revisita Europea de fitopatología* . , 745 - 752.
- Santoyo , G., Orozco-Mosqueda , M., & Govindappa, M. (2012). Mechanisms of biocontrol and plant growth-promoting activity in soil bacterial species of *Bacillus* and *Pseudomonas*. *Biocontrol Sci. Techn.* , 855–872.
- Schocha, C. S. (2012). Nuclear ribosomal internal transcribed spacer (ITS) region as a universal DNA barcode marker for Fungi. *PNAS* , 6241–6246.
- Sobrero, M., & Ronco, A. (2004). Ensayos de toxicidad aguda con semillas de lechuga *Lactuca sativa* L. *IDRC, IMTA* , 55 - 68.
- Sutton, B. (1992). The genus *Glomerella* and its Anamorph *Colletotrichum*. *Biology, Pathology & Control Baile J.A., Jeger M. J. CaBi. UK.* , 1 - 27.
- Tekalign , K., Vasudev , T., & Parth , T. (2016). *Bacillus* species (BT42) isolated from *Coffea arabica* L. rhizosphere antagonizes *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* and also exhibits multiple plant growth promoting activity. *BMC Microbiology* , 1-13.
- Travis, H. P. (2000). Identification of *Aspergillus* Species Using Internal Transcribed. *Journal of Clinical Microbiology* , 1510–1515.
- Verástegui, M., Sánchez, C., Heredia, N., & García, J. (1996). Antimicrobial activity of extracts of three major plants from the Chihuahua desert. . *Journal of Ethnopharmacology* , 175-177.
- Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E., Marra, R., Woo, S., & Lorito, M. (2008). *Trichoderma* plant pathogen interactions. *Soil Biology & Biochemistry* , 1 - 10.
- Wells , H., Bell , D., & Jaworski , C. (1972). Efficacy of *Trichoderma harzianum* as a biocontrol for *Sclerotium rolfsii*. *Phytopathology* , 442-447.

Whalen, M., Wilson, S., Gleghorn, C., & Logana, B. (2003). Brief exposure to triphenyltin produces irreversible inhibition of the cytotoxic function of human natural killer cells. . *Environmental Research* 92, Environmental Research 92.

White, D. (1999). Compendium of corn diseases, 3rd edn. *APS Press St.*

Wilson, C., Solar, J., El Ghaouth, A., & Wisniewski, M. (1997). Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Dis*, 204-210.

Yang, Z., Wei, H., Cao, W., Zhao, Y., & Wang, W. (2008). Antimicrobial activity of vinegar and garlic extracts. 69 - 73.

Zhang, Y., Maharachchikumbura, S., & Wei, J. (2012). *Pestalotiopsis camelliae*, a new species associated with grey blight of *Camellia japonica* in China. *Sydowia*, 335–344.

X. Anexos.

Anexo 1

Medio de cultivo PDA con cloranfenicol.

Pesar		
200 g de Papa	Pelar la papa y llevarlo a ebullición, luego filtrarlo.	Enrasar el filtrado de papa para un volumen de 1 litro, ajustar el pH a 5,6. Autoclavar a 121°C durante 15 min. Enfriar y luego añadir cloranfenicol 0.4 g/L.
20 g de glucosa		
20 g de agar		

Anexo 2

Medio Agar Agua

Pesar	Volumen	
15 g de agar-agar	1 litro de agua destilada	Autoclavar a 121°C durante 15 min. Y luego plaquear.

Anexo 3

Colorante vegetal.

Volumen	Pesar	
Ácido acético 10 mL	0.5 g de colorante vegetal azul brillante o rojo fresa	Añadir el colorante vegetal a la solución final.
glicerina 15 mL		
agua destilada 75 mL		

Anexo 4

Preparación del Mix.

Taq polimerasa	0.03 U μ L ⁻¹
Buffer	1x
De cada primer	0.8 μ M
DNTPs	0.2 mM
MgCl ₂	1.5 mM

Anexo 5

Medio de cultivo PDA

Pesar

200 g de Papa	Pelar la papa y llevarlo a ebullición, luego filtrarlo.	Enrasar el filtrado de papa para un volumen de 1 litro, ajustar el pH a 5,6. Autoclavar a 121°C durante 15 min. Enfriar y plaquear.
20 g de glucosa		
20 g de agar		

Anexo 6

Medio de cultivo líquido modificado Luria Bertani.

Pesar

Peptona bacteriológica 8g	Para un volumen final de 800
Extracto de carne 8g	mL, autoclavar a 121 °C durante
Extracto de levadura 4g	15 min
NaCl 4g	

Anexo 7

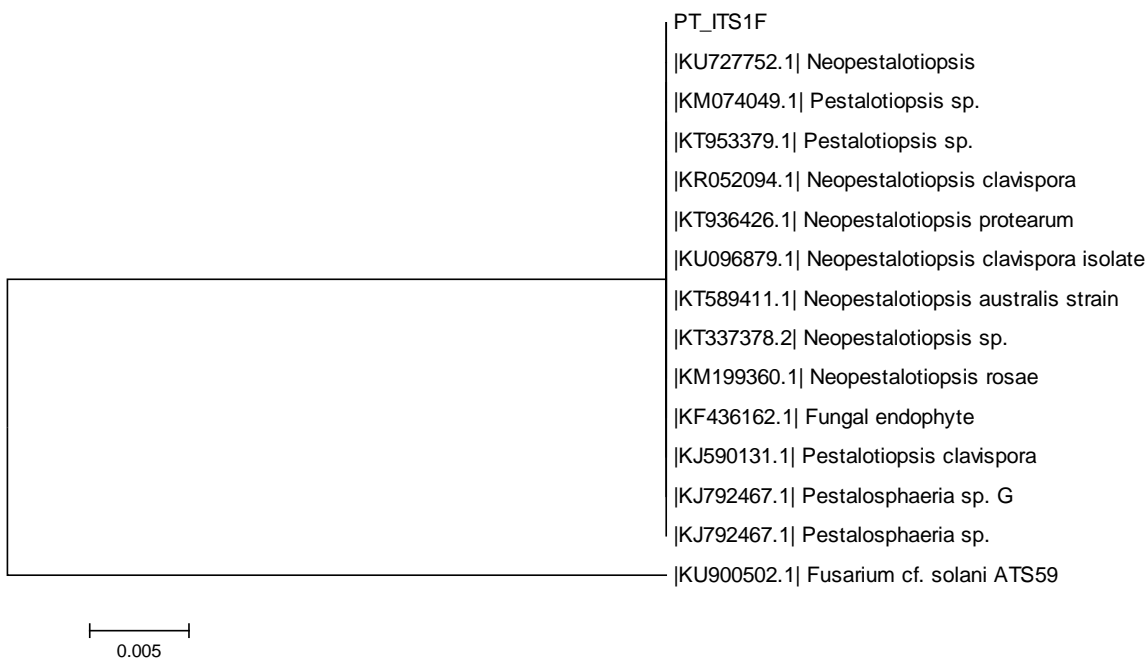
Medio de cultivo caldo papa dextrosa.

Pesar

200 g de Papa	Pelar la papa y llevarlo a ebullición, luego filtrarlo.	Enrasar el filtrado de papa para un volumen de 1 litro, ajustar el pH a 5,6. Autoclavar a 121°C durante 15 min.
5 g de glucosa		

Anexo 8

Análisis filogenético del gen ITS de la secuencia Pestalotia y secuencias extraídas del BLAST, mediante el método Neighbor Joining.



Anexo 9

Datos estadísticos del extracto de ajo en vinagre de manzana como solvente a una concentración a 1.4 mg /mL del extracto frente a *Neopestalotiopsis spp.*

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
2.820	4	10	.084

La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene indica que se cumple el supuesto homogeneidad entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad antifúngica frente al *Neopestalotiopsis spp.* (Estadístico: 2.820; df1:4 y df2:10; $p>0.05$).

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	575.671	4	143.918	1.124	.398
Dentro de grupos	1280.387	10	128.039		
Total	1856.057	14			

El ANOVA unifactorial indica que no hay diferencia significativa en los porcentajes de inhibición, de acuerdo con los tratamientos empleados frente al *Neopestalotiopsis spp.* (F: 1.124; $p>0.05$)

Anexo 10

Datos estadísticos del extracto de ajo en vinagre de vino tinto como solvente a una concentración a 1.4 mg /mL del extracto frente a *Neopestalotiopsis spp.*

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
4.414	4	10	.026

La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene indica que no se cumple el supuesto homogeneidad entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad antifúngica frente al *Neopestalotiopsis spp.* (Estadístico: 4.414; df1:4 y df2:10; $p < 0.05$).

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	445.056	4	111.264	6.502	.008
Dentro de grupos	171.133	10	17.113		
Total	616.189	14			

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencia significativa en los porcentajes de inhibición, de acuerdo con los tratamientos empleados frente al *Neopestalotiopsis spp.* (F: 6.502; $p > 0.05$)

Comparaciones múltiples

(I) Vino	(J) Vino	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Maceración día 1	Maceración día 2	-.233	3.527	1.000	-26.46	25.99
	Maceración día 3	-2.233	.968	.341	-7.44	2.98
	Maceración día 4	5.500	3.045	.531	-16.89	27.89
	Maceración día 5	12.767	2.537	.102	-5.53	31.06
Maceración día 2	Maceración día 1	.233	3.527	1.000	-25.99	26.46
	Maceración día 3	-2.000	3.606	.972	-26.51	22.51
	Maceración día 4	5.733	4.619	.735	-15.04	26.50
	Maceración día 5	13.000	4.301	.172	-7.20	33.20
Maceración día 3	Maceración día 1	2.233	.968	.341	-2.98	7.44
	Maceración día 2	2.000	3.606	.972	-22.51	26.51
	Maceración día 4	7.733	3.136	.337	-12.83	28.29
	Maceración día 5	15.000	2.646	.061	-1.40	31.40
Maceración día 4	Maceración día 1	-5.500	3.045	.531	-27.89	16.89
	Maceración día 2	-5.733	4.619	.735	-26.50	15.04
	Maceración día 3	-7.733	3.136	.337	-28.29	12.83
	Maceración día 5	7.267	3.916	.457	-10.45	24.99
Maceración día 5	Maceración día 1	-12.767	2.537	.102	-31.06	5.53
	Maceración día 2	-13.000	4.301	.172	-33.20	7.20
	Maceración día 3	-15.000	2.646	.061	-31.40	1.40
	Maceración día 4	-7.267	3.916	.457	-24.99	10.45

Anexo 11

Datos estadísticos del extracto de ajo en vinagre de uva como solvente a una concentración a 1.4 mg /mL del extracto frente a *Neopestalotiopsis spp.*

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1.038	4	10	.435

La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene indica que se cumple el supuesto homogeneidad entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad antifúngica frente al *Neopestalotiopsis spp.* (Estadístico: 1.038; df1:4 y df2:10: $p > 0.05$).

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	1667.803	4	416.951	4.101	.032
Dentro de grupos	1016.587	10	101.659		
Total	2684.389	14			

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencia significativa en los porcentajes de inhibición, de acuerdo con los tratamientos empleados frente al *Neopestalotiopsis spp.* (F: 4.101; $p < 0.05$)

Comparaciones múltiples

(I) Uva	(J) Uva	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Maceración día 1	Maceración día 2	7.233	8.232	.898	-19.86	34.33
	Maceración día 3	-.667	8.232	1.000	-27.76	26.43
	Maceración día 4	-21.533	8.232	.140	-48.63	5.56
	Maceración día 5	-14.667	8.232	.433	-41.76	12.43
Maceración día 2	Maceración día 1	-7.233	8.232	.898	-34.33	19.86
	Maceración día 3	-7.900	8.232	.867	-34.99	19.19
	Maceración día 4	-28.767*	8.232	.036	-55.86	-1.67
	Maceración día 5	-21.900	8.232	.131	-48.99	5.19
Maceración día 3	Maceración día 1	.667	8.232	1.000	-26.43	27.76
	Maceración día 2	7.900	8.232	.867	-19.19	34.99
	Maceración día 4	-20.867	8.232	.158	-47.96	6.23
	Maceración día 5	-14.000	8.232	.475	-41.09	13.09
Maceración día 4	Maceración día 1	21.533	8.232	.140	-5.56	48.63
	Maceración día 2	28.767*	8.232	.036	1.67	55.86
	Maceración día 3	20.867	8.232	.158	-6.23	47.96
	Maceración día 5	6.867	8.232	.914	-20.23	33.96
Maceración día 5	Maceración día 1	14.667	8.232	.433	-12.43	41.76
	Maceración día 2	21.900	8.232	.131	-5.19	48.99
	Maceración día 3	14.000	8.232	.475	-13.09	41.09
	Maceración día 4	-6.867	8.232	.914	-33.96	20.23

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 12

Comparación múltiple del porcentaje de inhibición frente a la *Neopetalotiopsis spp.*
 Concentración de Ajo = 1.75 mg /mL de medio de cultivo.

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Antracol	Ram Caf	-11.667*	1.541	.012	-19.46	-3.88
	Coctel químico	-27.900	10.946	.424	-122.29	66.49
	Extracto de ajo en vinagre de manzana	-119.000*	1.000	.000	-127.79	-110.21
	Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	-119.000*	1.000	.000	-127.79	-110.21
	Extracto de ajo en vinagre de uva	-119.000*	1.000	.000	-127.79	-110.21
	Vinagre	-19.033*	1.001	.011	-27.81	-10.26
Ram Caf	Antracol	11.667*	1.541	.012	3.88	19.46
	Coctel químico	-16.233	10.963	.753	-110.10	77.63
	Extracto de ajo en vinagre de manzana	-107.333*	1.172	.000	-117.64	-97.02
	Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	-107.333*	1.172	.000	-117.64	-97.02
	Extracto de ajo en vinagre de uva	-107.333*	1.172	.000	-117.64	-97.02
	Vinagre	-7.367	1.173	.095	-17.66	2.93
Coctel químico	Antracol	27.900	10.946	.424	-66.49	122.29
	Ram Caf	16.233	10.963	.753	-77.63	110.10
	Extracto de ajo en vinagre de manzana	-91.100	10.900	.055	-186.94	4.74
	Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	-91.100	10.900	.055	-186.94	4.74
	Extracto de ajo en vinagre de uva	-91.100	10.900	.055	-186.94	4.74
	Vinagre	8.867	10.900	.960	-86.97	104.71
Extracto de ajo en vinagre de manzana	Antracol	119.000*	1.000	.000	110.21	127.79
	Ram Caf	107.333*	1.172	.000	97.02	117.64
	Coctel químico	91.100	10.900	.055	-4.74	186.94
	Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	.000	.000	.	.00	.00
	Extracto de ajo en vinagre de uva	.000	.000	.	.00	.00
	Vinagre	99.967*	.033	.000	99.67	100.26
Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	Antracol	119.000*	1.000	.000	110.21	127.79
	Ram Caf	107.333*	1.172	.000	97.02	117.64
	Coctel químico	91.100	10.900	.055	-4.74	186.94
	Extracto de ajo en vinagre de manzana	.000	.000	.	.00	.00
	Extracto de ajo en vinagre de uva	.000	.000	.	.00	.00
	Vinagre	99.967*	.033	.000	99.67	100.26
Extracto de ajo en vinagre de uva	Antracol	119.000*	1.000	.000	110.21	127.79
	Ram Caf	107.333*	1.172	.000	97.02	117.64
	Coctel químico	91.100	10.900	.055	-4.74	186.94
	Extracto de ajo en vinagre de manzana	.000	.000	.	.00	.00
	Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	.000	.000	.	.00	.00
	Vinagre	99.967*	.033	.000	99.67	100.26
Vinagre	Antracol	19.033*	1.001	.011	10.26	27.81
	Ram Caf	7.367	1.173	.095	-2.93	17.66
	Coctel químico	-8.867	10.900	.960	-104.71	86.97
	Extracto de ajo en vinagre de manzana	-99.967*	.033	.000	-100.26	-99.67
	Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	-99.967*	.033	.000	-100.26	-99.67
	Extracto de ajo en vinagre de uva	-99.967*	.033	.000	-100.26	-99.67

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 13

Datos estadísticos del extracto de ajo en vinagre de manzana como solvente a diferentes tiempos de maceración a una concentración a 1.4 mg /mL del extracto frente a *Colletotrichum spp.*

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
6.116	4	10	.009

La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene indica que no se cumple el supuesto homogeneidad entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad antifúngica frente al *Colletotrichum spp.* (Estadístico: 6.116; df1:4 y df2:10; $p < .05$)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5604.863	4	1401.216	93.957	.000
Dentro de grupos	149.133	10	14.913		
Total	5753.996	14			

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencia significativa en los porcentajes de inhibición, de acuerdo con los tratamientos empleados frente al *Colletotrichum spp.* (F: 93.957; $p < 0.001$)

De acuerdo con las pruebas post-hoc de Games Howell, se observa que las diferencias significativas se encuentran entre grupos de maceración del primer día con el segundo, cuarto y quinto día de maceración ($p < 0.01$), como se puede observar en la gráfica de diagramas de cajas, siendo el primer día de maceración el tratamiento que presenta un 100 % de inhibición frente al *Colletotrichum spp.*

Comparaciones múltiples Games Howell

(I) Manzana (J) Manzana			Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
						Límite inferior	Límite superior
Maceración día 1	Maceración día 2		44.233*	4.182	.027	12.06	76.41
	Maceración día 3		8.000	2.082	.179	-8.02	24.02
	Maceración día 4		41.300*	1.453	.004	30.12	52.48
	Maceración día 5		43.667*	.961	.001	36.27	51.06
Maceración día 2	Maceración día 1		-44.233*	4.182	.027	-76.41	-12.06
	Maceración día 3		-36.233*	4.671	.019	-61.42	-11.05
	Maceración día 4		-2.933	4.427	.951	-30.34	24.48
	Maceración día 5		-.567	4.291	1.000	-30.18	29.05
Maceración día 3	Maceración día 1		-8.000	2.082	.179	-24.02	8.02
	Maceración día 2		36.233*	4.671	.019	11.05	61.42
	Maceración día 4		33.300*	2.538	.002	21.29	45.31
	Maceración día 5		35.667*	2.293	.003	22.92	48.42
Maceración día 4	Maceración día 1		-41.300*	1.453	.004	-52.48	-30.12
	Maceración día 2		2.933	4.427	.951	-24.48	30.34
	Maceración día 3		-33.300*	2.538	.002	-45.31	-21.29
	Maceración día 5		2.367	1.742	.682	-6.02	10.76

Maceración día 5	Maceración día 1	-43.667*	.961	.001	-51.06	-36.27
	Maceración día 2	.567	4.291	1.000	-29.05	30.18
	Maceración día 3	-35.667*	2.293	.003	-48.42	-22.92
	Maceración día 4	-2.367	1.742	.682	-10.76	6.02

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 14

Datos estadísticos del extracto de ajo en vinagre de vino tinto como solvente a una concentración a 1.4 mg /mL del extracto frente a *Colletotrichum spp.*

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1.239	4	10	.355

La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene indica que se cumple el supuesto homogeneidad entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad antifúngica frente al *Colletotrichum spp.* (Estadístico: 1.239; df1:4 y df2:10; p>.05)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4201.051	4	1050.263	104.158	.000
Dentro de grupos	100.833	10	10.083		
Total	4301.884	14			

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencia significativa en los porcentajes de inhibición, de acuerdo con los tratamientos empleados frente al *Colletotrichum spp.* (F: 104.158; p<0.001)

De acuerdo con las pruebas post-hoc de HSD Tukey, se observa que las diferencias significativas se encuentran entre grupos de maceración del primer día con el segundo, cuarto y quinto día de maceración ($p < 0.01$), como se puede observar en la gráfica de diagramas de cajas, siendo el primer día de maceración el tratamiento que presenta un 100 % de inhibición frente al *Colletotrichum spp.*

Comparaciones múltiples

HSD Tukey

(I) Vino	(J) Vino	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
1	Maceración día 2	37.400*	2.593	.000	28.87	45.93
	Maceración día 3	-4.200	2.593	.518	-12.73	4.33
	Maceración día 4	-1.200	2.593	.989	-9.73	7.33
	Maceración día 5	25.267*	2.593	.000	16.73	33.80
2	Maceración día 1	-37.400*	2.593	.000	-45.93	-28.87
	Maceración día 3	-41.600*	2.593	.000	-50.13	-33.07
	Maceración día 4	-38.600*	2.593	.000	-47.13	-30.07
	Maceración día 5	-12.133*	2.593	.006	-20.67	-3.60
3	Maceración día 1	4.200	2.593	.518	-4.33	12.73
	Maceración día 2	41.600*	2.593	.000	33.07	50.13
	Maceración día 4	3.000	2.593	.774	-5.53	11.53
	Maceración día 5	29.467*	2.593	.000	20.93	38.00
4	Maceración día 1	1.200	2.593	.989	-7.33	9.73
	Maceración día 2	38.600*	2.593	.000	30.07	47.13
	Maceración día 3	-3.000	2.593	.774	-11.53	5.53
	Maceración día 5	26.467*	2.593	.000	17.93	35.00
5	Maceración día 1	-25.267*	2.593	.000	-33.80	-16.73
	Maceración día 2	12.133*	2.593	.006	3.60	20.67
	Maceración día 3	-29.467*	2.593	.000	-38.00	-20.93
	Maceración día 4	-26.467*	2.593	.000	-35.00	-17.93

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 15

Datos estadísticos del extracto de ajo en vinagre de uva como solvente a una concentración a 1.4 mg /mL del extracto frente a *Colletotrichum spp.*

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
7.404	4	10	.005

La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene indica que no se cumple el supuesto homogeneidad entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad antifúngica frente al *Colletotrichum spp.* (Estadístico: 7.404; df1:4 y df2:10: $p < .05$)

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4259.604	4	1064.901	5.274	.015
Dentro de grupos	2019.320	10	201.932		
Total	6278.924	14			

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencia significativa en los porcentajes de inhibición, de acuerdo con los tratamientos empleados frente al *Colletotrichum spp.* (F: 5.274; $p < 0.05$)

De acuerdo con las pruebas post-hoc de Games-Howell, se observa que las diferencias significativas se encuentran entre grupos de maceración del primer día con el segundo, cuarto y quinto día de maceración ($p < 0.01$), como se puede observar en la gráfica de diagramas de cajas, siendo el primer día de maceración el tratamiento que presenta un 100 % de inhibición frente al *Colletotrichum spp.*

**Comparaciones múltiples
Games-Howell**

(I) Uva	(J) Uva	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Maceración día 1	Maceración día 2	16.533	9.702	.558	-48.26	81.32
	Maceración día 3	28.033*	5.082	.040	2.06	54.00
	Maceración día 4	-21.500*	2.698	.024	-37.40	-5.60
	Maceración día 5	12.033	15.105	.912	-97.28	121.34
Maceración día 2	Maceración día 1	-16.533	9.702	.558	-81.32	48.26
	Maceración día 3	11.500	10.364	.797	-45.63	68.63
	Maceración día 4	-38.033	9.426	.161	-108.73	32.66
	Maceración día 5	-4.500	17.599	.999	-90.83	81.83
Maceración día 3	Maceración día 1	-28.033*	5.082	.040	-54.00	-2.06
	Maceración día 2	-11.500	10.364	.797	-68.63	45.63
	Maceración día 4	-49.533*	4.533	.019	-80.91	-18.15
	Maceración día 5	-16.000	15.538	.830	-116.97	84.97
Maceración día 4	Maceración día 1	21.500*	2.698	.024	5.60	37.40
	Maceración día 2	38.033	9.426	.161	-32.66	108.73
	Maceración día 3	49.533*	4.533	.019	18.15	80.91
	Maceración día 5	33.533	14.929	.409	-80.16	147.22

Maceración día 5	Maceración día 1	-12.033	15.105	.912	-121.34	97.28
	Maceración día 2	4.500	17.599	.999	-81.83	90.83
	Maceración día 3	16.000	15.538	.830	-84.97	116.97
	Maceración día 4	-33.533	14.929	.409	-147.22	80.16

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 16

Datos estadísticos del extracto de ajo en vinagre de manzana como solvente a una concentración a 1.4 mg /mL del extracto frente a *Fusarium verticillioides*.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
1.463	4	10	.284

La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene indica que se cumple el supuesto homogeneidad entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad antifúngica frente al *Colletotrichum* spp. (Estadístico: 1.463; df1:4 y df2:10; p>0.05).

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	6070.156	4	1517.539	127.746	.000
Dentro de grupos	118.793	10	11.879		
Total	6188.949	14			

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencia significativa en los porcentajes de inhibición, de acuerdo con los tratamientos empleados frente al *Fusarium verticillioides*. (F: 127.746; p<0.001)

De acuerdo con las pruebas post-hoc de HSD Tukey, se observa que las diferencias significativas se encuentran entre grupos de maceración del primer día con el segundo y tercer

día de maceración ($p < 0.01$), como se puede observar en la gráfica de diagramas de cajas, siendo el primer día de maceración el tratamiento que presenta un 97 % de inhibición frente al *Fusarium verticillioides*.

**Comparaciones múltiples
HSD Tukey**

(I) Manzana	(J) Manzana	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Maceración día 1	Maceración día 2	22.467*	2.814	.000	13.21	31.73
	Maceración día 3	49.967*	2.814	.000	40.71	59.23
	Maceración día 4	-1.300	2.814	.989	-10.56	7.96
	Maceración día 5	-1.100	2.814	.994	-10.36	8.16
Maceración día 2	Maceración día 1	-22.467*	2.814	.000	-31.73	-13.21
	Maceración día 3	27.500*	2.814	.000	18.24	36.76
	Maceración día 4	-23.767*	2.814	.000	-33.03	-14.51
	Maceración día 5	-23.567*	2.814	.000	-32.83	-14.31
Maceración día 3	Maceración día 1	-49.967*	2.814	.000	-59.23	-40.71
	Maceración día 2	-27.500*	2.814	.000	-36.76	-18.24
	Maceración día 4	-51.267*	2.814	.000	-60.53	-42.01
	Maceración día 5	-51.067*	2.814	.000	-60.33	-41.81
Maceración día 4	Maceración día 1	1.300	2.814	.989	-7.96	10.56
	Maceración día 2	23.767*	2.814	.000	14.51	33.03

	Maceración día 3	51.267*	2.814	.000	42.01	60.53
	Maceración día 5	.200	2.814	1.000	-9.06	9.46
Maceración día 5	Maceración día 1	1.100	2.814	.994	-8.16	10.36
	Maceración día 2	23.567*	2.814	.000	14.31	32.83
	Maceración día 3	51.067*	2.814	.000	41.81	60.33
	Maceración día 4	-.200	2.814	1.000	-9.46	9.06

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 17

Datos estadísticos del extracto de ajo en vinagre de vino tinto como solvente a una concentración a 1.4 mg /mL del extracto frente a *Fusarium verticillioides*.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
6.453	4	10	.008

La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene indica que no se cumple el supuesto homogeneidad entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad antifúngica frente al *Fusarium verticillioides*. (Estadístico: 6.453; df1:4 y df2:10; p<0.05).

ANOVA

	Suma de cuadrados	Gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	4596.803	4	1149.201	7.707	.004
Dentro de grupos	1491.107	10	149.111		
Total	6087.909	14			

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencia significativa en los porcentajes de inhibición, de acuerdo con los tratamientos empleados frente al *Fusarium verticillioides*. (F: 7.707; $p < 0.05$)

De acuerdo con las pruebas post-hoc de HD Tukey, se observa que las diferencias significativas se encuentran entre grupos de maceración del primer día con el segundo y tercer día de maceración ($p < 0.01$), como se puede observar en la gráfica de diagramas de cajas, siendo el segundo día de maceración el tratamiento que presenta un 100 % de inhibición, seguido del tercer día con un 98 % de inhibición frente al *Fusarium verticillioides*.

Comparaciones múltiples

HSD Tukey

(I) Vino	(J) Vino	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Maceración día 1	Maceración día 2	-44.667*	9.970	.008	-77.48	-11.85
	Maceración día 3	-43.600*	9.970	.010	-76.41	-10.79
	Maceración día 4	-22.433	9.970	.238	-55.25	10.38
	Maceración día 5	-12.000	9.970	.750	-44.81	20.81
Maceración día 2	Maceración día 1	44.667*	9.970	.008	11.85	77.48
	Maceración día 3	1.067	9.970	1.000	-31.75	33.88
	Maceración día 4	22.233	9.970	.244	-10.58	55.05
	Maceración día 5	32.667	9.970	.051	-.15	65.48
Maceración día 3	Maceración día 1	43.600*	9.970	.010	10.79	76.41
	Maceración día 2	-1.067	9.970	1.000	-33.88	31.75

	Maceración día 4	21.167	9.970	.282	-11.65	53.98
	Maceración día 5	31.600	9.970	.060	-1.21	64.41
Maceración día 4	Maceración día 1	22.433	9.970	.238	-10.38	55.25
	Maceración día 2	-22.233	9.970	.244	-55.05	10.58
	Maceración día 3	-21.167	9.970	.282	-53.98	11.65
	Maceración día 5	10.433	9.970	.829	-22.38	43.25
Maceración día 5	Maceración día 1	12.000	9.970	.750	-20.81	44.81
	Maceración día 2	-32.667	9.970	.051	-65.48	.15
	Maceración día 3	-31.600	9.970	.060	-64.41	1.21
	Maceración día 4	-10.433	9.970	.829	-43.25	22.38

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 18

Datos estadísticos del extracto de ajo en vinagre de uva como solvente a una concentración a 1.4 mg /mL del extracto frente a *Fusarium verticillioides*.

Prueba de homogeneidad de varianzas

Estadístico de Levene	df1	df2	Sig.
3.469	4	10	.050

La prueba de homogeneidad de varianzas de Levene indica que no se cumple el supuesto homogeneidad entre los diferentes tratamientos empleados para evaluar la actividad antifúngica frente al *Fusarium verticillioides*. (Estadístico: 3.469; df1:4 y df2:10; $p < 0.05$).

ANOVA

	Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
Entre grupos	5464.629	4	1366.157	44.677	.000
Dentro de grupos	305.787	10	30.579		
Total	5770.416	14			

El ANOVA unifactorial indica que hay diferencia significativa en los porcentajes de inhibición, de acuerdo con los tratamientos empleados frente al *Fusarium verticillioides*. (F: 44.677; $p < 0.001$)

De acuerdo con las pruebas post-hoc de HSD Tukey, se observa que las diferencias significativas se encuentran entre grupos de maceración del primer día con el segundo y tercer día de maceración ($p < 0.01$), como se puede observar en la gráfica de diagramas de cajas, siendo el segundo día de maceración el tratamiento que presenta un 100 % de inhibición, seguido del tercer día con un 98 % de inhibición frente al *Fusarium verticillioides*.

Comparaciones múltiples

HSD Tukey

(I) Uva	(J) Uva	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Maceración día 1	Maceración día 2	41.667*	4.515	.000	26.81	56.53
	Maceración día 3	55.067*	4.515	.000	40.21	69.93
	Maceración día 4	46.533*	4.515	.000	31.67	61.39
	Maceración día 5	40.700*	4.515	.000	25.84	55.56
Maceración día 2	Maceración día 1	-41.667*	4.515	.000	-56.53	-26.81

	Maceración día 3	13.400	4.515	.082	-1.46	28.26
	Maceración día 4	4.867	4.515	.814	-9.99	19.73
	Maceración día 5	-9.967	4.515	.999	-15.83	13.89
Maceración día 3	Maceración día 1	-55.067*	4.515	.000	-69.93	-40.21
	Maceración día 2	-13.400	4.515	.082	-28.26	1.46
	Maceración día 4	-8.533	4.515	.381	-23.39	6.33
	Maceración día 5	-14.367	4.515	.059	-29.23	.49
Maceración día 4	Maceración día 1	-46.533*	4.515	.000	-61.39	-31.67
	Maceración día 2	-4.867	4.515	.814	-19.73	9.99
	Maceración día 3	8.533	4.515	.381	-6.33	23.39
	Maceración día 5	-5.833	4.515	.702	-20.69	9.03
Maceración día 5	Maceración día 1	-40.700*	4.515	.000	-55.56	-25.84
	Maceración día 2	.967	4.515	.999	-13.89	15.83
	Maceración día 3	14.367	4.515	.059	-.49	29.23
	Maceración día 4	5.833	4.515	.702	-9.03	20.69

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.

Anexo 19

Comparación múltiple del porcentaje de inhibición frente a la *Fusarium verticillioides*.
 Concentración de Ajo = 1.75 mg /mL de medio de cultivo.

(I) Tratamiento	(J) Tratamiento	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Antracol	Ram Caf	35.900*	.675	.000	33.60	38.20
	Coctel químico	-7.200*	.675	.000	-9.50	-4.90
	Extracto de ajo en vinagre de manzana	-46.200*	.675	.000	-48.50	-43.90
	Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	-46.200*	.675	.000	-48.50	-43.90
	Extracto de ajo en vinagre de uva	-46.200*	.675	.000	-48.50	-43.90
	Vinagre	53.733*	.675	.000	51.43	56.04
Ram Caf	Antracol	-35.900*	.675	.000	-38.20	-33.60
	Coctel químico	-43.100*	.675	.000	-45.40	-40.80
	Extracto de ajo en vinagre de manzana	-82.100*	.675	.000	-84.40	-79.80
	Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	-82.100*	.675	.000	-84.40	-79.80
	Extracto de ajo en vinagre de uva	-82.100*	.675	.000	-84.40	-79.80
	Vinagre	17.833*	.675	.000	15.53	20.14
Coctel químico	Antracol	7.200*	.675	.000	4.90	9.50
	Ram Caf	43.100*	.675	.000	40.80	45.40
	Extracto de ajo en vinagre de manzana	-39.000*	.675	.000	-41.30	-36.70
	Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	-39.000*	.675	.000	-41.30	-36.70
	Extracto de ajo en vinagre de uva	-39.000*	.675	.000	-41.30	-36.70
	Vinagre	60.933*	.675	.000	58.63	63.24
Extracto de ajo en vinagre de manzana	Antracol	46.200*	.675	.000	43.90	48.50
	Ram Caf	82.100*	.675	.000	79.80	84.40
	Coctel químico	39.000*	.675	.000	36.70	41.30
	Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	.000	.675	1.000	-2.30	2.30
	Extracto de ajo en vinagre de uva	.000	.675	1.000	-2.30	2.30
	Vinagre	99.933*	.675	.000	97.63	102.24
Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	Antracol	46.200*	.675	.000	43.90	48.50
	Ram Caf	82.100*	.675	.000	79.80	84.40
	Coctel químico	39.000*	.675	.000	36.70	41.30
	Extracto de ajo en vinagre de manzana	.000	.675	1.000	-2.30	2.30
	Extracto de ajo en vinagre de uva	.000	.675	1.000	-2.30	2.30
	Vinagre	99.933*	.675	.000	97.63	102.24
Extracto de ajo en vinagre de uva	Antracol	46.200*	.675	.000	43.90	48.50
	Ram Caf	82.100*	.675	.000	79.80	84.40
	Coctel químico	39.000*	.675	.000	36.70	41.30
	Extracto de ajo en vinagre de manzana	.000	.675	1.000	-2.30	2.30
	Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	.000	.675	1.000	-2.30	2.30
	Vinagre	99.933*	.675	.000	97.63	102.24
Vinagre	Antracol	-53.733*	.675	.000	-56.04	-51.43
	Ram Caf	-17.833*	.675	.000	-20.14	-15.53
	Coctel químico	-60.933*	.675	.000	-63.24	-58.63
	Extracto de ajo en vinagre de manzana	-99.933*	.675	.000	-102.24	-97.63
	Extracto de ajo en vinagre de vino tinto	-99.933*	.675	.000	-102.24	-97.63
	Extracto de ajo en vinagre de uva	-99.933*	.675	.000	-102.24	-97.63

*. La diferencia de medias es significativa en el nivel 0.05.