

**UNIVERSIDAD MAYOR DE SAN ANDRÉS
FACULTAD DE CIENCIAS FARMACÉUTICAS BIOQUÍMICAS
CARRERA DE BIOQUÍMICA
INSTITUTO DE INVESTIGACIONES FARMACO BIOQUÍMICAS**



**DETERMINACIÓN DEL PORCENTAJE DE CRECIMIENTO DE
FITOPATÓGENOS *FUSARIUM SPP* (BOL RT-1), *ALTERNARIA SPP* (BOL RT-
2), *ULOCLADIUM SPP* (BOL RQ-2), *ASPERGILLIUS FLAVUS* (JR1) Y
ASPERGILLIUS NÍGER (BOL JR-2) AISLADOS DE LA TUNA (*OPUNTIA
PICUS-INDICA*) Y LA CASTAÑA (*CASTANEA SATIVA MILLER*) SOMETIDOS A
BIOCONTROLADORES OBTENIDOS DE EXTRACTOS VEGETALES.**

POSTULANTE : Univ. Edwin Germán Márquez Dávalos

TUTOR : PhD. Enrique Terrazas Siles

**La Paz-Bolivia
2010**

DEDICATORIA

I offer my most humble obeisances unto
माधवः पाण्डवश्चैव दिव्यां शङ्खं प्रदध्मतुः and my family, T.G.N.A.
who with the torchlight of transcendental knowledge has
opened my eyes
which were blinded by the darkness of ignorance.

AGRADECIMIENTOS

A la Facultad de Ciencias Farmacéuticas y Bioquímicas que definió una buena parte de mi vida como ser humano y a la carrera de bioquímica que como ciencia estableció en mi persona hechos y pequeñas verdades acerca de mi realidad como ser humano.

Al instituto de investigaciones fármaco bioquímicas por confiar en mi capacidad como científico e investigador.

Al doctor Enrique Terrazas por ser paciente y desprendido que siempre apoya y confía en nuevas generaciones de investigadores.

Obviamente, a todo el plantel docente en general y en especial a la Dra Patricia Molliniedo y al Univ. Reynaldo Tenorio Pari, como a todos los compañeros que les interesa la ciencia como llave del conocimiento que nos define como entes en el universo y moldea nuestra realidad.

विद्याविनयसम्पन्ने ब्राह्मणे गवि हस्तिनि ।
शुनि चैव श्वपाके च पण्डिताः समदर्शिनः ॥१८॥

इहैव तैर्जितः सर्गो येषां साम्ये स्थितं मनः ।
निर्दोषं हि समं ब्रह्म तस्माद्ब्रह्मणि ते स्थिताः ॥१९॥

न प्रहृष्येत्प्रियं प्राप्य नोद्विजेत्प्राप्य चाप्रियम् ।
स्थिरबुद्धिरसंमूढो ब्रह्मविद्ब्रह्मणि स्थितः ॥२०॥

ये हि संस्पर्शजा भोगा दुःखयोनय एव ते ।
आद्यन्तवन्तः कौन्तेय न तेषु रमते बुधः ॥२१॥

शक्नोतीहैव यः सोढुं प्राक्शरीरविमोक्षणात् ।
कामक्रोधोद्भवं वेगं स युक्तः स सुखी नरः ॥२३॥

TABLA DE CONTENIDO

INTRODUCCIÓN	1
I. JUSTIFICACIÓN	3
II. OBJETIVOS	4
A.OBJETIVO GENERAL.....	4
B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	4
III. DISEÑO TEÓRICO	5
A. MARCO REFERENCIAL	5
1. MODELO TEÓRICO	5
B. ANTECEDENTES SOBRE FITOPATOGENOS Y ANTIFITOPATOGENOS	6
C. MARCO TEÓRICO.....	7
1. HONGOS FITOPATÓGENOS ⁶	7
i. <i>Alternaria spp</i>	7
ii. <i>Fusarium spp</i>	8
iii. <i>Ulocladium spp</i>	9
iv. <i>Aspergillus flavus</i>	10
v. <i>Aspergillus niger</i>	10
2. ANTIFUNGICOS.....	11
i. Naftoquinonas antifúngicas en plantas carnívoras.....	11
ii. Filtrado antifúngico de <i>Trichoderma sp.</i> Bol 12 QD-1.....	12
iii. Determinación de inhibición miceliar por método de peso de micelios secos y evaluación de extractos de plantas.....	13
iv. Influencia de polvos de hojas, frutas y semillas y extractos de <i>Pithecellobium dulce</i> (Roxb.) Benth. (Favaceae) en siete hongos	14
v. Extracto antifúngico de nuez moscada	15
vi. Aceites esenciales contra <i>Fusarium oxysporum</i> y <i>Alternaria porri</i>	16
vii. Mecanismo de acción de péptidos antifúngicos	18
IV. DISEÑO METODOLÓGICO	18
A. MATERIALES ESPECÍFICOS (VER ANEXOS)	19
B. METODOS, TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS	19
1. Reislamiento	19

2. Identificación fúngica	19
3. Preservación en Glicerol.....	19
4. Evaluación por el método ensayo de inhibición por dilución de Placa	21
5. Evaluación del efecto antifúngico de extractos de plantas contra hongos	22
V. RESULTADOS	22
A. Efecto antifúngico de extractos contra <i>Alternaria spp</i> (Cepa Bol RT-2) <i>in vitro</i> ..	22
1. Porcentaje de crecimiento en <i>Alternaria spp</i> (Bol RT-2).....	22
B. Efecto antifúngico de extractos contra <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1) <i>in vitro</i>	26
1. Porcentaje de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1)	26
i. Porcentaje de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1) disminuido por extracto vegetal IITP-1	27
ii. Porcentaje de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1) disminuido por extracto vegetal IITP-2.....	27
iii. Porcentaje de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1) disminuido por extracto vegetal IITP-3 y 16	29
VI DISCUSION.....	30
A. Los porcentajes de crecimiento de <i>Alternaria spp</i> (Cepa Bol RT-2).....	31
1. Extracto IITP-1 tiene un efecto de disminución de crecimiento en <i>Alternaria spp</i> (Bol RT-2).....	32
2. Los extractos 16, IITP-2 y 3 no disminuyen el crecimiento de <i>Alternaria spp</i> (Bol RT-2)	33
B. El porcentaje de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1).....	33
1. Crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1) disminuido por extracto vegetal IITP-1 y 2	34
i. El extracto IITP-1 disminuye el porcentaje de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1).....	34
ii. El extracto IITP-2 disminuye el porcentaje de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1).....	35
2. El extracto IITP-3 y 16 no disminuyen el porcentaje de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1)	35

VII. CONCLUSIONES	37
VIII. BIBLIOGRAFÍA.....	38

LISTA DE TABLAS

Tabla 1. Porcentaje de Crecimiento de <i>Alternaria spp</i> (Cepa Bol-RT2).....	23
Tabla 2. Velocidad de crecimiento de <i>Alternaria spp</i> (Cepa Bol-RT2).....	23
Tabla 3. Tabla 3 Porcentaje de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1)).....	99
Tabla 4. Velocidad de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1).....	99

LISTA DE GRAFICOS

Gráfico 1. Porcentaje de Crecimiento de <i>Alternaria spp</i> (Bol-RT-2).....	24
Gráfico 2. Porcentaje de Crecimiento de <i>Alternaria spp</i> (Bol-RT-2).....	25
Gráfico 3. Porcentaje de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol-RT-1).....	29
Gráfico 4. Porcentaje de crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol-RT-1).....	24

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Crecimiento de <i>Alternaria spp</i> (Cepa Bol RT-2) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que contienen el extracto IITP-1, por triplicado.....	25
Figura 2. CONTROL NEGATIVO Crecimiento de <i>Alternaria spp</i> (Cepa Bol RT-2) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que no contienen antifúngico, por triplicado.....	25
Figura 3. CONTROL POSITIVO Crecimiento de <i>Alternaria spp</i> (Cepa Bol RT-2) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que contienen Mancozeb como antifúngico, por triplicado.....	26
Figura 4. Crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que contienen el extracto IITP-1, por triplicado.....	27

Figura 5. Crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que contienen el extracto IITP-2, por triplicado.....	28
Figura 6. CONTROL NEGATIVO Crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que no contienen antifúngico alguno, por triplicado	28
Figura 7. CONTROL POSITIVO Crecimiento de <i>Fusarium spp</i> (Bol - RT-1) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que contienen antifúngico Mancozeb, por triplicado	28

LISTA DE ANEXOS

ANEXO I

MATERIAL DE LABORATORIO, MEDIOS DE CULTIVO, REACTIVOS, EQUIPOS Y EXTRACTOS

Material de Laboratorio

ANEXO II

TABLAS Y GRAFICOS

Tabla Nº 5. Crecimiento en milímetros in extenso hasta los 9 días de *Alternaria spp* CEPA Bol-RT-2 con diferentes extractos.

Tabla Nº 6. Crecimiento en milímetros in extenso hasta los 9 días del la CEPA *Fusarium spp*. CEPA Bol RT-1 con diferentes extractos.

Tabla Nº 7. Porcentaje de crecimiento in extenso hasta los 9 días de *Alternaria spp* CEPA Bol-RT-2 con diferentes extractos.

Tabla Nº 8. porcentaje de crecimiento in extenso hasta los 9 días del la Cepa *Fusarium spp*. CEPA Bol RT-1 con diferentes extractos.

Tabla Nº 9. Velocidad de crecimiento logarítmica de CEPA *Alternaria spp*. CEPA BOL RT-2 con diferentes extractos.

Tabla Nº 10. Velocidad de crecimiento logarítmica de CEPA *Fusarium spp*. CEPA Bol RT-1 con diferentes extractos.

Gráfico Nº 5. Porcentaje de Crecimiento de *Alternaria spp* (Bol-RT-2)

Gráfico Nº 6. Porcentaje de crecimiento de *Fusarium spp* (Bol-RT-1)

ANEXO III
FIGURAS

Figura N°8 Cinéticas de crecimiento del Hongo *Alternaria spp.* CEPA Bol RT-2 por triplicado sometido a extracto vegetal 16.

Figura N°9 Cinéticas de crecimiento del Hongo *Alternaria spp.* CEPA Bol RT-2 por triplicado sometido a extracto vegetal IITP-1.

Figura N°10 Cinéticas de crecimiento del Hongo *Alternaria spp.* CEPA Bol RT-2 por triplicado sometido a extracto vegetal IITP-2.

Figura N°11 Cinéticas de crecimiento del Hongo *Alternaria spp.* CEPA BOL RT-2 por triplicado sometido a extracto vegetal IITP-3.

Figura N°12 Control negativo cinéticas de crecimiento del Hongo *Alternaria spp.* CEPA BOL RT-2 POR TRIPLICADO.

Figura N°13 Control positivo cinéticas de crecimiento del Hongo *Alternaria spp.* CEPA BOL RT-2 POR TRIPLICADO SOMETIDO A MANKOZEB.

Figura N°14 Cinéticas de crecimiento del Hongo *Fusarium spp.* CEPA Bol RT-1 por triplicado sometido a extracto vegetal 16.

Figura N°15 cinéticas de crecimiento del Hongo *Fusarium spp.* CEPA Bol RT-1 por triplicado sometido a extracto vegetal IITP-1.

Figura N°16 Cinéticas de crecimiento del Hongo *Fusarium spp.* CEPA Bol RT-1 por triplicado sometido a extracto vegetal IITP-2.

Figura N°17 Cinéticas de crecimiento del Hongo *Fusarium spp.* CEPA Bol RT-1 por triplicado sometido a extracto vegetal IITP-3.

Figura N°18 Control negativo cinéticas de crecimiento del Hongo *Fusarium spp.* CEPA Bol RT-2 por triplicado.

Figura N°19 Control positivo cinéticas de crecimiento del Hongo *Fusarium spp.* CEPA BOL RT-2 por triplicado sometido a MankozeB.

RESUMEN

Se ha determinado que algunos de estos metabolitos secundarios “de extractos de plantas” hacen parte del repertorio de las sustancias que sirven de defensa de las plantas, entre estos se encuentran los alcaloides, terpenoides, y fenilpropanoides. Igualmente, se conoce que algunas fitoalexinas tipo flavonoides, terpénicas y sesquiterpénicas intervienen en la protección de las plantas contra los microorganismos. El presente estudio tiene por objeto determinar el porcentaje de crecimiento de fitopatógenos *Fusarium spp* (Bol RT-1), *Alternaria spp* (Bol RT-2), *Ulocladium spp* (Bol RQ-2), *Aspergillus flavus* (JR1) y *Aspergillus niger* (Bol JR-2) aislados de la tuna (*Opuntia Picus-Indica*) y la castaña (*Castanea sativa Miller*) sometidos a biocontroladores obtenidos de extractos vegetales. Cada día se marco “perímetro” del crecimiento de hongos. Luego, cuando el control negativo alcanza el crecimiento máximo, se marca en las 8 direcciones Norte, Sur, Este, Oeste, NO, NE, SO y SE. Después, se mide en milímetros. Esta prueba se hizo por triplicado para cada hongo y cada extracto, para obtener menos variación en las inhibiciones o efecto biocontrolador. Los resultados muestran que para *Alternaria spp* (Bol RT-2) hay disminución de 65,03 +/- 6,97 % de crecimiento y CV = 30,9% y para *Fusarium spp* (Bol - RT-1) solo IITP-1 disminuye hasta 82,32 +/- 5,7 % de crecimiento y 15,9% de CV. IITP-1 VC = 3,31 mm/día. Para IITP-2 disminuye en 82,39 +/- 4,46 % crecimiento y CV = 12,24%. IITP-2 VC = 3,55 mm/día.

Palabras clave.- **Alt:** *Alternaria spp* (Bol RT-2); **Fus:** *Fusarium spp* (Bol RT-1); **16:** saponinas esteroideas M-16 aislada de *Chenopodium quinoa*; **IITP-1:** extracto vegetal; **IITP-2:** extracto vegetal; **IITP-3:** extracto vegetal. **CV:** coeficiente de varianza **VC:** velocidad de crecimiento.

ABSTRACT

It has been determined that some of these secondary metabolites “from vegetal extracts” are a background of substances that are useful as defense for plants among them we can find alkaloids, terpenoids, and phenylpropanoids. Similarly, it is known that some phytoalexins like flavonoids, terpenics and sesquiterpenics help protecting plants against microorganisms such as fungi and bacteria. This work aims to determine the percent of growing of the phytopatogens *Fusarium spp* (Bol RT-1), *Alternaria spp* (Bol RT-2), *Ulocladium spp* (Bol RQ-2), *Aspergillus flavus* (JR1) y *Aspergillus niger* (Bol JR-2) isolated from prickly pear (*Opuntia Picus-Indica*) and castaña (*Castanea sativa Miller*) tested with biocontrolers obtained from vegetal extracts. Each day the fungi's growing perimeter has been marked. Then, when the negative control has reached the ultimate growing, it is ready to be marked through the 8 directions North, South, East, West, NW, NE, SW y SE. Aftermaths, we measured through the 8 directions in a milimeter scale. This test has been made three times for each fungi and extract, just to obtain less variation in the inhibitions of the biocontrol effect. Results showed that IITP-1 decreased growing for *Alternaria spp* (Bol RT-2) of 65,03 +/- 6,97 % and CV = 30,9% and for *Fusarium spp* (Bol - RT-1) diminished until 82,32 +/- 5,7 % of growing CV 15,9. IITP-1 GR = 3,31 mm/día. Nevertheless, IITP-2 82,39 +/- 4,46 % y CV = 12,24%. IITP-2 GR= 3,55 mm/día showed to decrease growing.

Palabras clave.- Alt: *Alternaria spp* (Bol RT-2); **Fus:** *Fusarium spp* (Bol RT-1); **16:** esteroideal saponin M-16 isolated from *Chenopodium quinoa*; **IITP-1:** vegetal extract; **IITP-2** vegetal extract; **IITP-3:** vegetal extract. GR= growing rate

INTRODUCCIÓN

Los hongos presentes sobre las plantas antes de la cosecha son llamados "hongos del campo" e incluyen especies de los géneros *Alternaria*, *Cladosporium*, *Epicoccum*, *Fusarium*, *Verticillium*. Después de la cosecha, estos hongos pueden mantenerse sobre frutas y hortalizas causando lesiones que alteran su aspecto. También persisten en los granos de cereales almacenados, si están suficientemente secos para impedir el crecimiento de *Aspergillus* y *Penicillium*.¹

Los monocultivos de plantas como de la tuna o castaña son fácilmente plagados por hongos, pues ello obedece a que cierta cantidad de frutos (tuna o castaña) deben ser degradados por los hongos para seleccionar a los frutos más aptos a desarrollarse, pues el objetivo de un fruto es degradarse y liberar la semilla para perpetuar la especie, en cambio la semilla debe someterse a sobrevivir a diversas entidades vivientes para establecer su especie nuevamente, viendo que en cultivos a larga escala se multiplica por miles este evento se ha respondido con: fungicidas petroquímicos de origen sintético, químicos naturales y plantas modificadas genéticamente. Consecuentemente, su uso indiscriminado produce las tan bien llamadas enfermedades no epidémicas como: cáncer y tumores Ej. Es el DDT "diclorodifeniltricloroetano "que se concentraba en la corteza de los vegetales y era consumido en la cáscara de muchos productos vegetales.

Es por eso que, se tiene que responder con métodos más naturales diseñados por la naturaleza tales como extractos vegetales, en un ecosistema en equilibrio por cada microorganismo infeccioso de plantas debería haber su contraparte que resista su colonización ya sean microorganismos (hongos o bacterias) o extractos de plantas. Es así que, tenemos que usar nuevos biocontroladores, no solo para una producción fructífera, sino también para salvaguardar la salud de la población "seguridad alimentaria en Bolivia" así como el equilibrio entre la agronomía y el medioambiente.

Los desagües cloacales y los fertilizantes agrícolas aumentan la eutrofización en aguas costeras. Los resultados pueden ser desastrosos. En la bahía Chesapeake,

en Massachussets. EE.UU., están extinguiéndose los cangrejos, las ostras y otros peces por la mezcla de AGENTES CONTAMINANTES INDUSTRIALES Y AGRÍCOLAS que se arrojan en la bahía. A medida que estos animales desaparecen, los pescadores pierden su medio de vida². En su mera ilusión los seres humanos han tratado de purificar ríos, más no obstante no por completo. Un claro ejemplo es que ciertos químicos algunos de ellos hormonas esteroides de bajo peso molecular aún siguen presentes causando niveles bajos de espermatozoides en la población masculina y por ende esterilidad. Tales casos nos llevan a investigar nuevas forma de biocontrol en la agricultura.

Las alergias a estos hongos son comunes, pero las infecciones graves sólo son habituales en los pacientes inmunodeprimidos; sin embargo, las especies de este hongo, son productores de muchas sustancias tóxicas. En estudios de laboratorio con cultivos puros de fitopatógenos y pruebas de campo con cosechas, se evidencia la efectividad de fungicidas es contradictoria y en ciertos casos algo inesperada. En particular, a dosis sub-letal de fungicidas tales como carbendazima, tridemorph, difenoconazole y tebuconazole con triadimenol, la producción de micotoxina de *Fusarium phytopathogens* puede incrementarse³.

La tuna (*Opuntia ficus-indica*) es un producto de consumo interno del cual se aprovecha sus frutos para el consumo humano se vio afectada por una extraña enfermedad que bajo la producción, ocasionando grandes pérdidas para los productores que viven de la comercialización en los principales centros urbanos.

Entre los 50 principales productos naturales renovables exportados por Bolivia durante los primeros cinco meses del 2006 (de enero al 31 de mayo de 2006), se cuenta la castaña (fresca o seca) con 21,7 millones de dólares y la quinua con 2,8 millones de dólares, lo que suma un total de 24.3 millones de dólares⁴.

I. JUSTIFICACIÓN

En lo que se refiere a Latinoamérica también se puede vislumbrar un panorama prometedor a corto y mediano plazo para el uso de estos biocontroladores antifúngicos en el área de la agricultura. Actualmente en Latinoamérica se emplean pocos biocontroladores, la mayoría son agroquímicos derivados de la industria petrolera. Es por eso, necesario desarrollar nuevos antifúngicos tales como los producidos por las plantas, evaluar su efectividad ante ciertas cepas fitopatógenas. Necesariamente, la agricultura tiene que optar por productos biológicos que la naturaleza pueda degradar tal es el caso de los fungicidas. En contraste, los productos agroquímicos derivados del petróleo no son seguros ni para el medio ambiente ni para ser vivo alguno sobre la faz de la tierra, incluido el hombre, tal es el caso que todo producto agroquímico siempre se usa en cantidades altas sobre monocultivos. Es por eso que, al ya usarse no se los puede aislar pues han sido esparcidos por lo que no se cumple la ley de que cualquier agroquímico por inocuo que parezca debe de almacenarse y no dejar fluir por ríos y aguas subterráneas.

Por décadas hemos sufrido el azote de la revolución industrial, así como la producción en masa de agroquímicos, pesticidas, y otros derivados del petróleo. Prueba clara es el aumento en enfermedades no infecciosas como el cáncer y tumores originados por estos químicos cancerígenos. Es así que es sabio optar por biocontroladores producto de la evolución en seres propios de la naturaleza, tales como extractos vegetales etc. Los extractos vegetales son biodegradados a la larga, no como los pesticidas, pues estos permanecen latentes a largo plazo en el medio ambiente.

Por lo que, un estudio de extractos con actividad antifúngica sobre fitopatógenos es vital para no envenenar el medioambiente y a nosotros mismos. Por lo que, este trabajo debe de responder a las necesidades actuales de seguridad alimentaria dependiente de una producción abundante de vegetales a causa de un efectivo uso de antifúngicos de origen natural que no nos dañaran ni al

medioambiente y los seres que lo habitan. Los extractos vegetales tienen la ventaja de poseer un origen biológico, ser biodegradables, manifestar un mínimo impacto negativo sobre la salud humana y el medioambiente⁵

En el presente trabajo nos formulamos las siguientes preguntas de investigación, podrán los extractos vegetales ser efectivos en contra de los hongos fitopatógenos?, que hongos fitopatógenos generaran resistencia a los extractos vegetales? y se podrá realizar biocontrol a estos hongos fitopatógenos a partir de extractos naturales?

II.OBJETIVOS

A. OBJETIVO GENERAL

Determinar el porcentaje de crecimiento de fitopatógenos *Fusarium spp* (Bol RT-1), *Alternaria spp* (Bol RT-2), *Ulocladium spp* (Bol RQ-2), *Aspergillius flavus* (JR1) y *Aspergillius níger* (Bol JR-2) aislados de la tuna (*Opuntia Picus-Indica*) y la castaña (*Castanea sativa Miller*) sometidos a biocontroladores obtenidos de extractos vegetales.

B. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Determinar el porcentaje de crecimiento y velocidad de crecimiento de fitopatógenos *Fusarium spp* (Cepa BOL RT-1), *Alternaria spp* (Cepa BOL RT-2) *Ulocladium* (Cepa BOL RQ-2) *Aspergillius flavus* (Cepa BOL JR-1) y *Aaspergillius níger* (Cepa BOL JR-2) sometidos a extractos vegetales, que funcionen como antifúngicos, por ensayo de inhibición por dilución de Placa.

Determinar el porcentaje de crecimiento y velocidad de crecimiento de cepas fitopatógenas *Fusarium spp* (Cepa BOL RT-1), *Alternaria spp* (Cepa BOL RT-2) *Ulocladium* (Cepa BOL RQ-2) *Aspergillius flavus* (Cepa BOL JR-1) y *Aaspergillius níger* (Cepa BOL JR-2) sometidas a saponina de quinua, que funcionen como antifúngicos, por ensayo de inhibición por dilución de Placa.

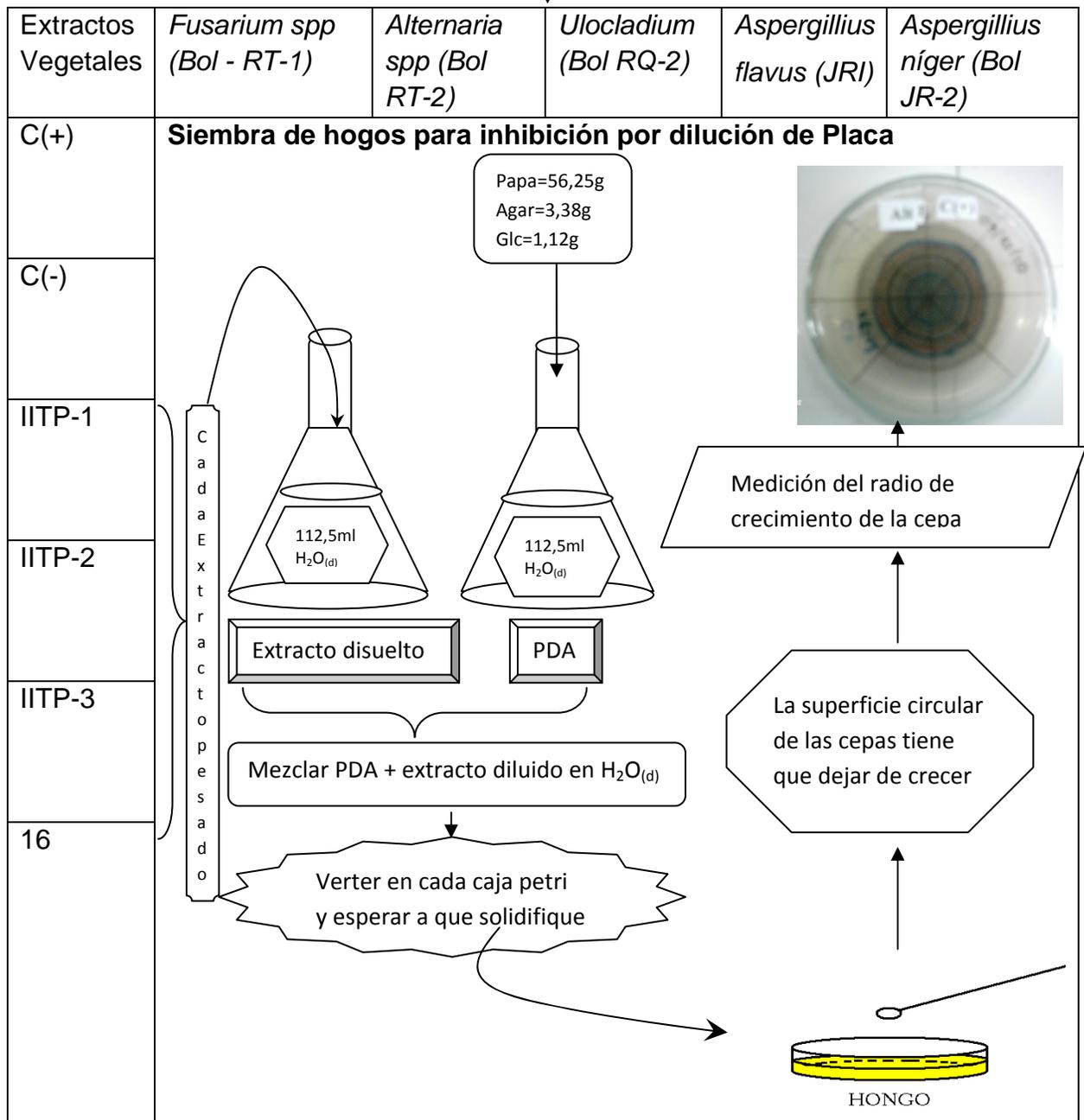
Reportar el extracto vegetal con efecto antifúngico contra las cepas fitopatógenas mediante el ensayo de inhibición por dilución de Placa.

III. DISEÑO TEÓRICO

A. MARCO REFERENCIAL

1. MODELO TEÓRICO

Aislados de cepas fitopatógenas de la tuna (*Opuntia Picus-Indica*) y la castaña (*Castanea sativa Miller*)



B. ANTECEDENTES SOBRE FITOPATOGENOS Y ANTIFITOPATOGENOS

El instituto de de Investigaciones Fármaco Bioquímicas el año 2000 comenzó con una línea de trabajo en la producción de microorganismos biocontroladores con actividad biológica inhibitoria de fitopatógenos de importancia tanto agrícola como económica en las especies de haba (*Vicia faba*) y de papa (*Solanum tuberosum*), así por ejemplo Pelaéz (2002), reporta el antagonismo microbiano para *Botrytis cinérea* causante de la mancha chocolatada de *Vicia faba* y *Alternaria solani* causante del tizón temprano de la papa utilizando dos microorganismos antagónicos *Fusarium sp.* y *Verticillium sp.* Donde *Verticillium sp.* Resulto mas eficaz inhibiendo el crecimiento in vitro tanto de *Botrytis cinérea* y *Alternaria solani*.

En Bolivia el Instituto de Investigaciones Fármaco Bioquímicas dependiente de la Universidad Mayor de San Andrés de la ciudad de La Paz desde el año 2000 comenzó con una línea de trabajo en la búsqueda y producción de biocontroladores de microorganismos con actividad biológica inhibitoria de fitopatógenos de importancia tanto agrícola como económica para nuestro país. Se estudiaron específicamente el control de fitopatógenos del haba y de la papa, a través del screening de los hongos del cepario del I.I.F.B. con posible actividad biológica contra estos patógenos^{4y6}.

Sin embargo, han aparecido otras aplicaciones que implican su uso como biocida y, en ese sentido, para el año 2001 el quitosano aparece registrado en el proyecto IR-4 como un bioplaguicida para uso en cultivos de uvas y fresas, quedando pendiente la revisión para los mismos fines en pepino, melón y pomelos. El proyecto IR-4 (The IR-4 project) es una de las mayores fuentes de datos usados por los agricultores norteamericanos para el manejo de plagas, el cual ha sido desarrollado por la Agencia de Protección Ambiental Estadounidense (EPA) como soporte para el desarrollo de valores legales de tolerancia en plaguicidas de nuevo uso. A pesar de ello, como muy bien refieren⁷, Latinoamérica tendría la capacidad de generar hasta un 12% del material quitinoso que se produce a nivel mundial con alrededor de unas 170.000 toneladas/año de desechos sólidos, lo que serviría

para producir alrededor de unas 25.000 toneladas/año de quitina, es decir unas 2,5 veces la demanda actual de quitosano. En ese sentido, varios países de la región poseen empresas productoras de quitina y quitosano, así como también producen y comercializan derivados de estos materiales, muchos de los cuales están dirigidos al sector agrícola.⁸

Por ejemplo otros estudios en fitoquímicos del género *Fagara*, indican que en su composición química existe una diversidad de alcaloides. Específicamente, *F. monophylla* (*Z. onophyllum*) posee un alto contenido de alcaloides cuaternarios, en especial berberinas y piranoquinolinas zantofilinas.⁹ A muchos de los alcaloides presentes en este género se les han atribuido propiedades antibióticas.¹⁰ No obstante, hasta ahora, sólo se le conocen propiedades antifúngicas a las especies *F. chalybea*, *F. holstii*, *F. holtziana*, *F. lemairei* y *F. zantoxylodes*. Por lo que estos estudios demuestran la efectividad de extractos de plantas contra hongos como antecedentes que impulsan el porque de este estudio.

En cuanto a los fitopatógenos el género *Alternaria* contiene especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos. Como saprobias pueden deteriorar alimentos y forrajes, produciendo compuestos biológicamente activos tal como micotoxinas. Como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales almacenados. Es necesaria una identificación precisa de las especies porque cada nombre entraña un conjunto de características (preferencias para el crecimiento, patogenicidad, producción de metabolitos secundarios) que permiten predecir el comportamiento del hongo.¹¹

C. MARCO TEÓRICO

1. HONGOS FITOPATÓGENOS

i. *Alternaria* spp

Alternaria solani es un hongo fitopatógeno perteneciente a la familia Pleosporaceae. Ocasiona una enfermedad en los cultivos de papa conocida como tizón temprano que se caracteriza por afectar al follaje y estar difundida en zonas húmedas y de altas temperaturas. Son también importantes mediadas de control

la rotación de cultivos, el uso de semilla desinfectada y sana y las aplicaciones de productos fungicidas en forma preventiva cuando existen las condiciones ambientales favorables.¹²

El género *Alternaria* contiene especies cosmopolitas que se encuentran en un amplio rango de materiales y productos. Como saprobias pueden deteriorar alimentos y forrajes, produciendo compuestos biológicamente activos tal como micotoxinas. Como patógenas reducen el rendimiento de las cosechas o afectan a los vegetales almacenados. Es necesaria una identificación precisa de las especies porque cada nombre entraña un conjunto de características (preferencias para el crecimiento, patogenicidad, producción de metabolitos secundarios) que permiten predecir el comportamiento del hongo.

En las hojas y, en menor grado, en los tallos se forman manchas necróticas, marcadas internamente por series de anillos concéntricos. Las lesiones en las hojas rara vez son circulares porque son restringidas por las nervaduras principales. Usualmente aparecen alrededor de la floración y van aumentando en número a medida que van madurando las plantas. Las lesiones se forman primero en las hojas inferiores. Pueden coalescer y causar un amarillado generalizado, caída de hojas o muerte precoz. La pudrición en el tubérculo es oscura, seca y coriácea. Las variedades susceptibles, usualmente de maduración precoz, pueden presentar una severa defoliación. Las variedades de maduración tardía pueden mostrarse resistentes. Las plantas sometidas a estreses que aceleran la maduración-medio ambiente adverso, clima cálido y húmedo, otras enfermedades o deficiencia nutricional se vuelven más susceptibles y mueren prematuramente.¹³

ii. *Fusarium spp*

Fusarium spp es un extenso género de hongos filamentosos ampliamente distribuido en el suelo y en asociación con plantas. La mayoría de las especies son saprofitas y son unos miembros relativamente abundantes de la microbiota del suelo. Las esporas del hongo son fácilmente reconocibles al microscopio por su

forma de media luna o de canoa. Algunas especies producen micotoxinas en los cereales y que pueden afectar a la salud de personas y animales si estas entran en la cadena alimentaria. La principal toxina producida por estas especies de *Fusarium* son fumonisinas y trichothecenos.

Son patógenos facultativos, capaces de sobrevivir en el agua y suelo alimentándose de materiales en descomposición. Son importantes agentes de contaminación en los laboratorios de microbiología.

Fusarium graminearum normalmente afecta a la cebada si existen periodos lluviosos hacia el final del cultivo. Tiene un importante impacto económico en las industrias cerveceras y de piensos para animales, ya que la cebada es su principal materia prima. La contaminación en la cebada puede producir el conocido como "Tizón" y en grandes afectaciones puede dar coloración rosada a la cebada. ⁽¹³⁾

Fusarium graminearum puede causar también pudriciones de raíz y muertes de plantitas en semilleros. El total de pérdidas en EEUU por *Fusarium* en cebada y trigo entre los años 1991 y 1996 fueron estimadas en 300.000 millones de dólares.¹⁴

iii. **Ulocladium spp**

Ulocladium es un género de los hongos. Especies de estos contienen agentes patógenos para plantas y descomposición de alimentos. Otras especies contienen enzimas que son agentes de control biológico. Algunos miembros de este género pueden invadir casas y son un signo de humedad porque el moho requiere agua para sobrevivir. Pueden causar enfermedades en plantas o fiebre hay e infecciones mas serias en individuos inmunodeprimidos.¹⁵

Especies de *Ulocladium* emblemizan aquel género *Alternaria* en el que fueron alguna vez incluidos, pero *Ulocladium*, a diferencia de *Alternaria*, no produce alternariolos, ácido tenuazoico, altersolanolos, o macrosporina.¹⁶

iv. **Aspergillus flavus**

Aspergillus flavus Es un hongo. Es moho común en el medioambiente, y puede causar problemas de almacenamiento en granos almacenados. También, puede ser un patógeno humano, asociado con aspergilosis de pulmones y algunas veces causar infecciones corneales, antimicóticas y nasoorbitales. Muchas cepas producen cantidades significativas de aflatoxina, un compuesto cancerígeno y agudamente tóxico. Las esporas de *A. flavus* son alergénicas. *A. flavus* algunas veces causa pérdidas en criaderos de gusanos de seda.¹⁷

A. flavus crece como un moho amarillo-verde en cultivo. Como otras especies de *Aspergillus* produce una conidiófora distintiva compuesta de un pedúnculo largo soportando una vesícula inflada. Células conidiógenas sobre la vesícula producen la conidia. Muchas cepas de *A. Flavus* exhiben una fluorescencia verdosa bajo luz UV que esta corelacionada con niveles de producción de aflatoxina.¹⁸

v. **Aspergillus niger**

Aspergillus niger es un hongo y uno de las especies más comunes del género *Aspergillus*. Causa la enfermedad llamada moho negro sobre ciertas frutas y vegetales tales como uvas, cebollas, y maní, y es un contaminante común de las comidas. Es comúnmente reportado en medioambientes cerrados, donde estas colonias negras pueden ser confundidas con *Stachybotrys* (especies de las que también han sido llamados “moho negro”).¹⁹

Algunas cepas de *A. Niger* se ha reportado producen potentes micotoxinas llamadas ochratoxinas,²⁰ pero otras fuentes difieren, alegando a que este reporte está basado en malas identificaciones de especies de hongos. Evidencia reciente sugiere alguna verdad en que cepas de *A. Niger* producen ochratoxina A.^{19 y 21}

2. ANTIFUNGICOS

Extractos de muchas plantas han sido reportadas exhibir propiedades antibacterianas, antifúngicas e insecticidas bajo condiciones de laboratorio. Metabolitos de plantas y pesticidas basados en plantas parecen ser uno de las mejores alternativas y como también estos se conocen tienen un impacto mínimo medioambiental y peligro para consumidores en contraste a los pesticidas sintéticos. Muchas especies de plantas no han sido descritas mucho menos probadas para constituyentes químicos y biológicamente activos y nuevos recursos de pesticidas comercialmente valorables. Esta es la principal causa debido a la escasez de información sobre la screening/evaluación de diversas plantas para sus actividades antibacterianas. Pesticidas derivados de plantas biológicamente activos se esperan jueguen un papel sustancial en estrategias de protección de cosechas. La explotación de químicos naturalmente disponibles de plantas, que retarda la producción de microorganismos indeseables, sería un método más ecológicamente realístico para la protección de plantas y tendría un papel prominente en el desarrollo de pesticidas comerciales en el futuro para estrategia de protección de cosechas, con especial referencia al manejo de enfermedades de plantas.²²

i. Naftoquinonas antifúngicas en plantas carnívoras

Quimioterapia antifúngica esta en constante necesidad de compuestos nuevos y efectivos debido a la variable eficacia y efectos adversos de la droga en uso corriente. Además, el uso intensivo de un número limitado de antifúngicos ha conducido a la rápida evolución de resistencia e incluso resistencia cruzada cuando drogas con modos de acción cercanamente relacionados están en uso.²³

Considerando el número limitado de los agentes antifungicos actualmente disponibles, caracterización de recursos adicionales con diferentes modos de acción es de importancia.²⁴

En la planta jarra, *Nepenthes insignis*, experimentos de alimentación marcado con L-alanina mostro que C2- unidades intactas (acetyl-CoA), producidas por desaminación oxidativa y decarboxilación de L-alanina, sirve como un intermediario en la síntesis de plumbagina (2-metil-5-hidroxi-1,4-naftoquinona). Naftoquinonas, se consideran potenciales drogas antifúngicas, son producidas por muchas plantas que pertenecen a la familia *Caryophyllales*²⁴.

Sin embargo, en estas familias naftoquinonas son sintetizadas principalmente durante estrés, cuando la ruta biosintética del alcaloide isoquinolina. Así que, cuando el paso de transaminación, conduciendo a la biosíntesis de la mitad la isoquinolina, es bloqueado por estreses químicos, físicos o bióticos, solo las Naftoquinonas, por ejemplo, plumbagina y droserona son formados²⁵

Además de la acumulante información acerca del potencial terapéutico de varias Naftoquinonas, su modo de acción exacto no es claro. Dos mecanismos han sido propuestos para la acción citotóxica de quinonas en una variedad de sistemas biológicos²⁶.

ii. Filtrado antifúngico de *Trichoderma sp.* Bol 12 QD-1

El filtrado amarillo de la cepa (*Trichoderma sp.* Bol 12 QD-1) con una concentración de 7,5 mg/ml presenta actividad inhibitoria sobre *Botrytis cinérea*. Además de no ser tóxico ni dañino para la planta, comparando con la actividad del fungicida químico (**Mancozeb**) a una concentración de **0,009 mg/ml**, el cual presenta efectos secundarios sobre la hoja de haba, además de no presentar actividad a esta concentración. Estas observaciones nos inducen a pensar que los pigmentos producidos, posiblemente 4 serían los responsables de conferir la actividad inhibitoria sobre *Botrytis cinerea* y *Alternaria solani*. Así mismo correlaciono pigmentos amarillos producidos por *Aspergillus flavus* y metabolitos

fúngicos. Estos pigmentos fueron aislados luego de realizar pruebas in vitro. Afimando que la formación de los pigmentos amarillos en medio diferencial para *Aspergillus* (ADM) está relacionado a la producción de metabolitos (Acido aspergillico y neoaspergillico).²⁷

iii. **Determinación de inhibición miceliar por método de peso de micelios secos y evaluación de extractos de plantas.**

Se reveló que el peso de micelios secos de los hongos crecidos probados en medio Richard varió con diferentes extractos de plantas. El porcentaje de inhibición de *F. solani* en *Caesalpinia coriaria*, *Decalepis hamiltonii*, *Euphorbia tirucalli* y *Leucas aspera* fueron de 9.0%, 55.3%, 12.6% y 3.0% respectivamente, considerando otros extractos acuosos de plantas no mostraron ninguna actividad antifúngica.

La inhibición de *A. flavus* en *D. hamiltonii* y *E. tirucalli* fueron 73.0% y 2.3%, respectivamente. A parte de estos, ninguna otro extracto de planta mostro ninguna actividad inhibitoria contra *A. flavus*. En contraste, alta actividad significativa de rendimiento se observó en extractos de éter de petróleo. Extractos de benzeno y cloroformo mostraron actividad moderada y mínima contra los hongos, no se considero actividad observada en extractos de metanol y etanol. Entre el rendimiento de hongos *F. moniliforme* fue altamente susceptible en extracto de éter de petróleo y *D. halodes* fue el más susceptible a concentración 2000 µg/ml. Además, la más alta actividad significativa de hongos se observó en extracto de éter de petróleo, no se considero actividad observada contra hongos probados en extractos de cloroformo, etanol and etanol.

Ligera actividad contra hongos fue observado en extracto con benceno. Entre los hongos probados *P. chrysogenum* fue altamente susceptible en extracto de éter de petróleo y *P. griseofulvum* fue menos susceptible a concentración de 2000 µg/ml. Entre los tres fungicidas sintéticos Dithane M-45 mostro menos actividad contra ambos los hongos de campo y guardados. Las actividades antifúngicas de

extractos acuosos y éter de petróleo de *D. hamiltonii* mostraron mejor actividad que fungicidas sintéticamente probados.²⁸

iv. Influencia de polvos de hojas, frutas y semillas y extractos de *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. (Favaceae) en siete hongos.

Los polvos de hojas, frutos y semillas de *Pithecellobium dulce* y semillas extraídas secuencialmente con hexano-diclorometano, acetona y metanol-agua se evaluaron sobre el crecimiento micelial de *Alternaria sp.*, *Botrytis cinerea*, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Pestalotiopsis sp.* y *Rhizopus stolonifer*. Los polvos de semillas tuvieron la más alta actividad fungistática contra los hongos probados en comparación con los polvos de dosis-efecto para las tres concentraciones evaluadas (0.5, 2.0 y 5.0 mg/ml).

Sin embargo, para *P. digitatum* y *Alternaria sp.* la concentración más baja y la más alta, respectivamente, incrementaron el crecimiento micelial. Dependiendo de la concentración, los polvos de hojas y fruto inhibieron o incrementaron el crecimiento micelial. Dependiendo de la concentración, los polvos de hoja y fruto inhibieron o incrementaron el crecimiento micelial. El crecimiento micelial de *Alternaria sp.*, *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, *Pestalotiopsis sp.* y *Rhizopus stolonifer* se incremento sobre los residuos de semillas (10 mg/ml), después de la extracción de hexanodichlorometano, acetona y metanol-agua de polvos de semillas, sugiriendo que los compuestos fungistáticos fueron removidos por los disolventes usados.

El extracto hexano-diclorometano fue sometido a una cromatografía en columna, obteniéndose 13 fracciones con patrones similares, las cuales fueron evaluadas usando la respuesta de crecimiento micelial de *Fusarium oxysporum*, *Penicillium digitatum*, y *Rhizopus stolonifer*. Once y nueve de las fracciones inhibieron el crecimiento de *Fusarium oxysporum*, y *Rhizopus stolonifer*, respectivamente. *Penicillium digitatum* fue el hongo menos afectado por todas las fracciones. El

análisis preliminar de la fracción mas activa por resonancia magnética nuclear indicó la presencia de un triacil glicerol.²⁹

v. Extracto antifúngico de nuez moscada

En una búsqueda por extractos de plantas con potente actividad antifúngica *in vivo* contra varias enfermedades de plantas, encontramos que el tratamiento con un extracto de metanol de *Myristica fragrans* Houttyn (nuez moscada) semillas redujo el desarrollo de varias enfermedades de plantas.

El árbol de nuez moscada, *Myristica fragrans* Houttyn (*Myristicaceae*), es una frondosa de cerca 12m de altura cuando madura. La semilla, comúnmente referida como nuez moscada, es usada para especies y propósitos medicinales tales como actividades carminativas, hipolipidémicos, antitrombóticos, contra la agregación plaquetaria, antifúngicas, afrodisiacas, antigénicos, antiulcerogénicos, inhibitorio arggingipain, nematocidal, antitumoral y anti-inflamatorio.

My. fragrans ha sido reportada contener 25–30% de aceites fijados, 5–15% aceites volátiles y sustancias químicas tales como macelignan, ácido dihidroguairetico, elimicina, y ácido mirístico, miristicina.

Tres lignanos antifungicos fueron aislados de extracto de metanol de semillas de *My. fragrans* e identificados como *eritro*-austrobailignano-6 (EA6), ácido *meso*-dihidroguaiaretic (MDA) y nectandrina-B (NB).

Actividad antimicrobiana *In vitro* de los tres lignanos vario de acuerdo a especies compuestos y objetivos. *Alternaria alternata*, *Colletotrichum coccodes*, *C. gloeosporioides*, *Magnaporthe grisea*, *Agrobacterium tumefaciens*, *Acidovorax konjaci* y *Burkholderia glumae* fueron relativamente sensitivos para los tres lignanos.

In vivo, todos los tres compuestos efectivamente suprimieron el desarrollo de arroz y tizón o moho de hojas de trigo. Además, EA6 y NB fueron altamente activos contra el desarrollo de mildu deleznable del centeno, roya o tizón tardío del

tomate, respectivamente. Ambos MDA y NB también inhibieron moderadamente el desarrollo de roya o tizón de vaina del arroz.³⁰

vi. Aceites esenciales contra *Fusarium oxysporum* y *Alternaria porri*

Fusarium es un patógeno de planta causante de la enfermedad del tizón de varias plantas económicamente importantes y es también conocido producir toxinas se piensa contribuyen a enmohecer por afectar la permeabilidad de membranas celulares y irrumpiendo el metabolismo celular³¹. Varias especies de *Fusarium* son patógenos ampliamente esparcidos sobre cereales de granos pequeños alrededor del mundo y puede causar putrefacción de raíces, tallos y espigas, resultando en reducciones severas en el rendimiento de cosechas, frecuentemente estimados entre 10% y 40%.³²

El tizón de castor causado por *F. oxysporum f. sp. ricini*, es la más será enfermedad de castor en India.³³ Tizón de *Fusarium* en plantas de tomates (*Lycopersicon esculentum* Mill.) causado por *F. oxysporum f. sp. lycopersici* tiene un impacto económico. Como con otras enfermedades de plantas vasculares, control químico no es efectivo y mediciones sanitarias son difíciles de.³⁴

La mayoría de *Alternaria sp.* son parasitarios, causantes de enfermedades de manchas de hojas. *A. solani* causa “tizón-temprano” de papa y otros miembros de la Solanaceae. Varias formas de especies son encontradas como saprobios sobre partes teñidas de plantas en el abono, de los cuales la conidia son recogidas por el viento, y ellos invaden laboratorios donde son problemáticos como contaminantes de cultivos. La enfermedad de la mancha negra de *Alternaria* de semilla-mostaza causada por *A. brassicae* (Berk.) Sacc, en India causa un promedio de rendimiento de 35–40%.³⁵

Compuestos volátiles de plantas, especialmente aceites esenciales, tienen actividades antimicrobianas, fungicidas e insecticidas.³⁶

La efectividad de aceites esenciales de plantas como fumigantes de tierras para manejar moho bacteriano (causado por *Ralstonia solanacearum*) en tomate ha sido estudiado.³⁷

Preliminarmente in vitro y experimentos de invernadero conducidos con varios aceites esenciales de plantas y sus componentes mostraron que algunos aceites esenciales tienen eficacia significativa contra *R. solanacearum*³⁸ y contra varios hongos que nacen el abono.³⁹

Formulaciones de aceite de trébol, aceite de neem, extracto de pimienta y aceite de mostaza, extracto de cassia, aceite sintético de cinnamon fueron probados contra *Phytophthora nicotianae*.⁴⁰

Aceites esenciales de pimienta, mostaza, árbol cassia y enfermedad suprimió el desarrollamiento de la enfermedad de trébol causado por *F. oxysporum f. sp melonis* sobre muskmelon y redujo la densidad de población de *F.oxysporum f. sp chrysanthemi* en experimentos invernadero.⁴¹

Los efectos anti-*Fusarium oxysporum f. sp cicer (FOC)* y anti-*Alternaria porri (A. porri)* fueron evaluados para 75 aceites esenciales diferentes. Los aceites esenciales más activos fueron los de lemongrass, diente de ajo, corteza de cinnamon, hoja de cinnamon, cassia, hinojo, albahaca y primorosa nocturna. Sin embargo, la efectividad de estos aceites esenciales con los hongos probados mostró diferentes respuestas.

El nivel de inhibición fue comparado con Hexaconazol. Análisis GC-MS para cinco aceites entre los 75 aceites esenciales probados fue ejecutado. El potencial de estos aceites esenciales como un ecoamistoso y acercamiento económico como un fungicida para FOC y *A. porri* es discutido. Corteza de Cinnamon, hoja de cinnamon y aceite de cassia estudio para sus actividades antifúngica fueron encontradas ser altamente inhibitorios contra ambos hongos fitopatogénicos.

De los dos hongos, *A. porri* se encontró ser más susceptibles a través de aceites de dientes de ajo, ylang ylang, wintergreen, champa, albahaca, anise, primorosa nocturna, rosemary y thyme, considerando que FOC fue más pronto a través la acción inhibitoria lemongrass, cumina e hinojo como se comparó a *A. porri*.⁴²

vii. Mecanismo de acción de péptidos antifúngicos

Péptidos antifúngicos son clasificados en dos clases basados en su modo de acción.⁴⁴

El primer grupo actúa por lisis, que ocurre vía varios mecanismos.⁴⁵ Los péptidos líticos pueden ser anfipáticos, tener dos caras, con uno siendo positivamente cargado y el otro neutro e hidrofóbico. La segunda clase de péptidos interfiere con la síntesis de pared celular o la biosíntesis de componentes.⁴⁶

Las actividades biológicas de un largo número de toxinas péptidas han sido racionalizadas en términos del tener de los péptidos la habilidad para adoptar estructuras α -helicoidales anfifílicas.⁴⁷

Los péptidos se espera tener valor como agentes alternativos en la lucha contra nuevas cepas microbianas resistentes como ellos tienen modos de acción diferente de aquellos de los clásicos antibióticos. La caracterización de tales nuevos antifúngicos y péptidos antimicrobianos y el diseño de análogos con actividades mejoradas han permitido mejor entendimiento de la relación estructura-actividad de estos péptidos.⁴⁸

IV. DISEÑO METODOLÓGICO

Este trabajo es parte del proyecto biocontroladores de fitopatógenos y Biodiversidad microbiana Programa SIDA/SAREC, la Universidad Mayor de San Andrés, con el Instituto de investigaciones Fármaco Bioquímica (IIFB) área de

Biotecnología y la Lund University, departamento de biotecnología ambiental y el proyecto del IDH.

A. MATERIALES ESPECÍFICOS (VER ANEXOS)

B. METODOS, TECNICAS Y PROCEDIMIENTOS

1. Reaislamiento

Las cepas de hongos se cultivan repetidamente para conservar la línea a la que pertenecen. El método se basa en la toma de tacos de agar con el frente hifal (que es la zona tapizada de hongos); los tacos se los conforman con sacabocados (de diferentes diámetros) que se esteriliza por flameado, se traslada a otro agar PDA con un asa bacteriológica. Todo en condiciones asépticas (usando el campo calórico del mechero Bunsen y la protección de la campana de flujo laminar).

Por otra parte el PDA fue preparado usando la relación 250 gramos de papa, 15 gramos de agar nutritivo y 10 gramos de glucosa por Litro de agua destilada. El cual se autoclava a 1,5 atmosferas por 15 minutos.

Las cepas reaisladas serán incubadas a temperatura ambiente y selladas con PVC en la parte perimetral de la caja petri.

2. Identificación fúngica

Identificar macroscópicamente mediante la morfología de los hongos así como el color y textura. Microscópicamente la forma y características (todo por comparación morfológica con las bibliografía de un atlas de hongos).

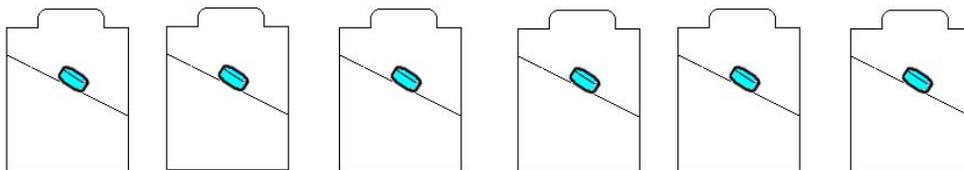
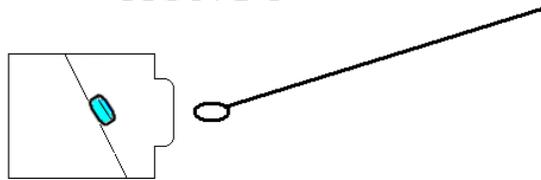
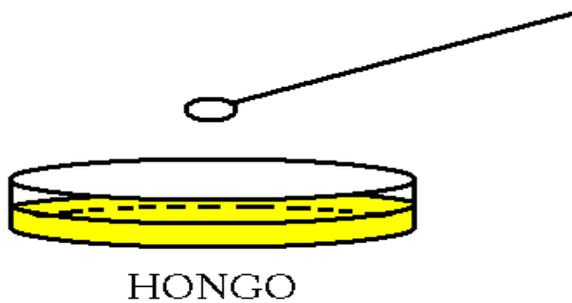
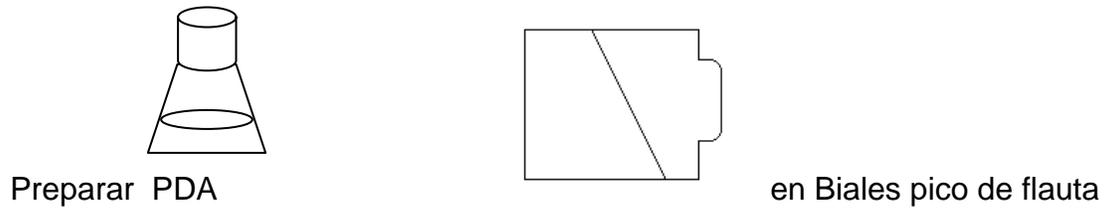
3. Preservación en Glicerol

Se prepara el tampón TANQUAY consistente en glicerol 15ml, Na_2HPO_4 0,1g, KH_2PO_4 0,075g que se disuelven en 85ml de agua destilada posteriormente se esteriliza en autoclave. Por otra parte, se preparan viales con PDA en pico de flauta (todo el material es esterilizado mediante autoclavado, se siembra en estos viales pequeños que contengan 2 terceras partes de agar en pico de flauta. Una

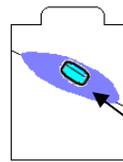
vez hayan crecido cepas en cuestión se vierte el glicerol teniendo cuidado que no rebalse y que cubra todo el agar. Finalmente son guardados a -4°C.

PROTOCOLO PARA CONSERVACIÓN

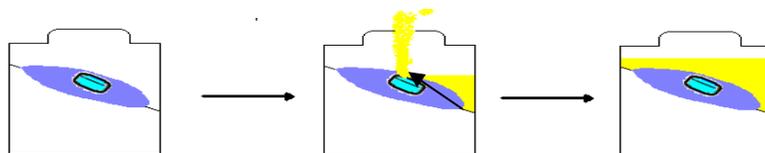
PDA



10 REPETICIONES DE CADA CEPA



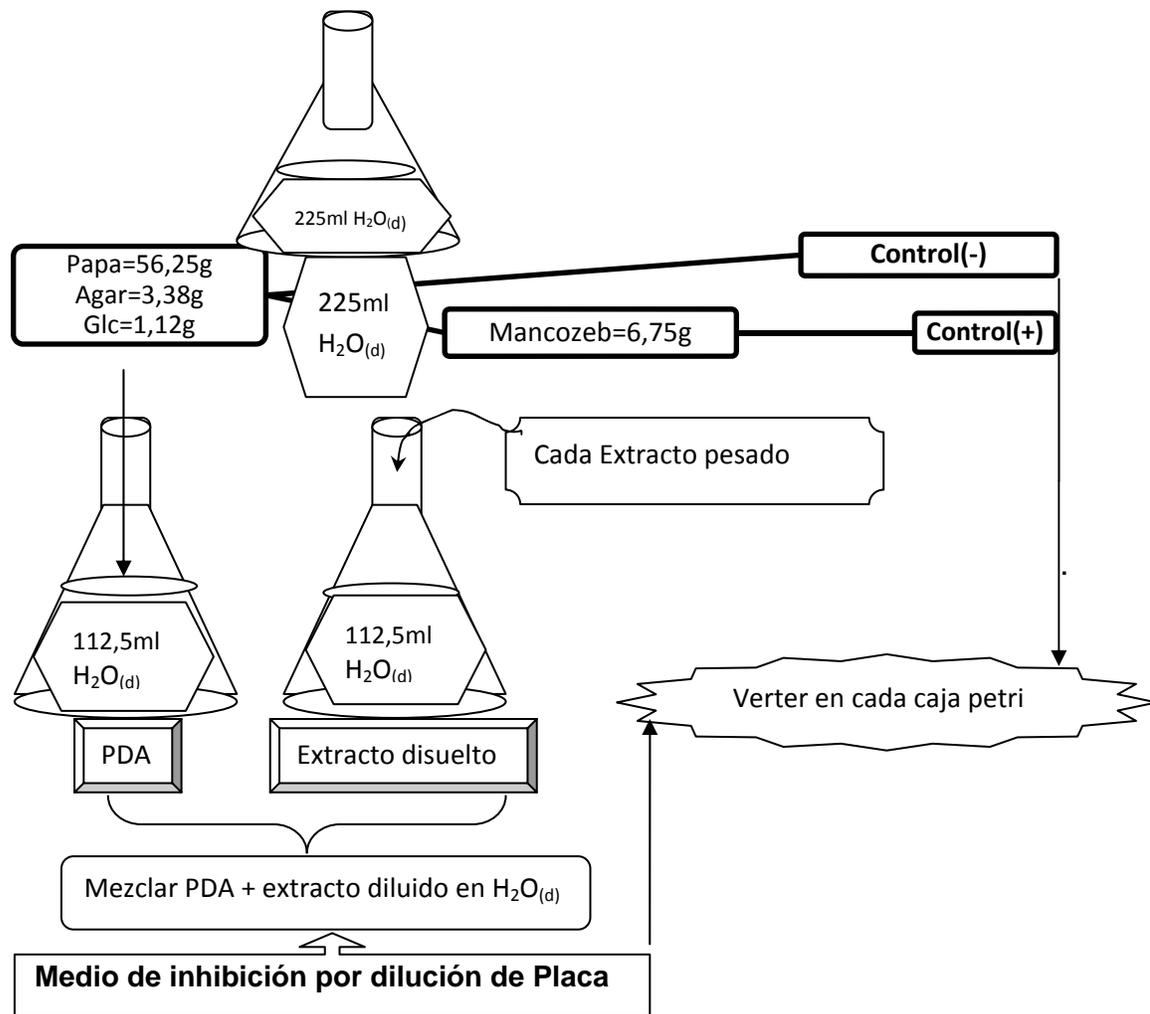
INCUBAR A TEMPERATURA AMBIENTE POR 3 A 5 DIAS (hasta ver desarrollo)



AGREGAR TAMPON TANKUAY O GLICEROL HASTA EL BORDE SUPERIOR
AL 15% Refrigeración 4 °C - 10 °C - 20.

4. Evaluación por el método ensayo de inhibición por dilución de Placa

Se realiza diluyendo los diferentes extractos, previamente pesados, con 112,5ml de agua destilada el cual se mezcla con el PDA preparado para cada extracto en diferentes matraces. Cada matraz de PDA consiste en 1,125g de Glc, 3,375g de agar y 56,25g de papa para 225ml de agua destilada, pero se disolverá con 112,5ml de agua destilada para luego de autoclavar mezclarse con la dilución de cada extracto en 112,5ml lo cual sumará 225ml de PDA + extractos de plantas diluidas (la temperatura del PDA, antes de mezclar con su respectivo extracto, debe ser un poco menos de 36°C). Una vez homogéneamente distribuido cada extracto en su respectivo PDA, se vierte en las respectivas cajas petri (cada extracto se hace por triplicado). Luego, se tiene que sembrar como indica el protocolo de reaislamiento.



5. Evaluación del efecto antifúngico de extractos de plantas contra hongos

Cada día se procede a marcar la circunferencia “perímetro” del avance de crecimiento de los hongos desde que se sembró hasta que este cesa su crecimiento, pues cada cepa fitopatógena de hongo fue sembrada sobre el centro del (PDA+antifúngico).

Luego, cuando el control negativo alcanza el crecimiento máximo, se marca la caja con las coordenadas cartesianas geográficas, para después medir el radio en milímetros en las 8 direcciones Norte, Sur, Este, Oeste, NO, NE, SO y SE. Esta prueba se hará por triplicado para cada hongo y cada extracto, para obtener menos variación en las inhibiciones o efecto biocontrolador.

V.RESULTADOS

A. Efecto antifúngico de extractos contra *Alternaria spp* (Cepa Bol RT-2) *in vitro*

1. Porcentaje de crecimiento en *Alternaria spp* (Bol RT-2)

El porcentaje de crecimiento de *Alternaria spp* (Cepa Bol RT-2), desarrollado *in vitro* mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA, que contienen los extractos 16, IITP-1, IITP-2 e IITP-3 mostrados en la Tabla 1, Gráficos 1 y 2 denota un crecimiento por debajo de los controles negativos a excepción del extracto IITP-2 que mostró un incremento en su crecimiento, desde el día de su inoculación hasta el día 7, por encima de lo esperado. Luego del séptimo día se iguala el crecimiento rítmico para coincidir con el control negativo.

El único dato de importancia en cuanto a porcentaje se refiere es el crecimiento disminuido debido al efecto del extracto IITP-1 (concentración = 1,8 mg/ml) sobre *Alternaria spp* (Bol RT-2) en el noveno día de unos **65,03%** de crecimiento **+/- 6,97 % y CV = 30,9% es decir 12,15mm +/- 2,42mm y CV= 10,72 %**. Además tiene porcentajes de crecimiento disminuidos desde el cuarto día ver anexos. Consecuentemente, ya desde el cuarto día IITP-1 muestra efectos de disminución

de crecimiento a comparación con el control negativo o lo que llamaríamos inhibición de que *Alternaria spp* (Bol RT-2) siga creciendo.

Consecuentemente, el extracto IITP-1 sobre *Alternaria spp* (Bol RT-2) en el noveno día de unos 65,03% tiene 2,88 mm de velocidad de crecimiento por día (ver tabla N°2) menor a la velocidad de crecimiento del control negativo que es de 3,47 mm/día (ver tabla N°2). Lo que indica una inhibición en el crecimiento de *Alternaria spp* (Bol RT-2) por el extracto IITP-1 en cada día como se ve en la gráfica N°1 donde se denota decremento en el crecimiento de *Alternaria spp* (Bol RT-2).

Tabla 1. Porcentaje de Crecimiento de *Alternaria spp* (Cepa Bol-RT2)

Días	1	3	6	9
16	25,01	46,37	71,69	94,81
IITP-1	27,77	53,27	65,03	65,03
IITP-2	29,87	61,79	79,34	99,18
IITP-3	25,43	40,19	62,63	99,10
Control(+)	0,00	0,00	0,00	0,00
Control(-)	27,05	51,89	76,42	100,00

Tabla 2. Nótese como IITP-1 va disminuyendo el porcentaje de crecimiento gradualmente día a día a diferencia de los otros extractos y el mismo control negativo.

Tabla 2. Velocidad de crecimiento de *Alternaria spp* (Cepa Bol-RT2)

Días	Velocidad de crecimiento mm/día
16	3,42
IITP-1	2,88
IITP-2	3,41
IITP-3	3,42
Control(+)	0
Control(-)	3,47

Tabla 2. Nótese como la velocidad de crecimiento es mínima para IITP-1 de 2,88mm/día a comparación de 3,47mm/día y obviamente el resto.

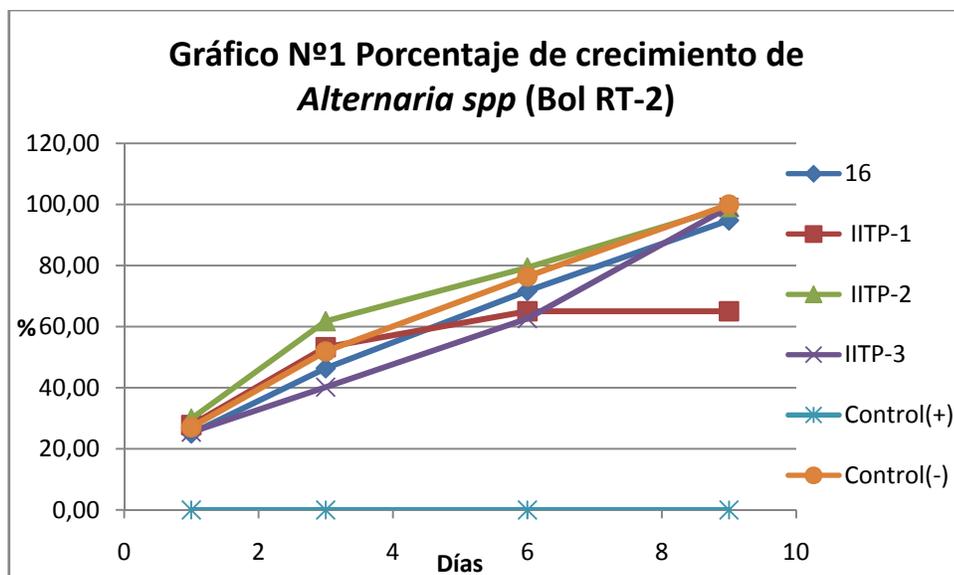
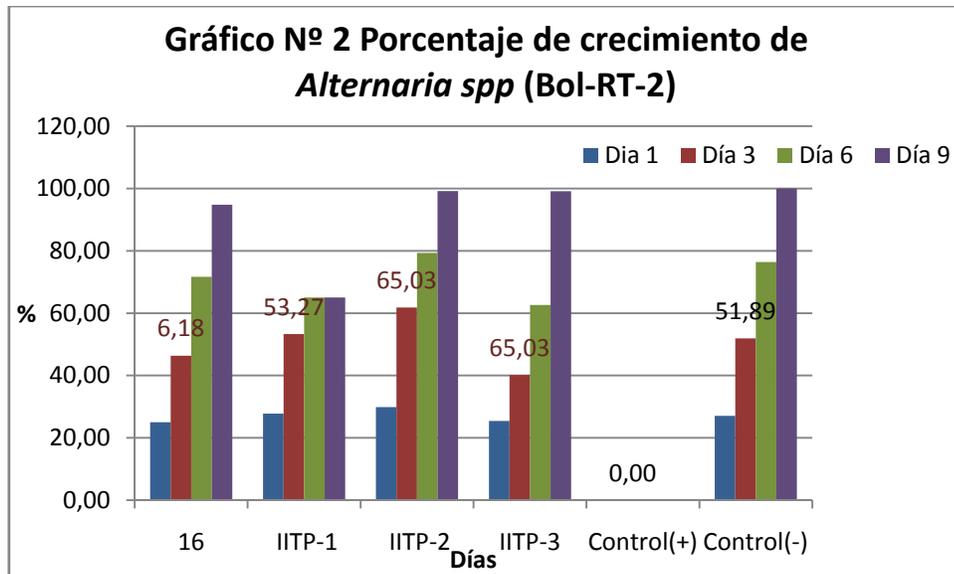


Gráfico N°1 Nótese como influye el extracto vegetal IITP-1 en la disminución del crecimiento de la cepa *Alternaria spp* (Bol RT-2).

El extracto vegetal 16 no inhibió como se esperaba, nota que este extracto se tuvo guardado por mucho tiempo (fue usado en una prueba por Univ. Reynaldo Tenorio Pari tesis en proceso), consecuentemente su principio activo se pudo haber perdido. Sin embargo extracto 16 inhibe el crecimiento en un 94,81% el noveno día que deja mucho que desear. Extracto 16 tiene 3,42 mm/día de velocidad de crecimiento ligeramente menor al control negativo de 3,47mm/día.

El extracto IITP-2 demostró un incremento en su crecimiento desde su inoculación hasta el día séptimo con comportamiento igual a la velocidad de crecimiento del control negativo. IITP-2 tiene un 99,18 % el día 9. El extracto IITP-3 de igual manera un 99,1% en su crecimiento, ambos IITP-2 y 3 al parecer no tienen cualidades antifúngicas.



Gráfica N°2 Porcentaje de crecimiento de *Alternaria spp* (Bol-RT-2) disminuido sustancialmente por el extracto vegetal IITP-1.

Figura N°1 Crecimiento de *Alternaria spp* (Cepa Bol RT-2) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que contienen el extracto IITP-1, por triplicado.

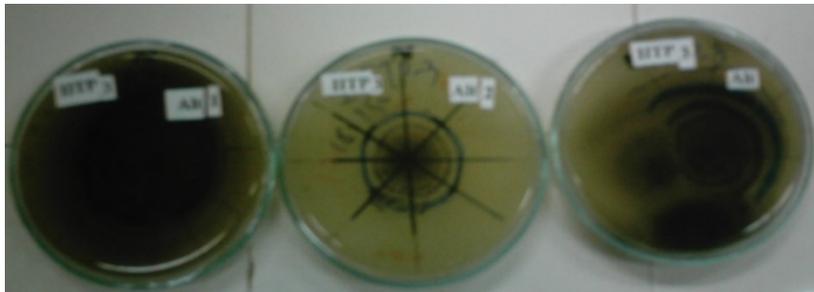


Figura N°2 CONTROL NEGATIVO Crecimiento de *Alternaria spp* (Cepa Bol RT-2) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que no contienen antifúngico, por triplicado.

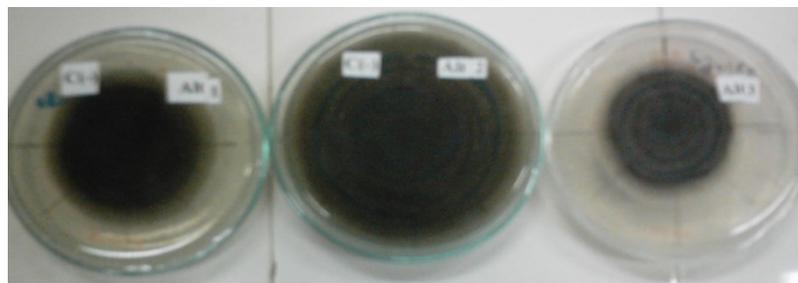
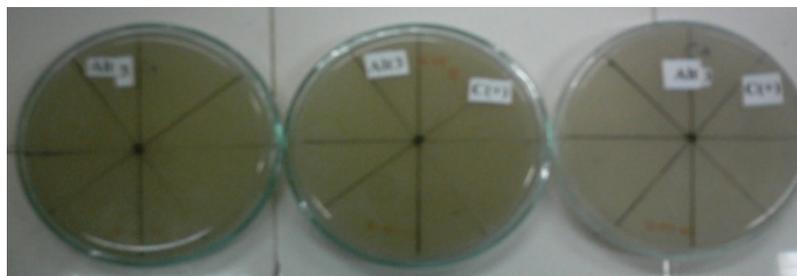


Figura N°3 CONTROL POSITIVO Crecimiento de *Alternaria spp* (Cepa Bol RT-2) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que contienen Mancozeb como antifúngico, por triplicado.



1. Porcentaje de crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1)

El porcentaje de crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1), desarrollado in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución de Placa en medio PDA, contra los extractos 16, IITP-1, IITP-2 e IITP-3 que se muestran en la Tabla 3 y Gráfica 3 y 4 muestran resultados relevantes solo para IITP-1 e IITP-2. Ambos extractos muestran porcentajes de crecimiento de 82,39% IITP-1 y 82,32% IITP-2. Inhibición de 18 % a comparación del control negativo. El porcentaje de crecimiento disminuye drásticamente desde el día 3 hasta el 7 para IITP-1. Mientras para IITP-2 continua disminuyendo luego del séptimo día (ver anexos).

Tabla 3 Porcentaje de crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1)

Días	1	3	7	9
16	21,31	45,64	82,23	97,31
IITP-1	27,3	56,48	80,91	82,32
IITP-2	26,12	60,91	85,95	82,39
IITP-3	22,77	50,21	91,23	97,31
Control(+)	0,00	0,00	0,00	0,00
Control(-)	28,34	54,95	100,00	100,00

Tabla 3 Porcentaje de crecimiento disminuido para *Fusarium* a causa de los extractos IITP-1 y 2 de hasta un 82%.

Tabla 4 Velocidad de crecimiento de

Días	Velocidad de crecimiento mm/día
16	3,43
IITP-1	3,31
IITP-2	3,55
IITP-3	3,55
Control(+)	0
Control(-)	3,59

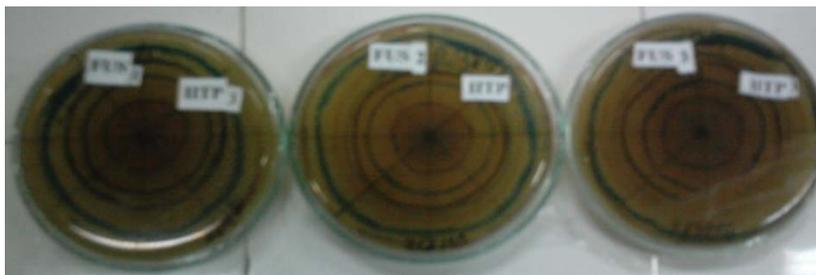
Tabla 4 Velocidad de crecimiento disminuida notablemente para IITP-1 de 3,31mm/día a comparación de Control negativo 3,59mm/día

i. Porcentaje de crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1) disminuido por extracto vegetal IITP-1

El extracto IITP-1 (Concentración = 1,8 mg/ml) alcanza un porcentaje de crecimiento de **82,32 +/- 5,7 % y Coeficiente de Varianza de 15,9%**. Es decir **36,38mm +/- 2,55mm** la desviación estándar denota algo de variación, por lo que la inhibición es relativamente aceptable. Se necesitan más estudios.

La velocidad de crecimiento del extracto IITP-1 es de 3,31 mm/día el cual difiere del control negativo "pues ha disminuido su velocidad de crecimiento" desde 3,59 mm/día a 3,31 mm/día, por lo que se denota una notable influencia del extracto IITP-1 que actúa y/o se comporta como antifúngico.

Figura N°4 Crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que contienen el extracto IITP-1, por triplicado.



ii. Porcentaje de crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1) disminuido por extracto vegetal IITP-2

El extracto IITP-2 de (C=0,9 mg/ml) en el noveno día alcanza un porcentaje de crecimiento de **82,39 +/- 4,46 % y CV = 12,24%**. Es decir **36,41mm +/- 1,97mm** la desviación estándar denota algo de variación, por lo que la inhibición es relativa pero ligera aceptación como antifúngico.

La velocidad de crecimiento del extracto IITP-2 es de **3,55 mm/día** el cual difiere levemente del control negativo que es de 3,59 mm/día, por lo que se denota una notable influencia del extracto IITP-2 que actúa o se comporta como antifúngico.

Figura N°5 *Crecimiento de Fusarium spp (Bol - RT-1) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que contienen el extracto IITP-2, por triplicado.*

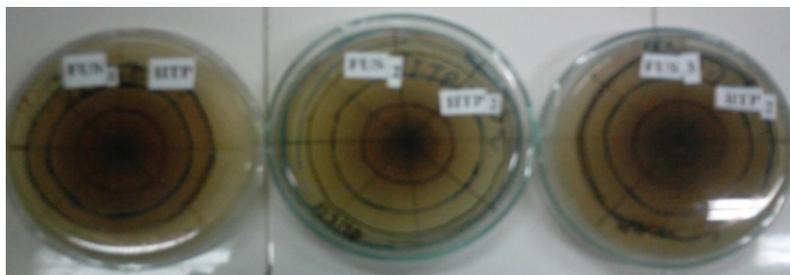


Figura N°6 CONTROL NEGATIVO *Crecimiento de Fusarium spp (Bol - RT-1) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que no contienen antifúngico alguno, por triplicado.*



Figura N°7 CONTROL POSITIVO *Crecimiento de Fusarium spp (Bol - RT-1) in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA que contienen antifúngico Mancozeb, por triplicado.*



iii. **Porcentaje de crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1) disminuido por extracto vegetal IITP-3 y 16.**

Extracto IITP- 3 provoca un crecimiento ligeramente ascendente en el séptimo día, a diferencia del extracto 16 que se comporta paralelo al control negativo pero con velocidad de crecimiento de 3,55 mm/día.

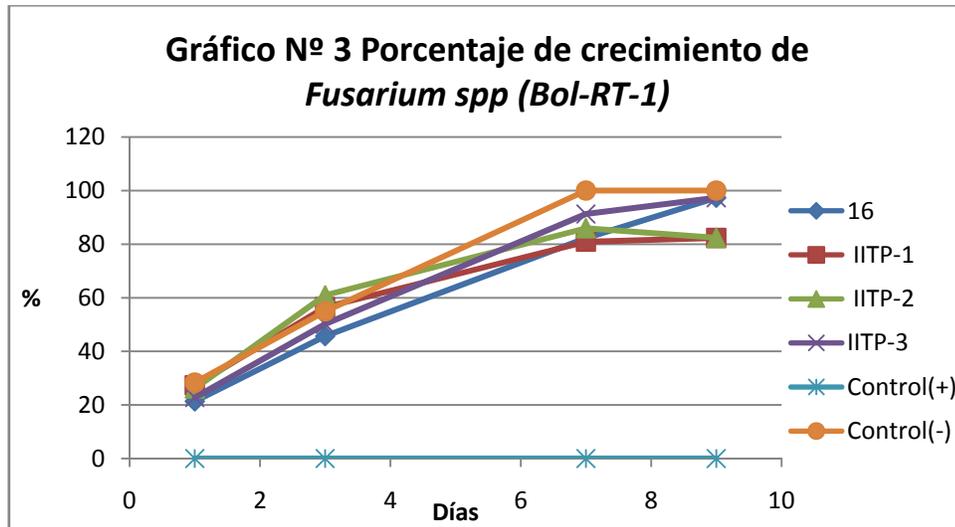


Gráfico N°3 Notese como los extractos IITP-1 y 2 van disminuyendo desde el día de su inoculación hasta llegar a un 82% ambos.

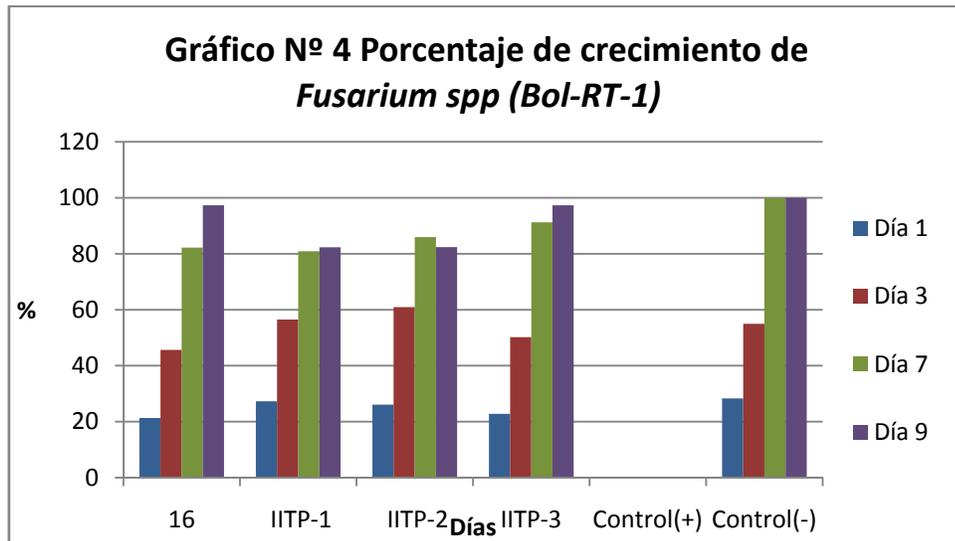


Gráfico N°4 Nótese que el crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1) sigue un parámetro paralelo del crecimiento al de *Alternaria spp* (Bol RT-2) si comparamos la influencia de los extractos.

El extracto vegetal 16 tiene 97,31% de crecimiento con 3,43mm/día de velocidad de crecimiento e IITP-3 97,3% de crecimiento con 13,55 mm/día de velocidad de crecimiento. Una inhibición mucho menor de lo esperada en el noveno día. Por lo que, ambos extracto IITP-3 y 16 no tienen cualidades antifúngicas.

VI. DISCUSION

Las plantas de mundo son un rico suministro de químicos naturales que podrían ser explotados para uso como pesticidas. El número total de químicos de plantas puede exceder los 4.000.000 y de estos 10.000 son reportados ser encontrados metabolitos secundarios quienes juegan un papel mayor en las plantas es defensivo.⁴⁹ Las plantas son mucho más importantes en la producción de componentes orgánicos, farmacéuticos y pesticidas económicamente importantes.

50

La explotación de químicos disponibles naturalmente de plantas, que retardan la producción de microorganismos indeseables, podrían ser un método más realístico y que suena ecológico para la protección de plantas y tendrá un papel prominente en desarrollo de pesticidas comerciales futuros para estrategia de protección de cosechas, con una especial referencia para el manejo de enfermedades de plantas.⁵¹ Las especies de *Fusarium* se encuentran en los vegetales antes de la cosecha. Como persisten en los productos almacenados, si la actividad del agua lo permite crecerán causando alteraciones y a veces produciendo toxinas. Salvo *F. culmorum*, los fusarios no compiten bien con las especies de *Aspergillus* y *Penicillium*.⁵² Varios estudios continúan explorando el potencial de aceites esenciales como agentes antifúngicos.⁵³

Considerando que los extractos vegetales son prometedores antifungicos en el control fúngico en cosechas. El presente trabajo estudio cuatro extractos vegetales de códigos 16, IITP-1, IITP-2 e IITP-3 que han sido estudiados contra hongos fitopatógenos como *Fusarium spp* (Cepa BOL RT-1), *Alternaria spp* (Cepa BOL RT-2), *Ulocladium* (Cepa BOL RQ-2), *Aspergillius flavus* (Cepa BOL JR-1) y

Aaspergillus niger (Cepa BOL JR-2). Sin embargo, *Fusarium spp* (Cepa BOL RT-1) y *Alternaria spp* (Cepa BOL RT-2) cumplieron los parámetros de crecimiento homogéneo acorde al control negativo y se comportaron según lo esperado.

Algunas cepas solo se descartaron porque no se nos permitió reportar los datos de los extractos de saponinas y otros extractos también por derechos de autor de la facultad de Ciencias Puras, carrera de Química. Por lo que respetamos su decisión y agradecemos su colaboración en el presente trabajo. No obstante y quede claro, las cepas fúngicas fueron aisladas en el IIFB de la FCFyB.

La evaluación de inhibición por dilución de Placa en medio PDA *in vitro* que contenía los extractos 16, IITP-1, IITP-2 y IITP-3 que se probaron con las cepas *Fusarium spp* (Cepa BOL RT-1) y *Alternaria spp* (Cepa BOL RT-2) mostraron una tasa de crecimiento armónica y esperada comparada con el control negativo Mancozeb (Dithane de concentración 60g/20litros). Aplicaciones de fungicidas como **mancozeb** o clorotalonil, que se realizan para controlar la ranca controlan también al tizón temprano. En trabajos realizados en San Ramón, Perú, se comprobó que combinando dyrene y mancozeb, se controla eficientemente la enfermedad⁵⁴.

A. Los porcentajes de crecimiento de *Alternaria spp* (Cepa Bol RT-2)

Los porcentajes de crecimiento de *Alternaria spp* (Cepa Bol RT-2), desarrollado *in vitro* mediante el ensayo de inhibición por dilución en placa en medio PDA, que contienen los extractos 16, IITP-1, IITP-2 e IITP-3 mostrados en la Tabla 1, Gráficos 1 y 2 denota un crecimiento por debajo de los controles negativos a excepción del extracto IITP-2 que mostró un incremento en su crecimiento, desde el día de su inoculación hasta el día 7, por encima de lo esperado. Luego del séptimo día se iguala el crecimiento para coincidir con el control negativo.

El crecimiento de las cepas tratadas con diferentes extractos mantiene el mismo compás y ritmo. Otras observaciones notables son que todos los extractos muestran velocidades de crecimiento de 3,42% mm/día, 3,42% mm/día, 3,41%

mm/día y 2,88%mm/día menores al control negativo 3,47 mm/día, indicando un efecto positivo en la inhibición de crecimiento de hongos fitopatógenos.

1. Extracto IITP-1 tiene un efecto de disminución de crecimiento en *Alternaria spp (Bol RT-2)*

El único dato significativo de crecimiento disminuido se debe al efecto del extracto IITP-1 (concentración = 1,8 mg/ml) sobre *Alternaria spp (Bol RT-2)* en el noveno día de unos 65,03% +/- 6,97 % y CV = 30,9% es decir 12,15mm +/- 2,42mm de crecimiento. A pesar de su gran desviación estándar el porcentaje de inhibición es prometedor. Además tiene porcentajes de crecimiento disminuidos desde el cuarto día ver anexos. Consecuentemente, ya desde el cuarto día IITP-1 muestra efectos de disminución de crecimiento a comparación con el control negativo o lo que llamaríamos inhibición de que *Alternaria spp (Bol RT-2)* siga creciendo.

Consecuentemente, el extracto IITP-1 sobre *Alternaria spp (Bol RT-2)* en el noveno día de unos 65,03% tiene 2,88 mm de velocidad de crecimiento por día (ver tabla N°2) menor a la velocidad de crecimiento del control negativo que es de 3,47 mm/día (ver tabla N°2). Lo que indica una inhibición en el crecimiento de *Alternaria spp (Bol RT-2)* por el extracto IITP-1 en cada día como se ve en la gráfica N°1 donde se denota decremento en el crecimiento de *Alternaria spp (Bol RT-2)*. Lo más relevante de la inhibición de IITP-1 es que esta inhibición luego del noveno día se mantuvo constante. Estudios empleando extractos vegetales de 20 plantas seleccionadas mostraron que un porcentaje superior al 30% de actividad inhibitoria contra *M. fijiensis*, entre las cuales sobresalieron *Syzygium aromaticum* con mayor poder antifúngico, seguido por *Commelina difusa*, *Momordica charantia*, *Pavonia sp.*, *Plenax sp.*, *Piper hispidum*, *Piper peltatum* y *Sida rhombifolia* y *Syzygium aromaticum*. Estos estudios han mostrado que algunos agentes protectores o inductores de resistencia por su actividad como antifúngicos, son: cumarinas, compuestos fenólicos, flavonoides, saponinas y quinonas. También, se ha determinado que algunos de estos metabolitos secundarios hacen parte del repertorio de las sustancias que sirven de defensa de

las plantas, entre estos se encuentran los alcaloides, terpenoides, y fenilpropanoides. Igualmente, se conoce que algunas fitoalexinas tipo flavonoides, terpénicas y sesquiterpénicas intervienen en la protección de las plantas contra los microorganismos.⁵⁵ Sin embargo, se desconoce el tipo de extracto de IITP-1, no obstante, alguno de estos componentes debe actuar igualmente como lo hacen en la referencia.

2. Los extractos 16, IITP-2 y 3 no disminuyen el crecimiento de *Alternaria spp* (Bol RT-2)

El extracto vegetal 16 no inhibió como se esperaba, nota que este extracto se tuvo guardado por mucho tiempo, consecuentemente su principio activo se pudo haber perdido. Sin embargo extracto 16 inhibe el crecimiento en un 94,81% el noveno día que es aceptable solo si su desviación estándar fuese de 1% pero es mucho mayor. Extracto 16 tiene 3,42 mm/día de velocidad de crecimiento ligeramente menor que control negativo de 3,47mm/día. El extracto 16 pudiese tener un leve efecto en la disminución del crecimiento de *Alternaria spp* (Bol RT-2) en el noveno día con un porcentaje de crecimiento de 94,81 % y velocidad de crecimiento de 3,42 mm/día. Pero como ya se menciona este extracto fue guardado en el refrigerador por un periodo largo de meses.

El extracto IITP-2 demostró un incremento en su crecimiento desde su inoculación hasta el día séptimo donde iguala los parámetros esperados del control negativo. IITP-2 tiene un 99,18 % el día 9. El extracto IITP-3 de igual manera un 99,1% en su crecimiento, ambos IITP-2 y 3 no tienen cualidades antifúngicas. Por lo que se descarta su uso como biocontrolador de fitopatógenos fúngicos.

B. El porcentaje de crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1)

El porcentaje de crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1), desarrollado in vitro mediante el ensayo de inhibición por dilución de Placa en medio PDA, contra los extractos 16, IITP-1, IITP-2 e IITP-3 que se muestran en la Tabla 3 y Gráfica 3 y 4 muestran resultados relevantes solo para IITP-1 e IITP-2. Ambos extractos muestran porcentajes de crecimiento de 82,39% IITP-1 y 82,32% IITP-2. Ambos

extractos tienen cualidades prometedoras en el combate con los fitopatógenos. Inhibición de 18 % a comparación del control negativo. El porcentaje de crecimiento disminuye drásticamente desde el día 3 hasta el 7 para IITP-1. Mientras para IITP-2 continua disminuyendo luego del séptimo día (ver anexos).

1. Crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1) disminuido por extracto vegetal IITP-1 y 2

Fusarium es un hongo de temperatura cálidas el desarrollo óptimo se presenta a 20 °C el rango va de 12 a 28°C. Esta temperatura acompañada de alta humedad relativa, días cortos de baja intensidad lumínica favorecen el desarrollo de la enfermedad. Otros factores son los suelos ácidos, arenosos, con bajo pH, pobres en nitrógeno y alto suministro de potasio. Las heridas ocasionadas a las raíces por maquinaria o nematodos como es el caso de *Melodogyne incognita* aumentan la susceptibilidad al marchitamiento y favorece el desarrollo del hongo. El hongo sobrevive en restos de cultivo de una temporada a otra y posee estructuras de resistencia que le permiten perdurar en el suelo por espacio de 6 años. Es favorecido por temperaturas cálidas (20°C) asociada a alta humedad relativa. El hongo penetra en la planta a nivel del suelo ya sea por el tallo o raíces superficiales, luego por los haces vasculares es trasladado a toda la planta. Existen tres razas del hongo numeradas del uno al tres, esto obedece al orden cronológico en que fueron descubiertas. El manejo de esta enfermedad es basado en la siembra de variedades resistentes.⁵⁶

i. El extracto IITP-1 disminuye el porcentaje de crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1)

El extracto IITP-1 de 1,8 mg/ml alcanza un porcentaje de crecimiento de **82,32 +/- 5,7 % y 15,9% de CV. Es decir 36,38mm +/- 2,55mm** la desviación estándar denota algo de variación, por lo que la inhibición es aceptable a pesar de no ser menor al 1% al menos. Pudo haber variación por la concentración del extracto o que el principio activo está en compañía de otros componentes propios del extracto.

La velocidad de crecimiento del extracto IITP-1 es de 3,31 mm/día el cual difiere del control negativo “pues ha disminuido su velocidad de crecimiento” desde 3,59 mm/día a 3,31 mm/día, por lo que se denota una notable influencia del extracto IITP-1 que actúa y/o se comporta como antifúngico. Estos resultados son pues favorables a la búsqueda de un extracto antifúngico ecológicamente amigable con el medio ambiente. Y responden a los objetivos de esta investigación *in vitro*.

ii. El extracto IITP-2 disminuye el porcentaje de crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1)

Similarmente, el extracto IITP-2 de 0,9 mg/ml en el noveno día alcanza un porcentaje de crecimiento de **82,39 +/- 4,46 % y CV = 12,24%**. Es decir **36,41mm +/- 1,97mm**, la desviación estándar denota algo de variación, por lo que la inhibición es aceptable. Otro dato prometedor para el manejo integrado de plagas como son los hongos fitopatógenos tales como *Fusarium spp* (Bol - RT-1). Siendo que inhibe a esta cepa se deberá realizar posteriores estudios.

La velocidad de crecimiento del extracto IITP-2 es de **3,55 mm/día** el cual difiere levemente del control negativo que es de 3,59 mm/día, por lo que se denota una notable influencia del extracto IITP-2 que actúa o se comporta como antifúngico.

2. El extracto IITP-3 y 16 no disminuyen el porcentaje de crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1)

Por otra parte, cada cepa que se encuentra por debajo de los parámetros del control negativo se comporta similar en su crecimiento. No obstante, con ligeras variaciones. Es decir, para el extracto IITP- 3 su crecimiento asciende ligeramente en el séptimo día, a diferencia del extracto 16 que se comporta paralelo al control negativo pero con velocidad de crecimiento de 3,55 mm/día. Nótese que el crecimiento de *Fusarium spp* (Bol - RT-1) sigue un parámetro paralelo del crecimiento al de *Alternaria spp* (Bol RT-2) si comparamos la influencia de los extractos.

El extracto vegetal 16 tiene 97,31% de crecimiento con 3,43mm/día de velocidad de crecimiento e IITP-3 97,3% de crecimiento con 13,55mm/Día de velocidad de crecimiento. Una inhibición mucho menor de lo esperada en el noveno día. Por lo que, ambos no tienen cualidades antifúngicas.

Algunas recomendaciones en el manejo de la enfermedad. Luego que el hongo penetra al tejido vegetal, no existe control químico efectivo para esta enfermedad. La utilización de variedades resistentes es la medida más adecuada para el manejo de *Fusarium oxysporum f.sp lycopersici*. En el mercado existen variedades con resistencia a las razas 1 y 2 y en menor proporción a la raza 3. Esta resistencia puede perderse cuando se producen heridas ya sea por nematodos o por el laboreo. Por lo tanto el suelo libre de nematodos así como evitar la rotura de raíces al laborear el suelo contribuirá a mantener la sanidad del cultivo. Las plantas enfermas deben eliminarse lo más pronto posible a efectos de reducir el inóculo. Las rotaciones con cultivos no huéspedes como el caso de lechuga, acelga. Entre otros son necesarias para el manejo adecuado de la enfermedad.⁵⁷

Desviación estándar puede ser influida por la cantidad de unidades formadoras de colonias, la pericia en la inoculación del taco que contiene la cepa y la naturaleza integral de los extractos. Polvos de hojas y frutas pueden causar inhibición y estimulación de crecimiento micelial para los siete hongos, como previamente demostrado por Bautista.⁵⁸

Es así que, posteriores pruebas deberían realizarse en un número más ampliado de cepas fitopatógenas. El uso sinérgico de ambos extractos IITP-1 e IITP-2 en un futuro debería ser probados tanto en *condiciones in vitro*, *in vivo* (cosechas de plantas) y post cosecha de estas. Recientemente el uso de químicos fungicidas ha caído desfavorablemente por sus efectos tóxicos sobre organismos que no son objetivos y la contaminación del medio ambiente.⁵⁹ Por lo que estos extractos serán económicamente producidos y amigables con el medioambiente.

VII. CONCLUSIONES

Se determinó el porcentaje de crecimiento de fitopatógenos *Fusarium spp* (Cepa BOL RT-1), *Alternaria spp* (Cepa BOL RT-2) sometidos a los extractos vegetales, pero no así de *Ulocladium* (Cepa BOL RQ-2) porque sus halos de crecimiento no fueron uniformes, los de *Aspergillus flavus* (Cepa BOL JR-1) y *Aspergillus niger* (Cepa BOL JR-2) tuvieron esporas y colonias dispersadas pero aun así sometidos a los extractos vegetales, que funcionen como antifúngicos, por ensayo de inhibición por dilución de Placa tuvieron efecto nulo.

Se determinó el porcentaje de crecimiento y velocidad de crecimiento de cepas fitopatógenas *Fusarium spp* (Cepa BOL RT-1), *Alternaria spp* (Cepa BOL RT-2) **sometidas a saponina de quinua, extracto 16**, que funciona como antifúngico, por ensayo de inhibición por dilución de Placa ser de 97, 31% de crecimiento con 3,43mm/día velocidad de crecimiento en el noveno día.

Se determinó el porcentaje de crecimiento y velocidad de crecimiento de fitopatógenos *Fusarium spp* (Cepa BOL RT-1), *Alternaria spp* (Cepa BOL RT-2) sometidos a extractos vegetales, que funcionen como antifúngicos, por ensayo de inhibición por dilución en Placa:

Para *Alternaria spp* (Bol RT-2)

Porcentaje de inhibición

Es de 34,97% +/- 6,97 % y CV= 30,9% de *hasta el noveno día* y velocidad de crecimiento de 2,88 mm/día.

La disminución en el porcentaje de crecimiento

Para *Alternaria spp* (Bol RT-2) es de 65,03% +/- 6,97 % y CV = 30,9% es decir 12,15mm +/- 2,42mm y CV= 10,72mm.

Para *Fusarium spp* (Bol - RT-1)

El porcentaje de inhibición

En **IITP-1** es de 17,68% +/- 5,7 % y 15,9% de CV. La tasa de crecimiento del extracto IITP-1 es de 5,30mm/día.

En **IITP-2** fue de 17,61% +/- 4,46 % y 12,24% de CV. La tasa de crecimiento del extracto IITP-2 es de 5,48mm/día.

Disminución en el porcentaje de crecimiento

Para IITP-1 es de 82,32 +/- 5,7 % y 15,9% de CV. Es decir 36,38mm +/- 2,55mm y CV= 7,01mm para IITP-1. La velocidad de crecimiento del extracto IITP-1 es de 3,31 mm/día.

Para IITP-2 de 82,39 +/- 4,46 % y CV = 12,24%. Es decir 36,41mm +/- 1,97mm y CV= 5,41mm. La velocidad de crecimiento del extracto IITP-2 es de **3,55 mm/día**

Se reporto que los extractos vegetales con efecto antifúngico contra las cepas fitopatógenas mediante el **ensayo de inhibición por dilución de Placa fueron** IITP-1 que inhibió el crecimiento de *Alternaria spp* (Bol RT-2) e IITP-1 e IITP-2 inhibió a *Fusarium spp* (Bol - RT-1).

VIII. BIBLIOGRAFÍA

¹ Lacey J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored

² Dennis y Jeremy Leggett, El agua en peligro.

³ J.P. Felix D'Mello, Ann M.C. Macdonald, David Postel, Wilko T.P. Dijkma, Aude Dujardin¹ and Cristina M. Placinta, Pesticide Use and Mycotoxin Production in *Fusarium* and *Aspergillus* Phytopathogens

⁴ Informe del perfil de mercado corepondiente al resultado 3 de la consulñtoria "evaluacion del impacto comercial del biocomercio en Bolivia –situacion alcuay y perspectivas. Ver enlace http://www.ibce.org.bo/documentos/res_perfil_castana_CB01.pdf

⁵ Bravo, L.L., Bermudez, T.K. y Montes, B.R. 2000. Inhibición de *Fusarium moniliforme* mediante polvos vegetales y algunos compuestos químicos. *Manejo integrado de Plagas* 57:29-34.

⁶ http://www.ibce.org.bo/Documentos/exportacion_quinoa.htm Fuente: www.jornadanet.com, 02/04/07

⁷ Goycoolea, F.; E. Agulló y R. Mato. 2004. Fuentes y Procesos. En: Quitina y Quitosano: obtención, caracterización y aplicaciones. Fondo Editorial del Pontificia Universidad Católica del Perú. Ana Pastor Editora. Cap 3 p 105.

⁸ Cristóbal LÁREZ VELÁSQUEZ, Algunas potencialidades de la quitina y el quitosano para usos relacionados con la agricultura

⁹ Stermitz, F.R., M.A. Caolo & J.A. Swinehart. 1980. Alkaloids and other constituents of *Zanthoxylum Williamsii*, *Z. Monophyllum* and *Fagara*. *Phytochemistry* 19: 1464-1472.

¹⁰ Couillerot, E., C. Caron, J.C. Audran, J.C. Jordillier & J.C. Chenieux. 1996. Furoquinoline alkaloids accumulation in *Fagara zanthoxyloides* cell cultures is highly dependent on the presence of exogenous benzylamino purine. *Plant-growth regul.* Kluwer Academic Publishers-Dordrecht. 3: 203-206.

¹¹ Andersen B *et al.* 2001. Chemical and morphological segregation of *Alternaria alternata*, *A. gaisen* and *A. longipes*. *Mycological Research* 105: 291-299.

¹² www.jornadanet.com, 02/04/07
http://www.ibce.org.bo/Documentos/exportacion_quinoa.htm

¹³ Leonor Carrillo. «7. *Alternaria*», *Los hongos de los alimentos y forrajes*, pp. 81-86.

¹⁴ [<http://www.tni.org/docs/200705111419584743.pdf> Evaluating Mycoherbicides for Illicit Drug Crop Control: Rigorous Scientific Scrutiny is Crucial]».

¹⁵ <http://www.vironix.com/what-is-IAQ/library-mold/Ulocladium/>

¹⁶ <http://www.vironix.com/what-is-IAQ/library-mold/Ulocladium/>

¹⁷ Klich MA. (2007). *Aspergillus flavus*: the major producer of aflatoxin. *Molecular Plant Pathology* 8(6): 713-22.

¹⁸ Crawford JM, *Liver and Biliary Tract*. Pathologic Basis of Disease, ed. Kumar V, et al. 2005, Philadelphia: Elsevier Saunders. p. 924

-
- ¹⁹Samson RA, Houbraeken J, Summerbell RC, Flannigan B, Miller JD (2001). *Common and important species of fungi and actinomycetes in indoor environments*. In: *Microorganisms in Home and Indoor Work Environments*. New York: Taylor & Francis. pp. 287–292. ISBN.
- ²⁰ Abarca M, Bragulat M, Castellá G, Cabañes F (1994). "Ochratoxin A production by strains of *Aspergillus niger* var. *niger*". *Appl Environ Microbiol* 60 (7): 2650–2. PMID 8074536.
- ^{19 y 21} Schuster E, Dunn-Coleman N, Frisvad JC, Van Dijck PW (August 2002). "On the safety of *Aspergillus niger*--a review". *Applied microbiology and biotechnology* 59 (4-5): 426–35. doi:10.1007/s00253-002-1032-6. PMID 12172605.
- ²² Varma, J. and Dubey, N.K. (1999). Prospectives of botanical and microbial products as pesticides of Tomorrow. *Current Science* 76: 172-179.
- ²³ Kayser O, Kiderlen A, Croft S. 2003. Natural products as antiparasitic drugs. *Parasitology Research* 90, S55–S62.
- ²⁴ Akins RA. 2005. An update on antifungal targets and mechanisms of resistance in *Candida albicans*. *Medical Mycology* 43, 285–318.
- ²⁴ Rischer H, Hamm A, Bringmann G. 2002. *Nepenthes insignis* uses a C2-portion of the carbon skeleton of L-alanine acquired via its carnivorous organs, to build up the allelochemical plumbagin. *Phytochemistry* 59, 603–609.
- ²⁵ Bringmann G, Feineis D. 2001. Stress-related polyketide metabolism of *Dioncophyllaceae* and *Ancistrocladaceae*. *Journal of Experimental Botany* 52, 2015–2022.
- ²⁶ Inbaraj JJ, Chignell CF. 2004. Cytotoxic action of juglone and plumbagin: a mechanistic study using HaCaT keratinocytes. *Chemical Research in Toxicology* 17, 55–62.
- ²⁷ Ciancas Jiménez Jimmy C. 2006. Efecto biocontrolador de la cepa *Trichoderma inhamatum* Bol 12 QD-1 sobre fitopatógeno *Botrytis cinérea* causante de la mancha chocolate en cultivos de haba de la comunidad de Chirapaca, 63-94.
- ²⁸ Mohana, D. C. and Raveesha, K. A. (2007). Anti-fungal evaluation of some plant extracts against some plant pathogenic field and storage fungi. *Journal of Agricultural Technology* 4(1): 119-137.

-
- ²⁹ Barrera, L.L., Bautista B.S., 2002. Influencia de polvos de hojas, frutas y semillas y extractos de *Pithecellobium dulce* (Roxb.) Benth. (Favaceae) sobre crecimiento vegetativo *in vitro* de siete hongos.
- ³⁰ Jun Y. C. Gyung J. C., Seung W. S. Kyoung S. He K. L. Sun O. L. Nack D. S. Kwang Y. C. (2007) Isolation and antifungal activity of lignans from *Myristica fragrans* against various plant pathogenic fungi
- ³¹ Alexopoulos CJ, Mims CW (1979) Introductory Mycology, 3rd edn. Wiley Eastern Limited, New Delhi, India
- ³² Antonio B, Giancarlo P (2002) Toxigenic *Fusarium* species and mycotoxins associated with head blight in small-grain cereals in Europe. *Eur J Plant Pathol* 108:611–624
- ³³ Desai AG, Dange SRS (2003) Standardization of root dip inoculation technique for screening of resistance to wilt of castor. *J Mycol Plant Pathol* 33:73–75
- ³⁴ Brayford D (1992) IMI descriptions of fungi and bacteria no. 1117: *Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*. *Mycopathologia* 118:51–53
- ³⁵ Kolte SJ, Awasthi RP, Vishwanath (1987) Assessment of yield losses due to *Alternaria* blight in rapeseed and mustard. *Indian J Phytopathol* 40:209–211
- ³⁶ Wilson CL, Solar JM, El Ghaouth A, Wisniewski ME (1997) Rapid evaluation of plant extract and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant Disease* 81:204–210
- ³⁷ Pradhanang PM, Momol MT, Olson SM (2003) Effects of plant essential oils on *Ralstonia solanacearum* population density and bacterial wilt incidence in tomato. *Plant Disease* 87:423–427 Rai MK,
- ³⁸ Momol MT, Momol EA, Dankers WA, Olson SM, Simmons JA, Rich JR (1999) Evaluation of selected plant essential oils for suppression of *Ralstonia solanacearum* and *Meloidogyne arenaria* on tomato. (Abstr) *Phytopathology* 89(Suppl):S54
- ³⁹ Momol MT, Mitchell DJ, Rayside PA, Olson SM, Momol EA (2000) Plant essential oils as potential biofumigants for the management of soilborne pathogens of tomato. (Abstr) *Phytopathology* 90(Suppl):S127

-
- ⁴⁰ Browsers JH, Locke JC (2004) Effect of formulated plant extracts and oils on population density of *Phytophthora nicotianae* in soil and control of *Phytophthora* blight in the greenhouse. *Plant Disease* 88:11–16
- ⁴¹ Browsers JH, Locke JC (2000) Effects of botanical extracts on the population density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of *Fusarium* wilt in the greenhouse. *Plant Disease* 84:300–305
- ⁴² V. C. Pawar & V. S. Thaker (2007) Evaluation of the anti-*Fusarium oxysporum* f. sp. *cicer* and anti-*Alternaria porri* effects of some essential oils
- ⁴⁴ DeLucca, A. J., and T. J. Walsh. 1999. Antifungal peptides: novel therapeutic compounds against emerging pathogens. *Antimicrob. Agents Chemother.* 43:1–11.
- ⁴⁵ Sai, K. P., M. V. Jagannadham, M. Vairamani, N. P. Raju, A. S. Devi, R. Nagaraj, and N. Sitaram. 2001. Tigerins: novel antimicrobial peptides from the Indian frog *Rana tigerina*. *J. Biol. Chem.* 276:2701–2707.
- ⁴⁶ Debono, M., and R. S. Gordee. 1994. Antibiotics that inhibit fungal cell wall development. *Annu. Rev. Microbiol.* 48:471–497.
- ⁴⁷ DeGrado, W. F. 1988. Design of peptides and proteins. *Adv. Protein Chem.* 39:51–124.
- ⁴⁸ Saberwal, G., and R. Nagaraj. 1994. Cell-lytic and antibacterial peptides that act by perturbing the barrier function of membranes: facets of their conformational features, structure-function correlations, and membrane-perturbing abilities. *Biochim. Biophys. Acta* 1197:109–131.
- ⁴⁹ Grayer, R.J. and Harborne, J.B. (1994). Survey of Antifungal compounds from higher plants 1982-1993-review. *Phytochemistry* 37:19-42.
- ⁵⁰ Hostettmann, K. and Wolfender, J.L. (1997). The search for biologically active secondary metabolites. *Pesticide Science* 51: 471-482.
- ⁵¹ Gottlieb, O.R., Borin, M.R. and Brito, N.R. (2002). Integration of ethnobotany and phytochemistry: dream or reality?. *Phytochemistry* 60: 145-152.
- ⁵² Lacey J. 1989. Pre- and post-harvest ecology of fungi causing spoilage of foods and other stored products. *Journal of Applied Bacteriology*, Symposium Supplement: 11S - 25S.
- ⁵³ Ko WH, Wang SY, Hsieh TF, Ann PJ (2003) Effects of sunflower oil on tomato powdery mildew caused by *Oidium neolycopersici*. *J Phytopathol* 151:144–148).

-
- ⁵⁴ (Torres y Vicencio. 1989) (Figura 9). Torres, H. y J. Vicencio. 1989. Control químico del "tizón temprano" (*Alternaria solani*) de la Papa en San Ramón, Perú. En: XIV Reunión de la Asociación Latinoamericana de la Papa (ALAP): Resúmenes y Programa. Mar del Plata (Argentina) 5-11 de Marzo 1989. Pag. 43. Resumen.
- ⁵⁵ Jaime Niño O., Johana Ospina T. Determinación de la actividad antifúngica de extractos vegetales sobre el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet
- ⁵⁶ FERNANDEZ VALIELA 1979. Introducción a la Fitopatología. INTA. B. Aires. Argentina. 435-440
- ⁵⁷ MESSIAEN. C, Et al 1991. Les maladies des plantes maraichères. INRA. Paris. Francia. 156-157.
- ⁵⁸ Bautista -Baños, S., Hernández, L.M., y Barrera, N.L. 2000^a. Antifungal screening of plants of the state of Morelos, México against four postharvest pathogens of fruits and vegetables. Revista Mexicana
- ⁵⁹ Evelyn AA, Koichi T, Yasunori A, Nitaro M, Hajime A, Motoichiro K, Hiroshi O (2004) Detection of fungi producing infection-inhibiting metabolites against *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype from fungi inhabiting internal tissues of Japanese pear shoots. J Gen Plant Pathol 70:139–142

ANEXOS

ANEXO I

**MATERIAL DE LABORATORIO, MEDIOS DE CULTIVO,
REACTIVOS, EQUIPOS Y EXTRACTOS**

Material de Laboratorio

Matraces
Cajas petri
Probetas
Pipetas
Viales
Asas bacteriológicas
Sacabocados
Film (PVC)
Parafilm
Algodón
Gasa
Papel madera
Scoh delgado y grueso
Guantes de látex
Marcador indeleble

Medios de cultivo

Agar Papa dextrosa (PDA)
Agar Agar
Caldo papa Agar
Sauburau

Reactivos

Alcohol
Hipoclorito de Sodio
Mancozeb

Extractos

M₁₆ IITP-1 IITP-2 IITP-3

Equipos

Balanza electrónica
Microscopio
Campana de Flujo Laminar
Estufa
Refrigerador
Autoclave
Computadora
Libreta de apuntes
Registro
Calculadora
Cámara fotográfica
Regla milimetrada

ANEXO II
TABLAS Y GRAFICOS

Tabla N° 5 CRECIMIENTO EN MILIMETROS IN EXTENSO HASTA LOS 9 DIAS DE *Alternaria spp* CEPA BOL-RT-2 CON DIFERENTES EXTRACTOS.

Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
16	2,10	8,69	11,67	16,10	19,5	22,92	24,90	27,19	30,93	32,93
IITP-1	2,15	9,65	12,94	18,5	20,25	21,29	22,58	22,58	22,58	22,58
IITP-2	2,64	10,38	14,79	21,46	24,56	26,40	27,55	29,71	32,44	34,44
IITP-3	1,83	8,83	10,88	13,96	17,85	19,49	21,75	27,35	31	34,42
Control(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control(-)	2,13	9,40	13,02	18,02	22,68	24,71	26,54	30,48	31,44	34,73

Tabla N° 6 CRECIMIENTO EN MILIMETROS IN EXTENSO HASTA LOS 9 DIAS DEL LA CEPA *Fusarium spp.* CEPA BOL RT-1 CON DIFERENTES EXTRACTOS.

Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
16	2,04	9,42	13,21	20,17	26,98	30,00	33,37	36,33	39,22	43,00
IITP-1	1,69	12,06	16,56	24,96	33,5	34,67	35,75	35,75	36,38	36,38
IITP-2	2,00	11,54	16,60	26,92	34,96	36,90	37,98	37,98	36,41	36,41
IITP-3	1,96	10,06	14,15	22,19	27,52	29,96	35,04	40,31	43,31	43,00
Control(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control(-)	1,50	12,52	15,94	24,28	32,76	36,10	39,25	44,19		

Tabla N° 7 PORCENTAJE DE CRECIMIENTO IN EXTENSO HASTA LOS 9 DIAS DE *Alternaria spp* CEPA BOL-RT-2 CON DIFERENTES EXTRACTOS.

Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
16	6,058 8	25,01 5	33,5 9	46,3 7	56,1 5	65,9 9	71,6 9	78,3	89,0 5	94,8 1
IITP-1	6,178 8	27,77 4	37,2 5	53,2 7	58,3 1	61,3 1	65,0 3	65,0 3	65,0 3	65,0 3
IITP-2	7,609 9	29,87 4	42,5 9	61,7 9	70,7 3	76	79,3 4	85,5 4	93,4 2	99,1 8
IITP-3	5,254 9	25,43 5	31,3 1	40,1 9	51,4	56,1 1	62,6 3	78,7 6	89,2 6	99,1
Control(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control(-)	6,118 8	27,05 5	37,4 9	51,8 9	65,3	71,1 5	76,4 2	87,7 6	90,5 2	100

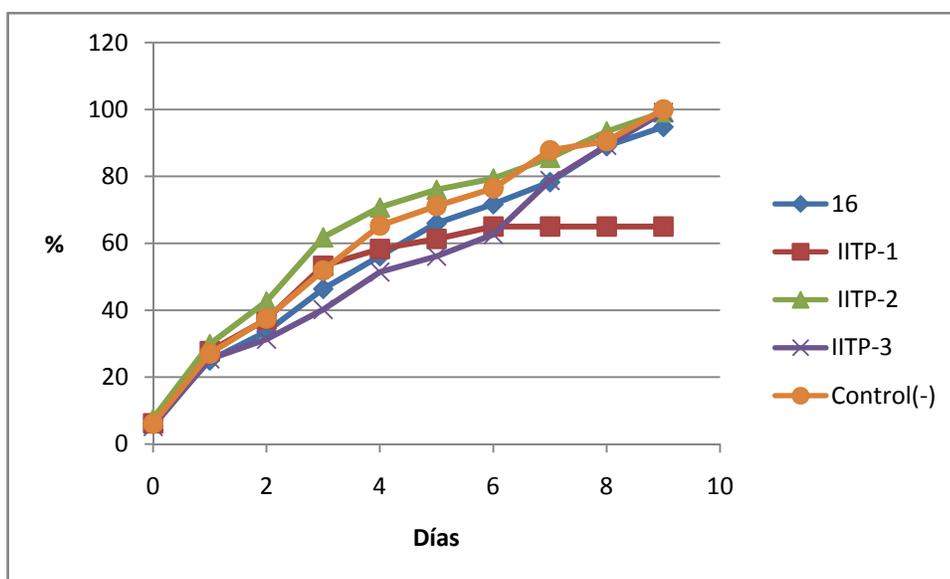


Tabla N° 8 PORCENTAJE DE CRECIMIENTO IN EXTENSO HASTA LOS 9 DIAS DEL LA CEPA *Fusarium spp.* CEPA BOL RT-1 CON DIFERENTES EXTRACTOS.

Días	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
16	4,620 5	21,31 1	29,8 9	45,6 4	61,0 6	67,8 9	75,5 2	82,2 3	88,7 6	97,3 1
IITP-1	3,819	27,29 8	37,4 8	56,4 8	75,8 1	78,4 5	80,9 1	80,9 1	82,3 2	82,3 2
IITP-2	4,516 7	26,12	37,5 8	60,9 1	79,1 1	83,5	85,9 5	85,9 5	82,3 9	82,3 9
IITP-3	4,431 9	22,77 2	32,0 1	50,2 1	62,2 8	67,8	79,3	91,2 3	98,0 2	97,3 1
Control(+)	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Control(-)	3,394 6	28,33 6	36,0 7	54,9 5	74,1 3	81,7 1	88,8 3	100		

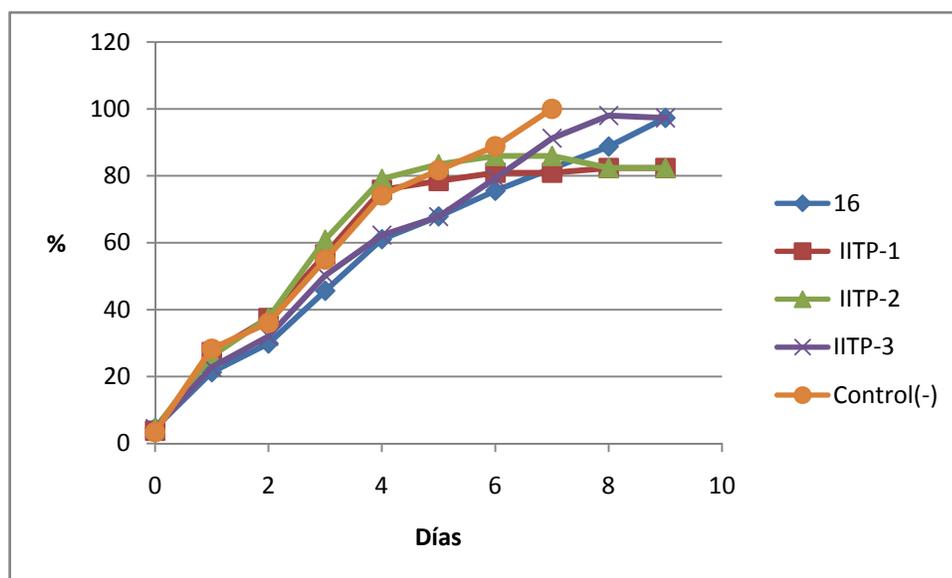


Tabla N° 9 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO LOGARÍTMICA DE CEPA *Alternaria* spp. CEPA BOL RT-2 CON DIFERENTES EXTRACTOS.

Días	Velocidad de crecimiento mm/día μ	R2
16	3,42	0,947
IITP-1	2,88	0,951
IITP-2	3,41	0,988
IITP-3	3,42	0,843
Control(+)	0	
Control(-)	3,47	0,961

Tabla N° 10 VELOCIDAD DE CRECIMIENTO LOGARÍTMICA DE CEPA *Fusarium* spp. CEPA BOL RT-1 CON DIFERENTES EXTRACTOS.

Días	Velocidad de crecimiento mm/día μ	R2
16	3,43	18,4
IITP-1	3,31	0,999
IITP-2	3,55	0,964
IITP-3	3,55	0,964
Control(+)	0	
Control(-)	3,59	0,951

ANEXO III
FIGURAS

FIGURA N°8 CINETICAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Alternaria spp.* CEPA BOL RT-2 POR TRIPLICADO SOMETIDO A EXTRACTO VEGETAL 16

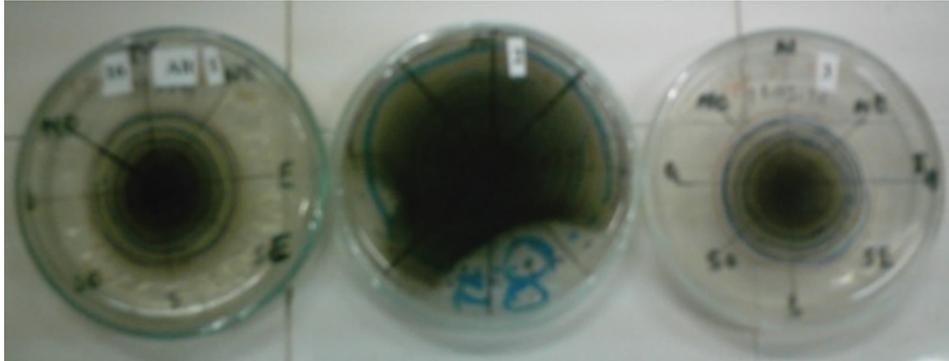


FIGURA N°9 CINETICAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Alternaria spp.* CEPA BOL RT-2 POR TRIPLICADO SOMETIDO A EXTRACTO VEGETAL IITP-1

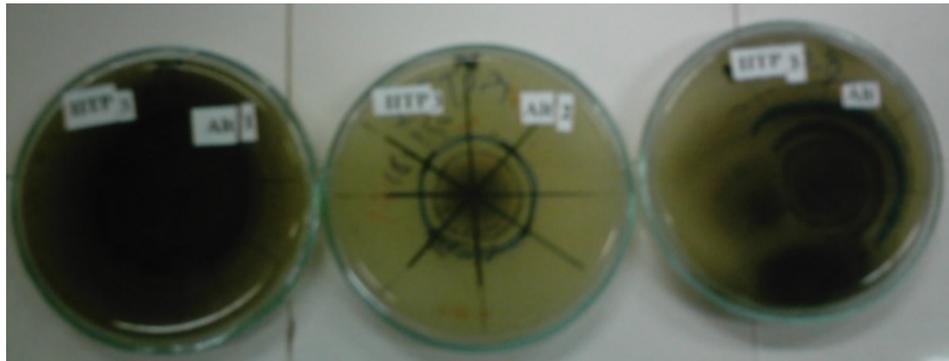


FIGURA N°10 CINETICAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Alternaria spp.* CEPA BOL RT-2 POR TRIPLICADO SOMETIDO A EXTRACTO VEGETAL IITP-2.

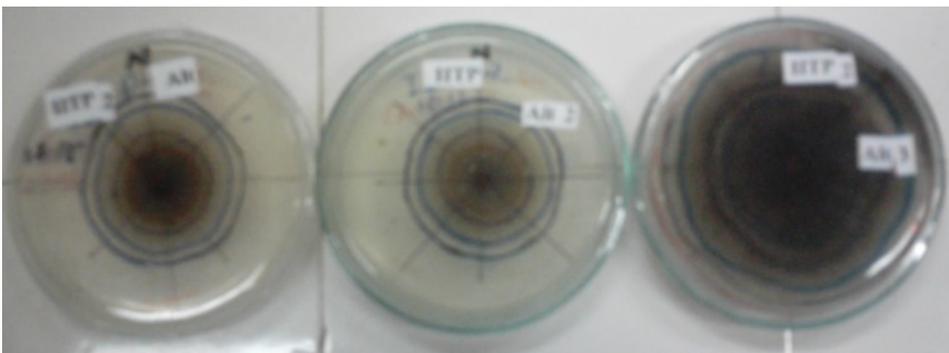


FIGURA N°11 CINETICAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Alternaria spp.* CEPA BOL RT-2 POR TRIPLICADO SOMETIDO A EXTRACTO VEGETAL IITP-3.

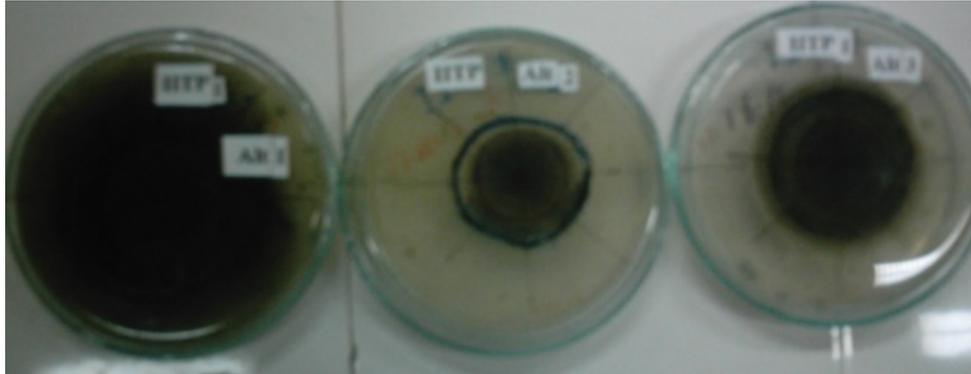


FIGURA N°12 CONTROL NEGATIVO CINETICAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Alternaria spp.* CEPA BOL RT-2 POR TRIPLICADO.

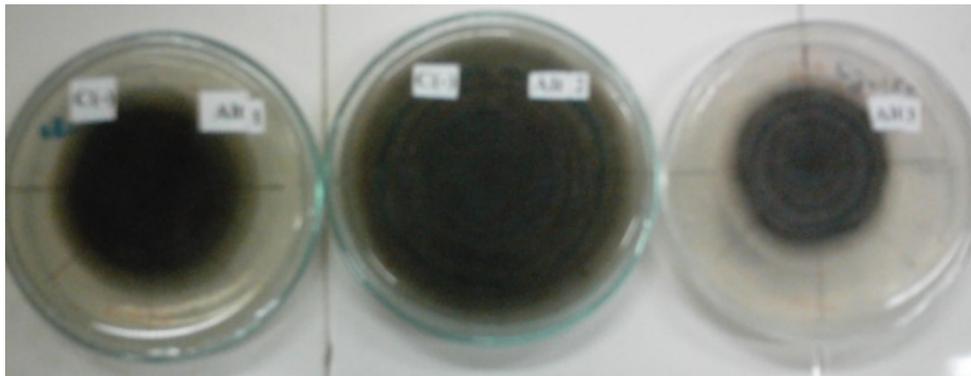


FIGURA N°13 CONTROL POSITIVO CINETICAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Alternaria spp.* CEPA BOL RT-2 POR TRIPLICADO SOMETIDO A MANKOZEB.

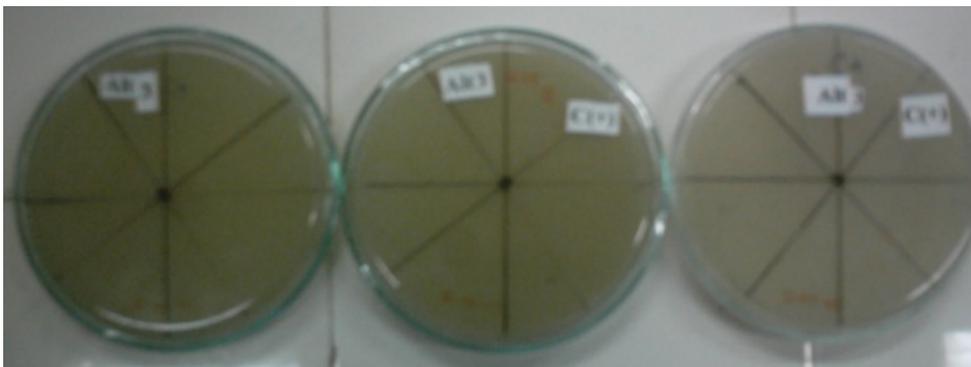


FIGURA N°14 CINETICAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Fusarium spp.*
CEPA BOL RT-1 POR TRIPLICADO SOMETIDO A EXTRACTO VEGETAL 16

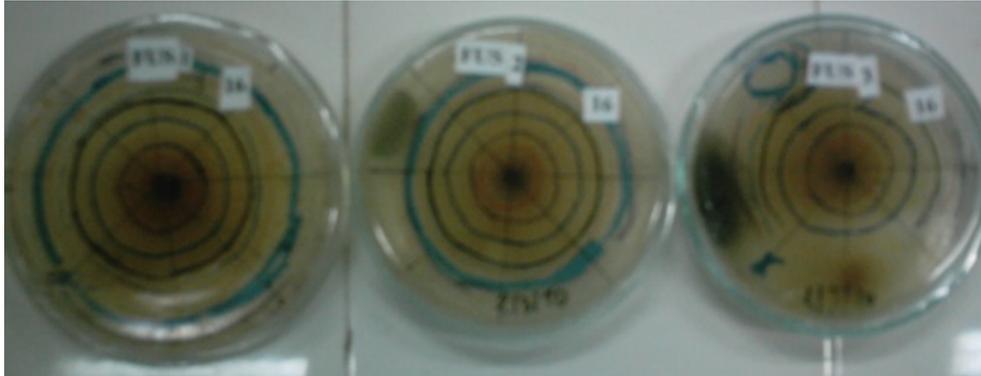


FIGURA N°15 CINETICAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Fusarium spp.*
CEPA BOL RT-1 POR TRIPLICADO SOMETIDO A EXTRACTO VEGETAL IITP-1

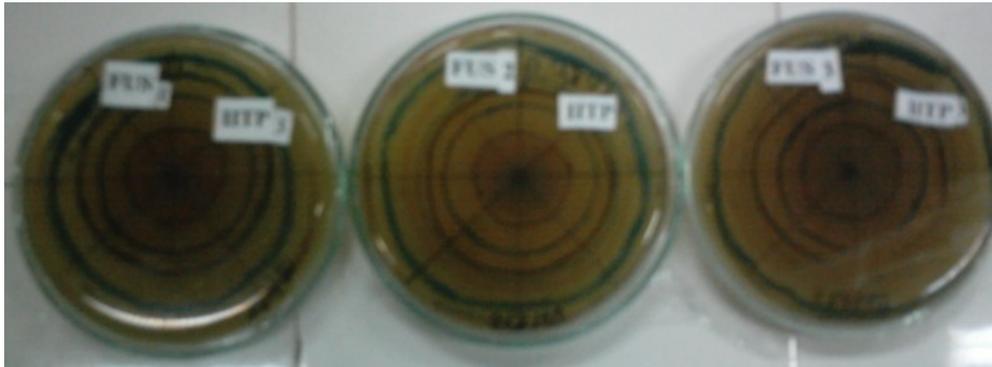


FIGURA N°16 CINETICAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Fusarium spp.*
CEPA BOL RT-1 POR TRIPLICADO SOMETIDO A EXTRACTO VEGETAL IITP-2

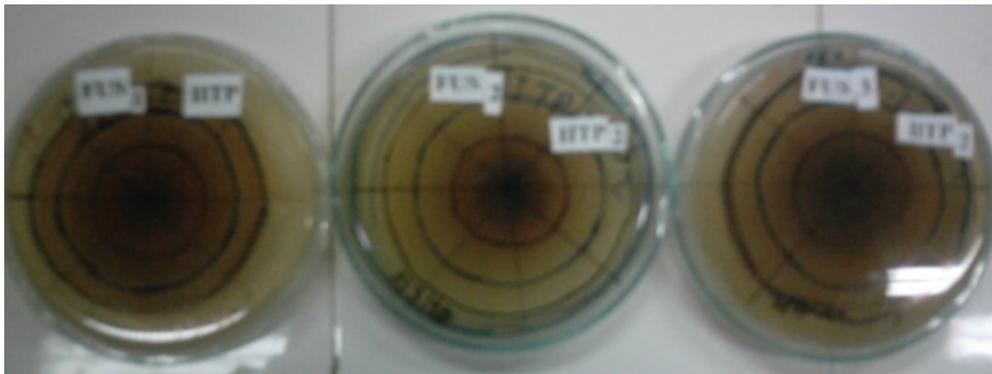


FIGURA N°17 CINETICAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Fusarium spp.* CEPA BOL RT-1 POR TRIPLICADO SOMETIDO A EXTRACTO VEGETAL IITP-3

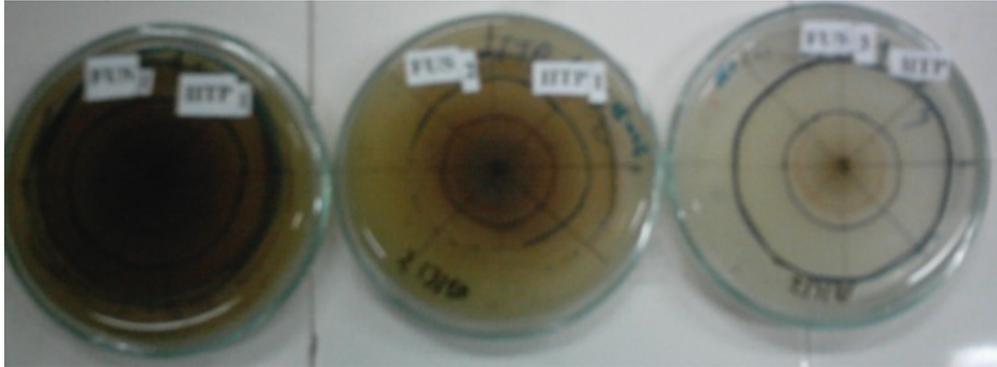


FIGURA N°18 CONTROL NEGATIVO CINETICAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Fusarium spp.* CEPA BOL RT-2 POR TRIPLICADO.

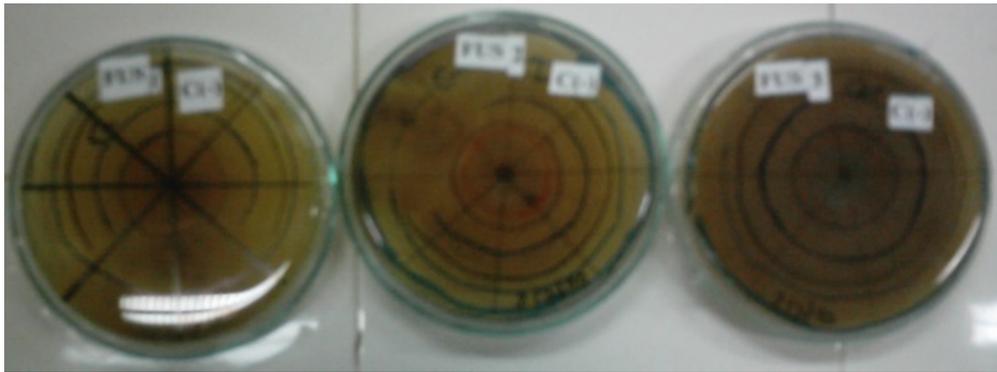


FIGURA N°19 CONTROL POSITIVO CINETICAS DE CRECIMIENTO DEL HONGO *Fusarium spp.* CEPA BOL RT-2 POR TRIPLICADO SOMETIDO A MANKOZEB.

