

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**



**INHIBICION DE HONGOS FITOPATOGENOS DE CULTIVOS COMERCIALES  
POR EXTRACTOS VEGETALES DE PLANTAS POPULARMENTE USADAS EN  
GUATEMALA**

**Lourdes Gabriela Villanueva Cárdenas  
Nadia Iveth Miranda Galván  
Nancy Verónica Castro López  
Sergio René Francisco Aifán González**

**QUIMICOS BILOGOS**

**Guatemala, Septiembre 2012**

**UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA  
FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA**



**INHIBICION DE HONGOS FITOPATOGENOS DE CULTIVOS COMERCIALES  
POR EXTRACTOS VEGETALES DE PLANTAS POPULARMENTE USADAS EN  
GUATEMALA**

**SEMINARIO DE INVESTIGACIÓN**

Presentado por

**Lourdes Gabriela Villanueva Cárdenas  
Nadia Iveth Miranda Galván  
Nancy Verónica Castro López  
Sergio René Francisco Aifán González**

Para optar al título de

**QUIMICOS BILOGOS**

**Guatemala, Septiembre 2012**

## **JUNTA DIRECTIVA**

<b>Oscar Cóbar Pinto, Ph. D.</b>	<b>Decano</b>
<b>Lic. Pablo Ernesto Oliva Soto, M. A.</b>	<b>Secretario</b>
<b>Licda. Liliana Vides de Urizar</b>	<b>Vocal I</b>
<b>Dr. Sergio Alejandro Melgar Valladares</b>	<b>Vocal II</b>
<b>Lic. Luis Antonio Gálvez Sanchinelli</b>	<b>Vocal III</b>
<b>Br. Fausto René Beber García</b>	<b>Vocal IV</b>
<b>Br. Carlos Francisco Porras López</b>	<b>Vocal V</b>

# **DEDICATORIA**

## **A DIOS**

**Por darnos la vida y llegar a este día, por ser la fuente inagotable de nuestra fortaleza y sabiduría, la luz que iluminó nuestros pasos para culminar esta carrera.**

## **A NUESTRA VIRGENCITA**

**Por estar presente en nuestras vidas, elevando nuestras peticiones al cielo, por ser quien nos cuidó y protegió en cada momento, cubriéndonos y librándonos de todo mal.**

## **A NUESTROS PADRES**

**Sergio Aifán y Sandra González  
Héctor Castro y Marta López  
Manuel Miranda y Rosario Galván  
Francisco Villanueva y Marta Lidia Cárdenas**

**Por creer en cada uno de nosotros, por estar siempre a nuestro lado, demostrándonos su afecto, cariño, amor, comprensión, animarnos y apoyarnos en los momentos más difíciles y darnos lo mejor de cada uno de ellos en base a mucho esfuerzo y dedicación.**

## **A NUESTRAS FAMILIAS**

**Por su apoyo y comprensión, consejos, por el buen ejemplo que nos brindaron y estar con nosotros en todo momento.**

## **A NUESTROS AMIGOS**

**Por ser como nuestros hermanos, siempre brindándonos su apoyo, compañía, cariño y la mejor amistad.**

# **AGRADECIMIENTOS**

## **A DIOS**

**Por darnos la vida y ser la fuente de luz y sabiduría.**

## **A LA UNIVERSIDAD DE SAN CARLOS DE GUATEMALA**

**Por darnos la oportunidad de formarnos como profesionales.**

## **A LA FACULTAD DE CIENCIAS QUIMICAS Y FARMACIA Y A LA ESCUELA DE QUIMICA BIOLOGICA**

**Por brindarnos las herramientas necesarias para el aprendizaje de nuestra profesión.**

## **A TODOS NUESTROS CATEDRATICOS**

**Por brindarnos sus conocimientos y ser parte de nuestra formación profesional y personal.**

## **A NUESTRO QUERIDO ASESOR**

**Lic. Armando Cáceres por brindarnos todo el apoyo, conocimiento y orientación durante la realización de nuestro trabajo de graduación.**

## **A ING. GUSTAVO ÁLVAREZ**

**Por guiarnos y brindarnos parte de su conocimiento y experiencia profesional como agrónomo.**

## **A UVIGER**

**Por brindarnos el espacio físico para la realización de la parte experimental de nuestro estudio.**

## **A NUESTRA AMIGA**

**Ángela Meoño por su apoyo incondicional, ayuda y amistad en todo momento.**

## INDICE

I.AMBITO DE LA INVESTIGACION	1
II.RESUMEN	2
III.ANTECEDENTES	4
A. Hongos fitopatógenos	5
B. Mecanismos de infección de los hongos fitopatógenos	5
C. Principales síntomas y signos de enfermedades causadas por hongos	8
D. Identificación de los hongos fitopatógenos	8
E. Enfermedades provocadas por hongos fitopatógenos	9
1. Antracnosis del guisante ( <i>Ascochyta pisi</i> (Lib))	9
2. Antracnosis del frijol ( <i>Colletotrichum lindemuthianum</i> (Sacc. y Magn) Briosi y Cavara)	9
3. Pudrición café ( <i>Monilia fructicola</i> (Winter) Honey)	10
4. Mildiu del tomate ( <i>Phytophthora parasitica</i> Dastur)	11
5. Moho blanco o pudrición blanca ( <i>Sclerotinia sclerotiorum</i> (Lib.) Sacc).	12
F. Tratamiento químico convencional	13
G. Productos perecederos susceptibles a hongos fitopatógenos	14
1. <i>Lactuca sativa</i> L. (Lechuga)	15
2. <i>Lycopersicon esculentum</i> L. (Tomate)	16
3. <i>Phaseolus vulgaris</i> L. (Ejote)	17
4. <i>Pisum sativum</i> L. (Arveja China)	18
5. <i>Prunus persica</i> L. (Durazno)	18
H. Vegetales usados como fungicidas	19
1. <i>Chenopodium ambrosioides</i> L.	19
2. <i>Lippia graveolens</i> Humboldt, Bonpland & Kunth.	20
3. <i>Pimenta dioica</i> (L.) Merr.	21
4. <i>Psidium guajava</i> L.	22
5. <i>Ocimum micranthum</i> Willd.	23
I. Biocidas orgánicos usados tradicionalmente	24

1.	Nim ( <i>Azadirachta indica</i> A. Juss)	24
2.	Vinagre de humo de encino	24
IV.	JUSTIFICACION	26
V.	OBJETIVOS	27
VI.	HIPOTESIS	28
VII.	MATERIALES Y METODOS	29
A.	Universo de trabajo	29
B.	Muestra	29
C.	Recursos	29
D.	Materiales	30
E.	Cristalería	30
F.	Equipo	31
G.	Reactivos	31
H.	Metodología	32
	1. Aislamiento de los hongo fitopatógenos	32
	2. Identificación de los hongo fitopatógenos (Cultivo en lámina)	33
	3. Cultivo trampa para <i>Phytophthora</i> sp. en manzana	33
	4. Preparación de extractos etanólicos por percolación	35
	5. Concentración usando rotavapor	36
	6. Validez del método	37
	7. Tamizaje de la actividad antimicótica <i>in vitro</i>	37
	8. Inoculación de hongos filamentosos en placa	38
	9. Lectura e interpretación de los resultados	39
	10. Concentración inhibitoria mínima	39
	11. Diseño estadístico	40
VIII.	RESULTADOS	42
IX.	DISCUSION DE RESULTADOS	55
X.	CONCLUSIONES	60
XI.	RECOMENDACIONES	61
XII.	REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	62
XIII.	ANEXOS	70

## I. AMBITO DE LA INVESTIGACIÓN

La economía de Guatemala está basada principalmente en la agricultura y esta ocupa el tercer lugar del Producto Interno Bruto (PIB), por lo tanto las enfermedades causadas por microorganismo fitopatógenos que afectan los productos agrícolas tienen un gran impacto en la economía guatemalteca. (Banco de Guatemala [BANGUAT], 2010).

Ware (1989) argumenta que el uso indiscriminado de sustancias desarrolladas sintéticamente para el control de plagas ha ocasionado la inducción de resistencia de algunos microorganismos, causando efectos importantes en muchos otros cultivos, además, prevalece el problema toxicológico sobre los humanos, mamíferos y organismos de diversos ecosistemas.

Por otro lado, el alto costo de los plaguicidas y el desarrollo de resistencia de los organismos han obligado a los investigadores a buscar nuevos ingredientes activos biodegradables, como lo ha hecho la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia de la Universidad de San Carlos de Guatemala (USAC) a través del departamento de Citohistología empleando nuevas técnicas de aislamiento y bioensayos, para la implementación de medidas de manejo con menor impacto ambiental y económico.

Esta investigación forma parte de un macro proyecto que se desarrolla conjuntamente entre el Departamento de Citohistología de la Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia y el Departamento de Fitopatología de la Facultad de Agronomía, ambas de la USAC. Considerando las necesidades que demanda la agricultura moderna para el control de patógenos y en base a los antecedentes bibliográficos se proponen en este estudio cinco especímenes vegetales de los cuales se obtendrán extractos etanólicos para evaluar su actividad antifúngica, a saber: *Chenopodium ambrosioides* L., *Ocimum micranthum* Willd., *Pimenta dioica* (L.) Merr., *Psidium guajava* L. y *Lippia graveolens* Kunth.

## II. RESUMEN

Actualmente el uso indiscriminado de fungicidas químicos representa un peligro potencial tanto para el ser humano como para el medio ambiente, ya que contienen productos tóxicos cuyos efectos no se limitan a controlar únicamente a los organismos fitopatógenos, sino también cualquier organismo sensible a estos efectos. Las enfermedades fúngicas que causan daño a las plantas tales como marchitez, pudrición, antracnosis, producción de moho, entre otros, constituyen un problema para la producción agrícola, ocasionando pérdidas económicas. Guatemala cuenta con una amplia variedad de especies vegetales las cuales son utilizadas popularmente para distintos fines, de estas fueron seleccionadas cinco especies vegetales en base a las sugerencias de los ingenieros agrónomos especialistas en agricultura orgánica, para verificar si estos poseen actividad contra hongos fitopatógenos.

Se realizaron extracciones etanólicas de las cinco plantas seleccionadas: *Chenopodium ambrosioides* L. (Apazote) Quenopodiáceas, *Lippia graveolens* Kunth (Orégano) Verbenaceae, *Pimenta dioica* (L.) Merr. (Pimienta) Myrtaceae, *Psidium guajava* L. (Guayaba) Myrtaceae, *Ocimum micranthum* Willd. (Albahaca blanca) Lamiaceae, las cuales son utilizadas popularmente por su bajo costo económico.

El tamizaje antifúngico con los cinco extractos etanólicos se realizó contra los hongos *Ascochyta pisi* Lib, *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. y Magn) Briosi y Cavara, *Monilia fructicola* (Winter) Honey, *Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Sacc, y un Oomycete, *Phytophthora parasítica* Dastur, los cuales son los agentes causales de la antracnosis del guisante, antracnosis del frijol, pudrición café, mildiu del tomate y moho blanco respectivamente, utilizando el método de dilución de Brancato & Golding modificado por MacRae para hongos filamentosos.

Para la validación del método se utilizaron dos controles biológicos que han demostrado previamente su actividad fungicida: Neem (*Azadirachta indica*) y Vinagre

de humo de encino, *Quercus* sp. (Encino) Fagaceae y dos controles químicos: benomil y metconazol.

Los resultados del tamizaje de la actividad antifúngica de los extractos, demostraron que los cinco extractos no presentaron actividad fungicida para ninguno de los hongos fitopatógenos implicados utilizando un punto de corte de 1mg/mL, sin embargo el extracto etanólico de *P. guajava* presentó actividad fungistática contra *C. lindemuthianum*, más no significativa para los objetivos de este estudio por no poseer actividad fungicida.

Se recomienda la evaluación de otras especies vegetales de Guatemala, para determinar si poseen o no actividad fungicida contra los hongos fitopatógenos utilizados para contribuir al desarrollo de la agricultura orgánica en el país.

### III. ANTECEDENTES

A nivel mundial los hongos fitopatógenos originan pérdidas que ascienden a miles de millones de dólares al año (Rodríguez, 1980). El daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospedadas atacadas por estos microorganismos. En cuanto a las pérdidas económicas, éstas pueden ser de tipo cuantitativo y/o cualitativo (sabor, textura, color y forma) (Agrios, 1988).

De los diversos microorganismos fitopatógenos que atacan a las plantas, como pueden ser los virus, hongos, bacterias, nemátodos, fitoplasmas y viroides, son los hongos el grupo que más enfermedades ocasiona y por lo tanto sobre el que más investigación se ha realizado. Se sabe que más de 8,000 especies de hongos pueden causar enfermedades en las plantas (Agrios, 1988).

Los plaguicidas sintéticos dirigidos a combatir los hongos fitopatógenos han generado beneficios en la producción agrícola; sin embargo el empleo inadecuado de los mismos, expresado en términos de tipo, toxicidad, número de aplicaciones y dosificación han producido contaminaciones que afectan al suelo, agua, aire y productos agrícolas, por la acumulación de residuos potencialmente dañinos a la salud humana y de los animales (Dinham, & Malik, 2003).

El interés por el uso de los extractos vegetales como plaguicidas se ha incrementado considerablemente, con prometedores resultados de investigaciones *in vitro* e *in vivo*, con especies de plantas de diferentes ambientes ecológicos y abundantes en la naturaleza (Rodríguez, & Montilla, 2002).

Pocos son los trabajos que se han realizado bajo un enfoque ecológico, sobre la relación fitopatógenos-plantas hospedadas tanto en los sistemas naturales como en los agroecosistemas (Harper, 1990), a nivel de poblaciones o de

comunidades, y que analicen los cambios en su dinámica temporal y espacial debido a las diferentes actividades de perturbación y manejo de los sistemas (Christensen, 1981).

#### **A. Hongos fitopatógenos**

Los hongos son pequeños organismos productores de esporas, generalmente microscópicos, eucarióticos, ramificados y a menudo filamentosos que carecen de clorofila y que tienen paredes celulares que contienen quitina, celulosa, o ambos componentes y se alimenta de organismos fotosintéticos (Agrios, 1991).

Todas las plantas superiores pueden ser infectadas y dañadas por más de una especie de hongo fitopatógeno, así como una especie de hongo fitopatógeno puede atacar a más de una especie de planta (Agrios, 1988). Algunos géneros y especies presentan una gran capacidad de adaptación y se encuentran ampliamente distribuidos, mientras que otros presentan características de adaptación más limitadas o bien son sumamente especializados, lo cual restringe su distribución (Cook, & Baker, 1983). La cantidad de estudios e investigaciones en algunos grupos depende en gran parte de la importancia económica de los cultivos o plantas que dañan.

#### **B. Mecanismos de infección de los hongos fitopatógenos.**

La mayoría de las aproximadamente 100,000 especies de hongos conocidas son saprófitas; sólo 8,000 pueden causar enfermedades en una o más especies vegetales. Muchos hongos patógenos muestran una especificidad hacia el órgano al cual se unen, de forma que normalmente no atacan a todas las partes de la planta hospedadora; algunos colonizan partes aéreas mientras que otros infectan zonas situadas por debajo del suelo (Agrios, 1991).

El desarrollo de la enfermedad es el resultado de su interacción con las plantas, según una secuencia de etapas denominadas patogénesis. Algunas de estas etapas, cruciales para el establecimiento de tal patogénesis, son:

## 1. Unión a la superficie de la planta

Los hongos patógenos emplean diferentes mecanismos para unirse a la superficie de la planta hospedadora. En cualquier caso, la penetración del hongo en la planta precisa del contacto y la adherencia de las esporas y/o de la primera hifa que resulta de su germinación (tubo germinativo) a la superficie vegetal. Los mecanismos por los cuales este proceso se consigue han sido poco estudiados. Un posible mecanismo consiste en la excreción por parte del hongo de enzimas tales como cutinasas y esterases que alteran la superficie vegetal facilitando la adherencia (Alexopoulos, 1985).

## 2. Germinación superficial y formación de estructuras de infección

En la mayoría de los hongos, la germinación de las esporas se produce de forma directa, emitiendo uno o varios tubos germinativos. No obstante los hongos zoospóricos germinan de forma indirecta mediante la formación y liberación de zoosporas, o tras la germinación directa de oosporas y zigosporas. El proceso de germinación de las esporas fúngicas se inicia, al igual que en las semillas de las plantas, con la hidratación y aumento de volumen de la espora, la hidrólisis de las reservas energéticas endógenas y la síntesis de proteínas y materiales estructurales de membrana y pared necesarios para la formación y elongación de los tubos germinativos. La germinación de las esporas se ve afectada por una serie de factores endógenos y exógenos. En muchas ocasiones las esporas se encuentran en un estado de reposo metabólico, en el que la germinación se ve impedida por varios factores físicos o bioquímicos propios de la espora (Agrios, 1991).

La germinación de las esporas que no se encuentran sujetas al estado de reposo metabólico se ve influida por el agua, la temperatura, la luz, la actividad microbiana y los inhibidores y estimulantes de origen diverso. Las esporas se desplazan hacia la zona de penetración, siendo en muchos casos estos movimientos orientados quimiotácticamente; tal desplazamiento finaliza con el enquistamiento de la espora y su adherencia a la superficie vegetal. Un proceso similar sucede en la elongación del tubo germinativo de muchos hongos fitopatógenos, que manifiesta

una orientación en respuesta a estímulos químicos (quimiotropismo) o de contacto superficial (tigmotropismo). El crecimiento orientado del tubo germinativo requiere su adherencia a la superficie del vegetal, lo cual tiene lugar mediante la producción de una matriz extracelular de polisacáridos o glicoproteínas (Agrios, 1991).

### 3. Penetración en el huésped

El siguiente paso en el establecimiento de la infección supone la penetración de los hongos patógenos en sus hospedadores. La penetración puede tener lugar de diferentes maneras:

#### a. De forma mecánica

Dentro de este mecanismo se pueden distinguir a su vez diferentes tipos. Existen algunas especies de hongos que penetran en la planta hospedadora a través de heridas causadas por procesos naturales (caída de hojas, formación de raíces secundarias, etc.) prácticas agrícolas (poda, recolección, etc.) o ataques por insectos. Otros hongos fitopatógenos penetran directamente a través de la superficie intacta de la planta por medio de los tubos germinativos, por medio de apresorios o agregados hifales más complejos que reciben el nombre de cojines de infección (Agrios, 1991).

#### b. Por digestión enzimática

La penetración también puede producirse por digestión enzimática de la cutícula y la pared celular. La producción de cutinasas por parte de determinados hongos juega un papel determinante en la invasión de las plantas, lo que ha quedado demostrado mediante la inhibición de esta enzima con anticuerpos o inhibidores químicos, que ocasionan una reducción de la virulencia del hongo (Alexopoulos, 1985).

#### c. A través de aberturas naturales

Algunos hongos penetran en las plantas a través de aberturas naturales como las lenticelas en tallos y frutos y los hidátodos y estomas en las hojas, siendo

esta última la ruta más común. La penetración de la cutícula es seguida por un crecimiento subcuticular o intramural, que puede en ocasiones verse interrumpido dando lugar a infecciones latentes. Para el crecimiento activo del hongo tras la invasión del tejido es necesario que se establezca una relación parasitaria continuada con el huésped (infección) (Agrios, 1991; Alexopoulos, 1985).

d. Colonización de los tejidos del huésped

A partir de la hifa que penetra en la planta se desarrollan las hifas primarias y varias hifas secundarias filamentosas, que son las encargadas de colonizar el tejido del vegetal por crecimiento intercelular y/o intracelular. La colonización del tejido huésped por crecimiento intercelular de las hifas ramificadas es propio de los hongos biotrofos (mildius, royas, etc.), mientras que el crecimiento intracelular, que a menudo ocasiona la muerte de las células del huésped mediante la secreción de enzimas pectolíticas y de toxinas, es característico de los hongos necrotrofos (Tejeda, 2003).

**C. Principales síntomas y signos de enfermedades causadas por hongos**

Las enfermedades causadas por hongos producen en sus hospederos una amplia variedad de síntomas. Entre los que podemos mencionar manchas cloróticas y necróticas, cribados, canchales, tizones, podredumbres húmedas o secas, momias, agallas, abolladuras, costras, ahogamientos, marchitamientos y pústulas (Agrios, 1991).

**D. Identificación de los hongos fitopatógenos**

Para la identificación de hongos fitopatógenos es necesario la observación de sus estructuras somáticas y reproductivas. Mediante la técnica de cámara húmeda y/o aislamiento es posible la aparición de estas estructuras. La observación de las características de las estructuras producidas y el uso de las claves taxonómicas son necesarias para determinar el género y la especie del hongo patógeno (Singleton, & Rush, 1993).

## **E. Enfermedades provocadas por hongos fitopatógenos**

### **1. Antracnosis del guisante (*Ascochyta pisi* Lib).**

La antracnosis del guisante provoca un moteado semejante en las hojas y en las vainas. Las lesiones sobre el follaje son de color pardo, con zona marginal de color pardo más oscuro; en los tallos son semejantes, pero claramente deprimidas. En las legumbres son de forma circular, deprimidas y con colaciones idénticas a las de la hoja. Con frecuencia pueden verse picnidios del tamaño de una cabeza de alfiler. Las lesiones en la zona basal del tallo y en la raíz, son muy raras o pasan inadvertidas. El factor ambiental de mayor importancia durante la estación de cultivo para el desarrollo de la enfermedad es la humedad, que es necesaria tanto para la expulsión de esporas como para la aparición de infecciones (Walker, 1973).

*A. pisi* produce picnidios tanto en la planta huésped como en los cultivos puros. Las picnidiosporas son hialinas de 4.2 por 13.9  $\mu$ , típicamente bicelulares, más estrechas y largas. Las ascosporas son de 6 a 10 por 10 a 15  $\mu$ , hialinas y bicelulares (Walker, 1973).

### **2. Antracnosis del frijol (*Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. y Magn) Briosi y Cavara).**

La enfermedad de la antracnosis aparece en cualquiera de los órganos de la parte aérea de la planta, pero raramente en las raíces. Las lesiones son de un color pardoscuro característico, en tiempo húmedo pueden aparecer sobre la superficie masas de esporas de color rosado. En las hojas aparecen manchas de forma irregular sobre los nervios del envés, que se extienden a los tejidos próximos y pueden presentar lesiones en la zona hipocotílea generando tumoraciones que generalmente acarrearán la muerte de la planta. Las semillas atacadas presentan lesiones teñidas en distintos tonos de pardo. La fase más llamativa de la enfermedad es la que afecta a la legumbre verde. Las manchas parduscas aumentan rápidamente de tamaño hasta alcanzar 1 cm de diámetro. Pasan a coloraciones pardoscuros o negras en la parte central y pardo claro a rosa en los bordes. Al

madurar las legumbres, el color de las lesiones se aclara y los bordes de las mismas se levantan ligeramente (Walker, 1973).

El micelio de *C. lindemuthianum* es ramificado, tabicado, hialino en principio, pasando a color oscuro con la edad. En medios de cultivo, los conidios pueden aparecer aislados en los extremos de filamentos en las hifas. Los conidios de 4.4 a 5.3 por 13 a 22  $\mu$  son continuos, hialinos, oblongos, cilíndricos, con sus extremos redondeados o algo apuntados en el extremo distal; a menudo puede observarse una especie de vacuola en posición central. La forma de transmisión y dispersión de las esporas se da únicamente por el agua y las hojas primarias y el hipocótilo son los focos de infección secundaria. La penetración del hongo tiene lugar mediante una especie de cuña que atraviesa la cutícula por compresión mecánica (Walker, 1973).

### 3. Pudrición café (*Monilia fructicola* (Winter) Honey)

La pudrición café o podredumbre parda, es considerada una de las enfermedades más destructivas del durazno, sobre todo en condiciones de alta humedad relativa. Cuando el ataque es en las inflorescencias, el hongo crece rápido y cubre el tejido infectado con masas de conidios grisáceos, tornándose oscuros, de tal modo que quedan colgando de las ramas por algún tiempo. En las ramitas que portan las flores infectadas, se desarrollan pequeños cánceres elípticos, profundos y de color café, observándose masas grises de esporas del hongo durante tiempo húmedo y con frecuencia se presenta una exudación gomosa. Los síntomas en los frutos ocurren principalmente cuando estos se aproximan a la madurez, donde se aprecian manchas pequeñas, circulares, de color café, que se extienden con rapidez en todas direcciones y en tiempo húmedo se cubren de conidios grises con frecuencia dispuestos en anillos concéntricos (Díaz, 1993).

El patógeno *M. fructicola* es un ascomiceto que forma apotecios sobre la superficie del fruto momificado, después que inverna en el suelo o en el árbol. La superficie superior e inferior del apotecio está cubierta por miles de ascas de forma cilíndrica, entremezcladas con los parafisos. Las ascosporas son unicelulares (6-17 x

3-8  $\mu\text{m}$ ), hialinas y en número de ocho. El estado asexual produce cadenas de conidios elípticos, hialinos, unicelulares del tipo *Monilia*, sobre conidióforos hialinos dispuestos en grupos. El hongo inverna en forma de micelio o conidios sobre los frutos secos que se encuentran colgando en el árbol, suelo o en los cánceres de las ramas. Las primeras infecciones son provocadas por ascosporas que son liberadas por los apotecios que han madurado después de uno o dos años. La infección secundaria está constituida por conidióforos y conidios que requieren de humedad relativa del 85% y temperatura óptima de 25°C (Díaz, 1993).

#### 4. Mildiu del tomate (*Phytophthora parasitica* Dastur)

La pudrición del tallo y del fruto causado por *Phytophthora parasitica* es una enfermedad común en la mayoría de las áreas productoras de tomate. El patógeno es capaz de atacar cualquier parte de la planta causando diversas sintomatologías, estas consisten en caída de plántulas en almácigo, lesiones o canchros en los tallos, pudrición y muerte de raíces, frutos con manchas en círculos concéntricos pardos y muerte de plantas (Erwin, & Ribeiro, 1996).

Esta enfermedad tiene dos períodos críticos de infección. El primero ocurre en una alta proporción en tomates recién trasplantados, en el que las plantas presentan daño por canchros en el tallo; el segundo período crítico se produce cerca de la cosecha, cuando los frutos de tomate quedan en contacto directo con el suelo húmedo e infectado con *P. parasitica*, y aparecen manchas pardas concéntricas que producen una pudrición posterior de los frutos (Hall, 1994).

En cultivos controlados *P. parasitica* muestra micelios en madejas radiales, ondulados o en forma de rosetas. Las hifas aéreas son rectas incoloras y no septadas cuando jóvenes, pero ocasionalmente septadas cuando viejas. Los contenidos de las hifas son granulares. Presenta excrecencias radiales frecuentemente numerosas, cortas o largas y filamentosas, posee pocas clamidisporas con un diámetro promedio de 29.5  $\mu\text{m}$ ., esporangióforos con o sin ramificaciones, esporangios terminales de forma elipsoidal con un tamaño promedio

de 43.9 x 33.0  $\mu\text{m}$ , en donde se producen de 5 a 30 zoosporas apleróticas con un tamaño variable entre 7-11 (Erwin, & Ribeiro, 1996).

Estudios de *P. parasitica* han demostrado que la producción de elicinas, que son pequeñas proteínas secretadas por todas las especies de *Phytophthora* sp. que inducen respuestas de hipersensibilidad y activan mecanismos de defensa resultan altamente patogénicos en cultivos de tomate comparado con otros como el tabaco (Lacourt, Panabieres, & Marais, 1994)

#### 5. Moho blanco o pudrición blanca (*Sclerotinia sclerotiorum* (Lib.) Sacc).

La enfermedad del moho blanco ataca casi todas las hortalizas en cualquier etapa del desarrollo y las pérdidas son variables, dependiendo del cultivo, las condiciones de humedad y el nivel de infestaciones del suelo. El hongo afecta al tallo principal e invade el tejido cortical con bastante rapidez, sin síntomas visibles, hasta que repentinamente la planta se marchita. Al examinar una planta enferma, se nota abundante micelio superficial, blanco algodonoso y hasta esclerocios jóvenes, estos al principio son de color blanco; pero al madurar, se ponen de color castaño oscuro. Cuando el hongo invade la médula de la planta, se forman ahí los esclerocios como sucede en tomate, papa, pepino, lechuga, repollo y otras hortalizas. En ocasiones, se nota una pudrición suave cubierta de micelio blanquecino en las hojas exteriores que permanecen en contacto con el suelo. En las hortalizas almacenadas se observa la misma sintomatología: los tejidos atacados se vuelven suaves y acuosos por efecto de la invasión del micelio del hongo, las verduras afectadas pierden agua rápidamente y se secan (Anaya, y Nápoles, 2007).

*S. sclerotiorum* presenta abundante micelio blanco que origina esclerocios irregulares, negros y grandes, apotecios pedicelados, ascas más o menos claviformes, ascosporas ovales hialinas. El hongo sobrevive de una cosecha a otra como esclerocios del hongo en los residuos de la cosecha o en el suelo. Los esclerocios son diseminados por medio de las herramientas de labranza, animales, semillas y el agua de riego. El inoculo inicial lo constituyen los esclerocios y las

ascosporas del hongo, si se presentan condiciones de humedad adecuada y temperatura alrededor de 25°C (Anaya, y Nápoles, 2007).

## **F. Tratamiento químico convencional**

Las enfermedades de antracnosis del guisante, antracnosis del frijol, moho blanco y pudrición café provocadas por *A. pisi*, *C. lindemuthianum*, *S. sclerotiorum* y *M. fructicola* respectivamente son tratados con benomil, un fungicida foliar sistémico de la familia de los benzimidazoles, selectivamente tóxico para los microorganismos y los invertebrados, en especial para los gusanos de tierra (Ciencia y Tecnología para el desarrollo -CYTED-, 2002).

El benomil se usa como fungicida sistémico para el control de una amplia variedad de plagas antes de la cosecha y como aspersion o polvo postcosecha. Ataca un vasto espectro de enfermedades ocasionadas por hongos en hortalizas en general. Este fungicida y su principal metabolito, carbendazim (CBM), que es un inhibidor de la síntesis de la beta-tubulina la cual actúa sobre la división celular, impidiendo la formación del huso acromático (microtúbulos compuestos de tubulina) a nivel de la profase y de la culminación de la división celular (mitosis). Inhibe el desarrollo de los tubos germinativos, la formación de apresorios y el desarrollo del micelio (Ciencia y Tecnología para el desarrollo -CYTED-, 2002; Barpen, 2004).

Son efectivos contra una serie de hongos Ascomycetes tales como: oídios, sarna, fusariosis, Monilia, pero no muestran acción eficiente contra hongos del género Oomycetes (*Phytophthora*, *Pythium*, etc.). En las aplicaciones foliares la principal barrera es la cutícula foliar. Esta es porosa, pero aún así pocos productos pueden atravesarla (Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria [INTA], 2002).

La toxicidad selectiva del benomil como fungicida posiblemente se debe al aumento de su efecto en los hongos más que al efecto que tiene en los microtúbulos de los mamíferos. El benomil se degrada con rapidez convirtiéndose en CBM, lo cual genera grandes preocupaciones toxicológicas. Si bien el benomil es de baja

toxicidad aguda, está relacionado con múltiples efectos crónicos en la salud. Los efectos asociados a benomil y carbendazim incluyen toxicidad hepática, toxicidad para el desarrollo (malformaciones en los ojos del feto, malformaciones en el cerebro y aumento de la mortalidad) y efectos reproductivos (principalmente en los testículos). Ambos fungicidas son considerados posibles cancerígenos para seres humanos (Ciencia y Tecnología para el desarrollo -CYTED-, 2002).

Entre otros de los efectos toxicológicos demostrados por benomil se encuentran la alteración del sistema nervioso central, irritación y alergias en la piel. La Agencia de Protección Ambiental de Estados Unidos (EPA) lo clasifica como teratogénico, además, destaca sus efectos reproductivos (testiculares), efectos cancerígenos, efectos mutagénicos, efectos endocrinos y efectos ambientales pues es un estrógeno ambiental que reduce la vida silvestre y es tóxico para peces (Ciencia y Tecnología para el desarrollo -CYTED-, 2002).

Para el mildiu provocado por *P. parasítica*, el antifúngico de elección es metconazol, fungicida de amplio espectro, con propiedades protectoras y curativas. El fungicida metconazol pertenece a la familia de los triazoles que inhibe la biosíntesis de ergosterol en los hongos. De esta manera se inhibe la síntesis de membranas celulares necesarias para el crecimiento y multiplicación de estas especies. El fungicida es rápidamente absorbido por la planta, presentando una penetración local y sistemicidad acrópeta cuando aplicado al follaje. Siendo un producto curativo, las pústulas o manchas presentes mueren a los pocos días y evita la reinfestación mientras dure la residualidad del producto (Ciencia y Tecnología para el desarrollo -CYTED-, 2002).

#### **G. Productos perecederos susceptibles a hongos fitopatógenos**

Durante el año 2010 los principales productos agrícolas tradicionales y actividades similares a esta generaron para la economía de Guatemala aproximadamente Q 2,474,503,593 estos ingresos pueden verse mermados ya que el cultivo de plantas alimenticias día a día enfrenta problemas fitosanitarios donde se

incluyen enfermedades causadas por hongos y bacterias los cuales disminuyen la calidad del producto final generando (BANGUAT, 2010).

Los desastres naturales y las enfermedades causadas por hongos y plagas más comunes en frutas y hortalizas durante la cosecha, son la mayor causa de pérdidas en estos productos. En Guatemala, durante el año 2010 se reportó una pérdida de Q 513,299,293 por estas causas. Los daños reportados son de tipo fisiológico y patológico; en el caso de infecciones ocasionadas por hongos, se recurre a cuidadosas prácticas de manejo del cultivo, del producto durante la cosecha y del almacenamiento, con el saneamiento de los sitios de empaque y el uso de envases especiales, pretendiéndose con esto disminuir el desarrollo de microorganismos, lo que generalmente no es suficiente recurriéndose a fungicidas sintéticos, aplicados en baños o por aspersión (Valor y Manzano, 2000, MAGA, 2010).

Los movimientos ecológicos a nivel mundial han cobrado importancia lo cual ha incentivado el uso de sustancias naturales para el control de plagas y enfermedades en vegetales, a tal punto que muchos productos de exportación deben adecuarse a las condiciones de cultivo orgánico (Stauffer, Orrego, & Aquino, 2000).

1. *Lactuca sativa* L. (Lechuga) Asteraceae

- a. Aspectos importantes del producto

Se encuentra en la mayor parte de las zonas templadas siendo las variedades cultivadas actualmente una hibridación entre especies distintas. Es una planta constituida por una roseta de hojas grandes que, según la variedad pueden ser de hojas sueltas o arrolladas de color verde, formando o no, una cabeza de hojas en el centro, la forma es más o menos redondeada, de 20-30 cm de diámetro y con un peso de 0.3 kg. Su sabor es suave, agradable y fresco. Se cultiva con fines alimentarios, se ingiere cruda como ingrediente de ensaladas y otros platos (Gudiel, 1987; Herrmann, 2001).

La temperatura óptima de germinación oscila entre 18-20°C. Durante la fase de crecimiento del cultivo se requieren temperaturas entre 14-18°C por el día y 5-8°C por la noche, La humedad relativa conveniente para la lechuga es del 60 al 80%, los suelos preferidos son aquellos con un pH óptimo entre 6.7 y 7.4 (Herrmann, 2001).

b. Aspectos económicos

El Instituto Nacional de Estadística (INE) a través de la Encuesta Nacional Agropecuaria (ENA) registró en el año 2006 una producción de 14,204,773 kg de lechuga con un valor aproximado de más de Q 45,000,000.00. Entre las variedades de lechuga que más se cultivan en Guatemala son las denominadas cabeza o arpeolladas de hojas lisas y las de mantequilla. El total de las exportaciones asciende a US\$ 3,587,000.00 por concepto de 40,927,114 kg de lechuga (Gudiel, 1987; Instituto Nacional de Estadística [INE], 2007; Ministerio de Economía [ME], Asociación Guatemalteca de Exportadores [AGEXPORT] y Cámara de la Industria de Guatemala [CIG], 2007).

2. *Lycopersicon esculentum* L. (Tomate) Solanaceae

a. Aspectos importantes del producto

Es una planta herbácea, de tallo inicialmente erecto, debido al peso de las ramas, se postran y hasta enraízan en los nudos que tocan el suelo. Su fruto comestible que según la variedad presenta diferencias de forma y color pueden ser aplastados, redondeados, alargados y piriformes, el color se debe a pigmentos contenidos en la carne del fruto, posee un sabor ligeramente ácido.

Necesita de climas templados (18-32°C) y altitudes de 0 a 182 msnm, para crecer sin problemas. La humedad relativa oscila entre 60 y 80%. En cuanto al pH los suelos pueden ser desde ligeramente ácidos hasta alcalinos cuando están enarenados (Gudiel, 1987; Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1980; Peralta, & Spooner, 2000).

Se produce y consume en todo el mundo tanto fresco como procesado de diferentes modos, ya sea como salsa, puré, jugo, deshidratado o enlatado (Gudiel, 1987; Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas, 1980; Peralta, & Spooner, 2000).

b. Aspectos económicos

Datos obtenidos durante la ENA registró en el año 2006 una producción de 217,157,166 kg de tomate con un valor aproximado de más de Q 608,000,000.00, y se reporta en el mismo año una exportación de 17,594,705 kg de tomate frescos o congelados con un valor de US\$ 2,800,000.00 (INE, 2007; ME, AGEXPORT y CIG, 2007).

3. *Phaseolus vulgaris* L. (Ejote) Fabaceae

a. Aspectos importantes del producto

Planta de vegetación rápida y anual, el fruto es una vaina verde intenso, aplanada y alargada en cuyo interior se disponen de 4 a 6 semillas arriñonadas según la especie. El principal uso de los ejotes verdes es culinario, se consumen enteros, y suelen ser cocinadas en la mayoría de los platos hervidas, aunque hay recetas que las incluyen crudas en ensaladas o servidas a la parrilla. Se pueden encontrar fácilmente en los mercados y supermercados (Gudiel, 1987).

Las temperaturas óptimas para el desarrollo del cultivo de ejote oscilan entre 10°C a 27°C, la humedad relativa debe ser entre el 70 y 80%, se desarrolla desde 300 hasta 2,000 m sobre el nivel del mar y a un pH entre 6 y 7.5 (Gudiel, 1987).

b. Aspectos económicos

La siembra de ejote francés con fines de exportación ha ido incrementándose en Guatemala en los últimos años. En el 2006 ENA reportó una producción de 34,766,857 kg de ejote con un valor de Q 179,000,000.00 y exportándose 3,342,506 kg con un valor que asciende los US\$ 2,900,000.00 (INE, 2007; ME, AGEXPORT y CIG, 2007).

#### 4. *Pisum sativum* L. (Arveja China) Fabaceae

##### a. Aspectos importantes del producto

Es una planta anual, trepadora con vainas de color verde intenso, prominentes, planas y translúcidas, se cosechan cuando alcanzan de 2.5 cm de ancho y 10 cm de largo y las semillas se encuentran en estado fresco y tierno. Se suelen consumir cocinadas en la mayoría de los platos, freídas o hervidas, hay recetas que las incluyen crudas en ensaladas. Son muy usadas en recetas de comida oriental (Gudiel, 1987).

La arveja china requiere temperaturas óptimas de 15 a 18°C. Tolera temperaturas máximas de 21 a 24°C y mínima de 7°C. Se adapta bien a una altura de 1000 a 3000 m sobre el nivel del mar. Esta planta se adapta a una gran variedad de suelos, prefiriendo pH comprendido entre 5.5 y 6.7 (Hernández, 1998).

##### b. Aspectos económicos

La cosecha anual para arveja china en el 2006 fue de 13,622,286 kg obteniéndose un total de Q 55,000,000.00 por concepto de producción mientras tanto por concepto de exportación en el 2006 se reportó US\$ 15,250,000.00 lo correspondiente a 14,696,274 kg de arveja china (INE, 2007; ME, AGEXPORT, y CIG, 2007).

#### 5. *Prunus persica* L. (Durazno) Rosaceae

##### a. Aspectos importantes del producto

Es un árbol pequeño que oscila entre 5 y 7 m de altura. Sus frutos son de pulpa blanca o amarilla adherida o no al hueso o pepita. De forma más o menos esférica con un surco longitudinal que los divide en dos partes. La mayoría de los árboles son cultivares injertados.

Las temperaturas óptimas para el crecimiento del duraznero se sitúan entre los 21 a 27°C, siendo la temperatura crítica o de daño por heladas de -1°C. Se cultiva en zonas templadas a una altura de 2,200 m sobre el nivel del mar, su

humedad relativa es del 95% y pH entre 7.5-7.6 (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación [MAGA], 1983).

b. Potencial económico

INE (2007) En base a los datos obtenidos por la ENA estableció una producción anual de 15,761,181 kg de durazno y obteniéndose un total que asciende alrededor de Q 47,500,000.00.

## H. Vegetales usados como fungicidas

1. *Chenopodium ambrosioides* L. (Apazote) Quenopodiaceae

a. Descripción botánica

Es una hierba anual o perenne, erguida, hasta 1.5 m, muy aromática. Hojas lanceoladas a elípticas, sinuado-dentadas, agudas, de hasta 13 cm, glandulosas. Flores en glomérulos densos o en espigas, sépalos 3 a 5, ovados; pétalos ausentes (TRAMIL, 1998).

b. Estudios Farmacológicos

El extracto acuoso de hoja seca ha demostrado actividad *in vitro* contra patógenos humanos como *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus vulgaris* y *Staphylococcus albus* mientras otras partes aéreas han demostrado actividad *in vitro* sobre *Plasmodium falciparum*. Se ha registrado una fuerte actividad antifúngica *in vitro* contra *Trichophyton mentagrophytes*, *Absidia ramosa* y *Microsporum gypseum* (Desta, 1993; Dixit, Dubey, Kishore, & Singh, 1981).

c. Química

La planta entera es rica en aceite esencial, llamado esencia de quenopodio. La cantidad del aceite esencial en la planta es menor en regiones de clima seco (0.55 mL/50 g planta seca) que en regiones húmedas (0.77 mL/50 g de planta seca). Los constituyentes mayoritarios del aceite esencial son: monoterpenos: ascaridol (peróxido terpénico, que representa 42 a 90% de la esencia), ascaridol-glicol, aritasona, beta-pineno, limoneno, mirceno, cimeno, felandreno, alcanfor, alfa-

terpineno, alfa-terpineol, asociados a pequeñas cantidades de salicilato de metilo y de ácido butírico (Cañigueral, 2002).

d. Toxicidad

La dosis letal del ascaridol estimada a partir de su concentración en el aceite es de 0.075 mL/kg en ratón. La literatura cita numerosas intoxicaciones en humano por el aceite esencial, algunas de las cuales han provocado la muerte (Wolf, 1932).

2. *Lippia graveolens* Humboldt, Bonpland & Kunth (Orégano) Verbenaceae

a. Descripción botánica

Arbusto de hasta 2 m de altura, de ramas y hojas pubescentes, hojas alargadas o elípticas de 2 a 4 cm de largo con pecíolos de 5-10 mm de largo. Flores en espigas sub globosa o prolongadas, flores con corola blanca (Gibson, 1970).

b. Estudios Farmacológicos

Estudios antifúngicos demuestran que los extractos con diclorometano y etanol son activos contra distintos hongos patógenos humanos, entre ellos *C. albicans*, *Epidermophyton floccosum*, *M. gypseum* y *T. rubrum* y el también patógeno de plantas *Aspergillus flavus*. Se ha documentado actividad del extracto etanólico en una Concentración Inhibitoria Mínima (CIM) contra el hongo dermatofito *M. gypseum* en 2.5 mg/mL (Morataya, 2006).

c. Química

El tamizaje fitoquímico de *L. graveolens* contiene aceite esencial (1.8%), glicósidos saponínicos y triterpenos, celulosa, pigmento y elementos minerales; la corteza y la raíz contienen glicósidos saponínicos, aceite esencial y taninos. Las hojas contienen además flavononas (pinocebrina, naringenina) y lapachenol (Morataya, 2006).

d. Toxicidad

La administración de los extractos acuosos y etanólicos de hojas durante el embarazo está contraindicada, ya que puede producir aborto. El lapachenol tiene actividad carcinogénica. La dosis letal del carvacol por vía oral en conejos es 100 mg/Kg (Morataya, 2006).

3. *Pimenta dioica* (L.) Merr. (Pimienta) Myrtaceae

a. Descripción botánica

Árbol de hasta 20 m, hojas opuestas, coriáceas, ovadas o elípticas de hasta 20 cm de largo. Panículas de alrededor de 12 cm de largo, flores en su mayoría agrupadas en la punta de la inflorescencia, sésiles, cáliz con 4 lóbulos redondeados, pubérulos, pétalos blancos suborbiculares, numerosos estambres blancos. Fruto aromático, generalmente subgloboso y verrugoso (Fernández, 1992).

b. Estudios Farmacológicos

De las hojas se destila un aceite utilizado en la industria alimentaria y en perfumería. Se ha reportado efecto insecticida contra *Callosobruchus maculatus* (F.) conocido comúnmente como gorgojo de cuatro manchas (Gonzáles, Hepp, Salvadores, y Tapia, 2007).

c. Química

La droga comercial (fruto seco recolectado antes de la madurez) contiene 2-5% de aceite esencial, con alrededor de 35% de eugenol, 40-45% de eugenol-metil-éter, cariofileno y cíñelo, ácidos grasos, una resina, almidón, ácido málico, oxalato de calcio y taninos (Hiokim, Kiuchi, Kondok, Nakamura, Miyashitan, & Tsuda, 1989).

d. Toxicidad

No se dispone de información que documente la seguridad de su uso medicinal en niños, durante el embarazo o la lactancia (TRAMIL, 1998).

#### 4. *Psidium guajava* L. (Guayaba) Myrtaceae

##### a. Descripción botánica

Árbol o arbusto de hasta 10 m de alto, de corteza escamosa. Hojas opuestas, corto-pecioladas, elípticas a oblongas, subcoriáceas, nervaduras conspicuamente impresas en el haz, prominentes en el envés. Flores blancas solitarias o en grupos de 2 a 3, en pedúnculos delgados, estambres numerosos. Fruto comestible, globoso o piriforme, amarillo, de 3 a 6 cm de diámetro (TRAMIL, 1998).

##### b. Estudios Farmacológicos

El extracto acuoso de hoja seca presenta actividad contra *Staphylococcus aureus* y *S. epidermidis*. El extracto acuoso de hoja es activo *in vitro* frente a *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Sarcina lutea*, *Serratia marcescens*, *Shigella flexneri*, *Staphylococcus albus* y *S. aureus*; así como ante cepas de *Epidermophyton floccosum* y *Candida albicans* (Cáceres, Herrera, Jáuregui, & Logemann, 1991).

##### c. Química

La flor contiene flavonoides: guaijaverina, quercetina, leucocianidina, triterpenos: ácido oleanólico (Mair, Pandiyan, & Venkasubramaniam, 1987; Millsra, & Seshadrit, 1968).

El fruto contiene aceite esencial: beta-bisaboleno, gama-cadineno, cariofileno y derivados, alfa-humuleno, alfa y beta-selineno, curcumeno, farneseno; flavonoides: guaijaverina, quercetina, leucocianidina; triterpenos y bencenoides. La corteza contiene taninos y las hojas contienen bencenoides (Chiang, Lee, & Guo, 1986).

##### d. Toxicidad

No usar durante el embarazo o la lactancia y en niños menores de 3 años (TRAMIL, 1998).

5. *Ocimum micranthum* Willd. (Albahaca blanca) Lamiaceae (*Ocimum guatemalense* Gand.)

a. Descripción botánica

Hierba erecta anual, usualmente 50 cm de altura o menos, tallos puberulentos o glabros; hojas delgadas, finas-pecioladas, aserradas, ampliamente ovaladas a oblonga-ovaladas, 2-7 cm de largo, agudas en la base, densa y finamente glandular. Inflorescencia con numerosos verticilios florales, separados, en alargada panícula racemosa, pedicelos 4-7 mm de largo, recurvados (Standley, & Williams, 1961).

b. Estudios Farmacológicos

El extracto acuoso de la semilla ha demostrado actividad contra bacterias Gram positivo y micobacterias. El aceite esencial posee potencial insecticida y fungicida frente a *Musca domestica* L. y a *Fusarium oxisporum* Schi, respectivamente. El eugenol es utilizado en odontología como analgésico local y desinfectante. Investigaciones médicas indican que el extracto inhibe el crecimiento de microorganismos causantes de disentería (Fernández, 1992; Linares, Maurillo, & Viña, 2002).

c. Química

La hoja contiene aceite esencial, saponinas y taninos. El aceite esencial contiene eugenol, iso-eugenol, 1,8-cineol,  $\alpha$ -terpineol,  $\beta$ -cariofileno, linalool,  $\beta$ -pineno,  $\alpha$ -pineno, canfeno, mirceno (Cruz, 2001).

d. Toxicidad

Del aceite esencial principios carcinogénicos han sido reportados en muestras de aceite esencial: safrol y estragol (Duke, 1984). La dosis letal del extracto metanol acuosa (4:1) es superior a 2 g/kg (Hussain, 1990). La dosis letal del polvo de la planta es superior a 6 g/kg (Akhtar, & Munir, 1989). No se conoce efectos adversos, indeseables ni contraindicaciones en el rango aplicado.

## I. Biocidas orgánicos usados tradicionalmente

En Guatemala actualmente existe una gran variedad de productos orgánicos con efecto biocida promoviendo el desarrollo de la agricultura orgánica.

La búsqueda de nuevos compuestos de origen biológico ha generado la introducción de productos orgánicos como el neem y el de vinagre de encino.

### 1. Neem (*Azadirachta indica* A. Juss) Meliaceae

El neem es uno de los árboles tropicales más comúnmente utilizados como una fuente de agentes terapéuticos. Muchos de los componentes activos del neem, azadiractina, salannin, meliantriol y nimbin han sido identificados, reportándose la azadiractina como el compuesto de mayor actividad (Koul, Isman, & Kethar, 1990).

Estudios *in vitro* han demostrado que las hojas de neem inhiben la formación de biofilms, las ramas del neem son comúnmente utilizadas en limpieza dental por varias tribus provenientes de India, África y Nigeria. Se han reportado efectos inhibitorios en muestras de saliva de personas que utilizan neem contra *Streptococcus mutans* y especies de *Lactobacillus* (Ansorg, Fabry, & Okemo, 1996).

Además se ha registrado que el extracto de corteza de neem, tiene actividad contra varias especies de *Candida*, reportando la concentración fungicida mínima de 0.06 a un máximo de 8 mg/mL (Ansorg, Fabry, & Okemo, 1996).

### 2. Vinagre de humo de encino. *Quercus* sp. (Encino) Fagaceae

Árbol mediano o grande grisáceo o café-rojizo con lenticelos prominentes o inconspicuos. Hojas oblanceoladas delgadas pero duras desde 10 hasta 20 cm de largo y de 3 a 7.5 cm de ancho. Peciolos de 5 a raramente 10 mm de largo, rojo oscuro en la base. Fruto bienal ovalado de 25 a 30 mm de largo al inicio pubescente y al madurar glabrado y café (Gupta, 1995).

Dentro de los usos etnobotánicos, la infusión de hojas y corteza se utiliza comúnmente en el tratamiento de afecciones gastrointestinales, hemorragias y anemia; además por el alto contenido de compuestos fenólicos conocidos como taninos, disminuyen el crecimiento bacteriano, por lo que es utilizado tópicamente para la desinfección de heridas, fistulas y úlceras (Ribeiro, Fiuza de Melo, De Barros, y Gómez, 2000).

#### IV. JUSTIFICACION

La economía de Guatemala está basada principalmente en la agricultura y esta ocupa el tercer lugar del PIB; por lo tanto las enfermedades causadas por hongos fitopatógenos que afectan los productos agrícolas tienen un gran impacto en la economía guatemalteca (BANGUAT, 2010).

El uso de plaguicidas en la agricultura para controlar a los hongos fitopatógenos son un rubro importante en los gastos de producción, además de dejar secuelas negativas, muchas de ellas de carácter irreversible para el medio ambiente y para el hombre.

Los extractos de algunas especies vegetales han demostrado poseer actividad contra hongos fitopatógenos, el origen natural de estos productos ha indicado causar menos daño que otros productos de origen sintético y posiblemente es más difícil que se desarrolle resistencia a estos antibióticos.

Basados en estas premisas se justifica el estudio de la efectividad de los extractos de *C. ambrosioides*, *O. micranthum*, *P. dioica*, *P. guajava* y *L. graveolens*, contra los hongos fitopatógenos *A. pisi*, *P. parasitica*, *S. sclerotiorum*, *M. fructicola*, *C. lindemuthianum*, que afectan los cultivos de arveja china, tomate, lechuga, durazno y ejote respectivamente, importantes productos de exportación nacional.

## V. OBJETIVOS

### A. General:

Demostrar la actividad inhibitoria de los extractos etanólicos de *C. ambrosioides*, *L. graveolens*, *O. micranthum*, *P. dioica* y *P. guajava*, especies vegetales conocidos popularmente en Guatemala, sobre hongos fitopatógenos.

### B. Específicos:

1. Establecer un bioensayo para determinar la actividad inhibitoria de los extractos etanólicos vegetales propuestos en este estudio sobre los hongos fitopatógenos *A. pisi*, *C. lindemuthianum*, *M. fructicola*, *P. parasitica* y *S. sclerotiorum*.
2. Determinar la actividad biocida de los extractos etanólicos de *C. ambrosioides*, *L. graveolens*, *O. micranthum*, *P. dioica* y *P. guajava*.
3. Establecer la CIM de los extractos etanólicos que resulten positivos.
4. Comparación de la actividad inhibitoria de los extractos sobre los cinco hongo estudiados.

## VI. HIPOTESIS

Por lo menos uno de los extractos etanólicos de *C. ambrosioides*, *L. graveolens*, *O. micranthum*, *P. dioica* y *P. guajava* poseen actividad contra los hongos fitopatógenos *A. pisi*, *C. lindemuthianum*, *M. fructicola*, *P. parasitica* y *S. sclerotiorum*.

## VII. MATERIALES Y MÉTODOS

### A. Universo de trabajo

1. Especies vegetales de uso popular utilizados en el control de hongos fitopatógenos.

### B. Muestra

1. Materia vegetal de las especies
  - a. *C. ambrosioides*
  - b. *L. graveolens*
  - c. *P. dioica*
  - d. *P. guajava*
  - e. *O. micranthum*

### C. Recursos

1. Humanos
  - a. Seminaristas: Br. Sergio René Francisco Aifán González  
Br. Nancy Verónica Castro López  
PC. Nadia Iveth Miranda Galván  
Br. Lourdes Gabriela Villanueva Cárdenas
  - b. Asesor: Lic. Armando Cáceres
  - c. Revisora: Licda. María Eugenia Paredes
2. Institucionales
  - a. Laboratorio de Bioensayos Departamento de Citohistología, Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC.
  - b. Laboratorio de investigación de Productos Naturales (LIPRONAT), Facultad de Ciencias Químicas y Farmacia USAC.
  - c. Laboratorio de Diagnóstico Fitopatológico, Facultad de Agronomía USAC.

#### **D. Materiales**

1. Agua destilada
2. Algodón
3. Asa de nicromo
4. Bolsas ziploc
5. Cajas de Petri
6. Cajas de Petri cuadriplate
7. Caldo tripticasa soya
8. Campanilla de Durham
9. Cepa de cultivo puro del hongo fitopatógeno *A. pisi*, *C. lindemuthianum*, *M. fructicola*, *P. parasitica* y *S. sclerotiorum*
10. Discos estériles sin impregnar
11. Etanol al 50%, 75%, 95%
12. Láminas cubreobjetos
13. Láminas portaobjetos
14. Papel aluminio
15. Papel filtro
16. Papel mayordomo
17. Papel parafilm
18. Pinzas estériles
19. Pipetas automáticas
20. Puntas amarillas de 1,000 uL
21. Puntas azules de 200 uL
22. Regla graduada en mm
23. Tubos con tapón de rosca de 15 mL
24. Viales con tapadera de rosca

#### **E. Cristalería**

1. Balón de 1,000 mL
2. Cajas de Petri de vidrio estériles, que contengan un soporte de vidrio, un portaobjetos y un cubreobjetos

3. Erlenmeyer de 1,000 mL
4. Probeta de 1,000 mL
5. Tubos con tapón de rosca de 15 mL
6. Vaso de precipitación

**F. Equipo**

1. Autoclave
2. Balanza analítica y semi analítica
3. Cámara de Neubauer
4. Campana de flujo laminar
5. Desecadora
6. Espátulas
7. Estereoscopio
8. Estufa
9. Gradilla
10. Horno
11. Incubadora a 27°C y 37°C
12. Microscopio
13. Percolador de acero inoxidable
14. Refrigeradora
15. Rotavapor
16. Vortex

**G. Reactivos**

1. Agar-agar
2. Agar Malta acidificado con estreptomicina 0.2mg/mL
3. Agar Patata Dextrosa (PDA)
4. Agar Peptona
5. Agar Sabouraud
6. Azul de metileno
7. Caldo tripticasa soya

8. Etanol al 50%, 75%, 95%
9. Fosfato diácido de potasio
10. Solución salina
11. Sulfato de sodio

## H. Metodología

### 1. Aislamiento de los hongos fitopatógenos

Las cepas de los hongos en estudio fueron aisladas de plantas de tomate, ejote, arveja china, lechuga y melocotón infectadas. Estas fueron recolectadas en el municipio de Patzicía del departamento de Chimaltenango en cultivos aladaños a la carretera Interamericana (Figura 1). El aislamiento se realizó en cajas de Petri con agar Sabouraud, PDA y agar malta acidificado con estreptomicina bajo condiciones controladas. Se realizaron los aislamientos necesarios hasta obtener cepas puras.



Figura 1 Recolección de material vegetal infectado por hongos fitopatógenos

## 2. Identificación de los hongos fitopatógenos (Cultivo en lámina)

Los hongos fueron cultivados en lámina para el análisis de estructuras de reproducción y la morfología en general, para este proceso fue necesario realizar preparaciones en fresco y tinciones con azul de lactofenol con los siguientes pasos:

- a. Se cortaron cuadros de 1 cm cuadrado de agar PDA.
- b. El material estéril se desempacó y se colocó el cuadro de agar sobre el portaobjetos, usando técnicas asépticas.
- c. El hongo fue inoculado en cada lado de los cuadros del agar y se cubrió con el cubreobjetos.
- d. Se añadieron 8 ml de agua destilada estéril a la caja que contiene el inóculo.
- e. Se incubó a 25° C de 3-4 días.
- f. Se colocó una gota de azul de lactofenol sobre un portaobjetos y se colocó encima el cubreobjetos con cultivo.
- g. Se procedió a remover el exceso de colorante y sellar la preparación con esmalte de uñas transparente (Toriello, y Ulloa, 2002).

## 3. Cultivo trampa para *Phytophthora* sp. en manzana

Se realizó el cultivo en trampa para obtener *Phytophthora* sp. del suelo contaminado y del tejido enfermo introduciéndolo en frutos de manzana para obtener *Phytophthora* sp. de la pudrición generada en la misma (Figura 2).

- a. Se identificaron las aéreas y órganos de la planta infectada y realizaron cortes de 2.0 x 1.0 cm aproximadamente del borde de la lesión.
- b. Se realizó el tren de desinfección dentro de la campana de flujo laminar.
- c. Se seleccionó la manzana a utilizar y se le realizó una desinfección en su superficie con etanol al 70% durante 30 segundos.
- d. Utilizando un perforador se realizaron orificios de 5 mm de diámetro y 30 mm de profundidad alrededor de la manzana (aproximadamente de 5-6 orificios por manzana).

- e. Con ayuda de pinzas estériles se introdujeron los pequeños trozos del tejido de la planta infectada en los orificios y se adicionó agua destilada hasta cubrir la mitad de este.
- f. Los orificios fueron cubiertos con cinta adhesiva transparente y se dejaron a temperatura ambiente en posición vertical por 5 días.
- g. El cultivo trampa fue revisado, el cual fue positivo, ya que la manzana presentó una consistencia acuosa-ligosa y de tono café oscuro (aspecto podrido).
- h. El cultivo trampa positivo fue cortado con ayuda de pinzas estériles con el fin de obtener pequeños trozos de la pulpa de la manzana con el hongo, seguidamente se colocó en cajas de agar PAR-BH y Sabouraud.
- i. Se incubaron las cajas a temperatura 25°C durante 5-7 días y se realizó la identificación de los hongos.



Figura 2. Cultivo trampa para *Phytophthora* sp. en manzana.

#### 4. Preparación de extractos etanólicos por percolación.

Las cinco drogas vegetales se adquirieron en el Laboratorio de Productos Naturales FARMAYA S.A.

La preparación de los extractos consistió en hacer pasar lentamente un disolvente a través del material vegetal hasta la extracción completa de la droga (Figura 3). Para realizar la percolación y obtener los extractos se siguieron los siguientes pasos:

- a. En un percolador previamente limpio y seco, se colocó un poco de algodón en la parte inferior y papel filtro cortado de acuerdo al diámetro del percolador.
- b. Se pesó la cantidad de materia vegetal a utilizar de acuerdo al tamaño del percolador haciendo uso de un tamiz.
- c. El material se transfirió al percolador y se agregó disolvente hasta cubrir el material vegetal. Se dejó reposar (18-24 h).
- d. Se recogió el líquido en un Erlenmeyer.
- e. Según fue requerido se añadió suficiente disolvente extra, hasta obtener el volumen de disolvente agregado al inicio. Se presionó fuertemente el material sólido que había quedado.
- f. Se preparó a partir de la solución obtenida extractos, concentrando en el rotavapor y se repitió la operación hasta que se agotó la droga con el disolvente recuperado (Kuklinski, 2000; Larone, 2002; Medinilla, 1996; Sharapin, 2000)



Figura 3. Preparación de extractos etanólicos por percolación.

##### 5. Concentración usando rotavapor

La concentración representó la etapa siguiente al proceso de extracción. El proceso de extracción buscó aumentar el contenido de sólidos totales en el extracto con la finalidad de alcanzar el máximo contenido de residuo seco, reducir el volumen y recuperar el disolvente. Los extractos también pueden ser concentrados en la extracción en contracorriente con disolventes no miscibles, con miras en la fabricación de extractos purificados o el aislamiento de sustancias puras (Larone, 2002; Medinilla, 1996).

El equipo necesario para la concentración con recuperación de disolventes fue el evaporador rotatorio, cuyo funcionamiento se basa en los siguientes principios:

- i. La muestra colocada en un balón de evaporación a 40°C rota a una velocidad constante produciendo una película que aumenta la superficie de evaporación.

- ii. El efecto se logra con la ayuda de una bomba al vacío entre 30 y 300 mbar, que facilita la evaporación sin necesidad de aumentar la temperatura.
- iii. El vapor del disolvente se condensa en el refrigerante que está conectado a un sistema de enfriamiento para colectarlo en un balón colector (Larone, 2002; Medinilla, 1996).

## 6. Validez del método

Para validar el ensayo se realizó una curva de relación dosis/efecto, Preparándose Agar-Droga con Sabouraud añadiendo el anti fúngico de elección para cada hongo, benomil (antifúngico de elección contra *A. pisi*, *C. lindemuthianum*, *Monilia fructicola* y *S. sclerotiorum*) en concentraciones de 1, 2, 2.5, 5, 10, 15 y 20 µg/mL, y metconazol (antifúngico de elección contra *P. parasitica*) utilizando concentraciones de 2.5, 5, 10, 15 y 20 µg/mL.

Se abrieron agujeros en las cajas de Agar-Droga con campanillas de Durham estériles de 5 mm de diámetro. De la suspensión de esporas se tomaron 30 µL y se depositaron en los agujeros, las cajas se incubaron a 27°C, realizando lecturas a los 7, 14 y 21 días. En el bioensayo se utilizaron como controles biológicos positivos los extractos de neem y vinagre de humo de encino con conocida efectividad contra hongos fitopatógenos.

## 7. Tamizaje de la actividad antimicótica *in vitro*

### a. Preparación de medio de cultivo

- i. Se prepararon tubos con 13.5 mL de agar Sabouraud
- ii. Se esterizaron durante 15 min a 121°C, dejar enfriar a 50°C y agregar 1.5 mL del extracto de la planta a probar (dilución 1:10). Se agitó. La concentración final que se tiene es de 1 mg/mL.
- iii. Se vertió en cajas de Petri estériles, dejándose solidificar e incubándose a 36°C durante 24 h para verificar esterilidad.

- iv. Se procedió a guardar en refrigeración hasta el momento de su uso (Burlingame, & Reddish, 1973).
- b. Preparación de inóculo
- i. El medio Takashio fue preparado para la esporulación del hongo.
  - ii. Fue agregado a 300 mL de agua destilada, 0.6 g de dextrosa, 0.3 g de sulfato de sodio, 0.3 g de fosfato diácido de potasio, 0.3 g de Peptona y 6.0 g de agar-agar y se disolvió. Se vertió 6 mL en tubos de tapón de rosca, esterilizándose en autoclave y dejándose solidificar con el mayor declive posible. Incubando 48 h a 25°C para descartar contaminación.
  - iii. Se sembraron en ese medio los hongos a ensayar y se incubaron a 27°C durante 21 días hasta obtener un crecimiento homogéneo, aproximadamente 15 días.
  - iv. A cada tubo se agregó 2 mL de agua destilada estéril y se desprendió el hongo con ayuda de una varilla.
  - v. El material obtenido se trasvasó a viales de tapa de rosca. Agitando 1 min en agitador y se procedió a hacer un conteo de esporas en cámara de Neubauer.
  - vi. La suspensión se llevó a  $100 \text{ esporas}/\mu\text{L} = 1 \times 10^5 \text{ esporas/mL}$ , (aproximadamente 10 esporas/cuadrante) y se almacenó en viales estériles en refrigeración (Burlingame, & Reddish, 1973).
8. Inoculación de hongos filamentosos en placa
- a. Se abrieron cuatro agujeros en las cajas con agar-planta a diferentes concentraciones, con una campanilla de Durhan de 5 mm de diámetro en forma equidistante.
  - b. De la suspensión de esporas se tomaron 30  $\mu\text{L}$  y se depositaron en los agujeros.
  - c. Se incubaron a 27°C por 14 días.

- d. Se realizaron 4 repeticiones en la misma forma, usando una caja con agar Sabouraud como control negativo y una caja con agar-fungicida químico como control positivo.

9. Lectura e interpretación de los resultados

- a. Se midió el diámetro de la colonia del hongo en mm.
- b. Se calculó el porcentaje de inhibición, comparando el diámetro contra el de las colonias en las cajas de control.
- c. La interpretación de los resultados se realizó tomando como positivo los extractos que reducen el diámetro de la colonia en un 75%.

10. Concentración inhibitoria mínima (CIM)

Consistió en la cuantificación mínima de un extracto, fracción o compuesto originado de una droga vegetal que previene el crecimiento visible de microorganismos, es decir, que ha demostrado su actividad en una prueba de tamizaje previo. Para su realización se emplearon diluciones seriadas del extracto y concentraciones constantes del microorganismo y se evaluó el crecimiento del microorganismo en un ensayo estandarizado similar al que sirvió de tamizaje.

a. Procedimiento:

- i. Preparación Agar-Planta
- ii. Se prepararon tubos con 3.6, 3.8, 4 mL de agar Sabouraud.
- iii. Por 15 min a 121°C se esterilizaron, se dejaron enfriar a 50°C y se agregó la solución del extracto disuelto (concentración de 10 mg/mL) en una caja cuadriplate de la siguiente manera:  
3.6 mL de agar + 0.4 mL de la solución de extracto = 1.0 mg/mL  
3.8 mL de agar + 0.2 mL de la solución de extracto = 0.5 mg/mL  
4 mL de agar + 0.1 mL de la solución de extracto = 0.25 mg/mL
- iv. Uno de los cuadrantes se dejó con 4.0 mL de agar como control negativo.
- v. Se dejó solidificar y se incubó a 36°C por 24 h, para comprobar esterilidad.

vi. Se guardó en refrigeración hasta el momento de usar.

## 11. Diseño estadístico

Actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre hongos fitopatógenos.

Variedades de hongos: *A. pisi*, *C. lindemuthianum*, *M. fructicola*, *P. parasítica* y *S. sclerotiorum*

Tratamiento: cinco extractos etanólicos de las especies vegetales *C. ambrosioides*, *L. graveolens*, *O. micranthum*, *P. dioica* y *P. guajava*

### a. Ensayo inhibitorio

Tamizaje: Placa (Agar-Planta)

Diseño casi experimental: totalmente al azar con 4 réplicas por extractos de tipo etanólico de las plantas *C. ambrosioides*, *L. graveolens*, *O. micranthum*, *P. dioica* y *P. guajava* contra los hongos fitopatógenos implicados en este estudio. Dichos hongos se inocularon 4 veces en placas con Agar-planta preparadas a partir de los extractos etanólicos de las cinco plantas estudio.

Se hicieron 4 repeticiones para un nivel de significancia  $\alpha = 0.10$  (según la tabla de probabilidades de la distribución binomial).

### b. Análisis

Como la respuesta es inhibición o no (binomial) se realizó una prueba de hipótesis binomial.

$p$  = probabilidad de éxito (inhibición).

$q$  = probabilidad de fracaso (crecimiento o no inhibición).

50% 0.50  $p=q$  para la prueba de hipótesis y si  $p>q$  quiere decir que si hay efecto.

$H_0$ :  $p \leq 0.5$  (no tiene efecto)

$H_a$ :  $p > 0.5$  (si tiene efecto)

Si de las 4 repeticiones todas son éxito:  $H_0$  se rechaza (si hay efecto significativo con  $p = 0.06$ ).

Con los extractos que mostraron efecto se realizó la técnica de CIM con distintas diluciones (Concentraciones), el procedimiento estadístico es el mismo para cada dilución.

## VIII. RESULTADOS

### A. Aislamiento e identificación de los hongos fitopatógenos

Después de la consulta a especialistas en agricultura orgánica, se detectaron las especies fitopatógenas para los cultivos comerciales de interés, es así que se colectaron los cultivos infectados.

El aislamiento de los hongos fitopatógenos conllevó la realización de un tren de desinfección para cada uno de los materiales infectados y diferentes procedimientos para cada uno de los hongos implicados.

Para el aislamiento de *M. fructicola* se consiguieron duraznos momificados los cuales presentaban el signo provocado por el hongo pero este no se encontraba viable, por lo cual se procedió a la obtención y posterior pudrición de duraznos los cuales presentaron momificación por el hongo en cinco días. De este modo de 14 materiales infectados se aisló el hongo en 8 de ellos. Del tomate se obtuvieron 18 materiales infectados a los cuales se les realizó el procedimiento de cultivo trampa, obteniendo cuatro aislamientos de *P. parasitica*. Del ejote se obtuvieron 21 materiales infectados de los cuales solamente en cuatro se aisló el hongo *C. lindemuthianum* y de arveja se obtuvieron 30 materiales infectados de los cuales en tres se aisló el hongo *A. pisi*.

Una vez aislados los hongos fitopatógenos, se dejaron crecer en agar Sabouraud, comprobándose que a los siete días el crecimiento era máximo por parte de los cinco hongos. Al lograr el cultivo puro, se verificaron las estructuras microscópicas por azul de metileno y se inocularon en agar Takashio para la producción de esporas en 21 días. Posteriormente se realizó el conteo de esporas en cámara de Neubauer para tener una concentración de  $1 \times 10^5$  esporas/mL de cada hongo, dicha suspensión se guardó en viales para almacenarlos en refrigeración hasta su uso.

Respecto al hongo *S. sclerotiorum*, su aislamiento se realizó a partir de la obtención de los esclerocios, fase asexual del hongo fitopatógeno que infecta a la lechuga. Posteriormente a los esclerocios se les realizó un tren de desinfección los cuales fueron inoculados en agar Sabouraud e incubados a 37°C. Se aislaron alrededor de 22 a 25 nuevos esclerocios por cada esclerocio inoculado, alcanzando cada uno un crecimiento máximo a los siete días de incubación.

## B. Obtención de extractos

Las especies vegetales que podrían tener actividad antifúngica contra los hongos fitopatógenos implicados en este estudio, se colectaron y posteriormente se secaron, se molieron y se prepararon los extractos etanólicos, obteniéndose el porcentaje de rendimiento de cada extracto, en base al peso inicial de la materia vegetal seca y el peso final del extracto como puede verse en la Tabla 1 y Anexo I.

Tabla 1  
Rendimiento de los extractos etanólicos de las especies en estudio

<b>Especie</b>	<b>Procedencia</b>	<b>No. Herbario*</b>	<b>Rendimiento (%)</b>
<b><i>C. ambrosioides</i></b>	Livingston, Izabal	411	25.24
<b><i>L. graveolens</i></b>	Samayac, Suchitepéquez	1083	22.49
<b><i>O. micranthum</i></b>	Samayac, Suchitepéquez	1064	16.96
<b><i>P. dioica</i></b>	Samayac, Suchitepéquez	1171	19.96
<b><i>P. guajava</i></b>	Samayac, Suchitepéquez	1169	18.37

\* Número de herbario proporcionado por FARMAYA

**Fuente:** Datos experimentales

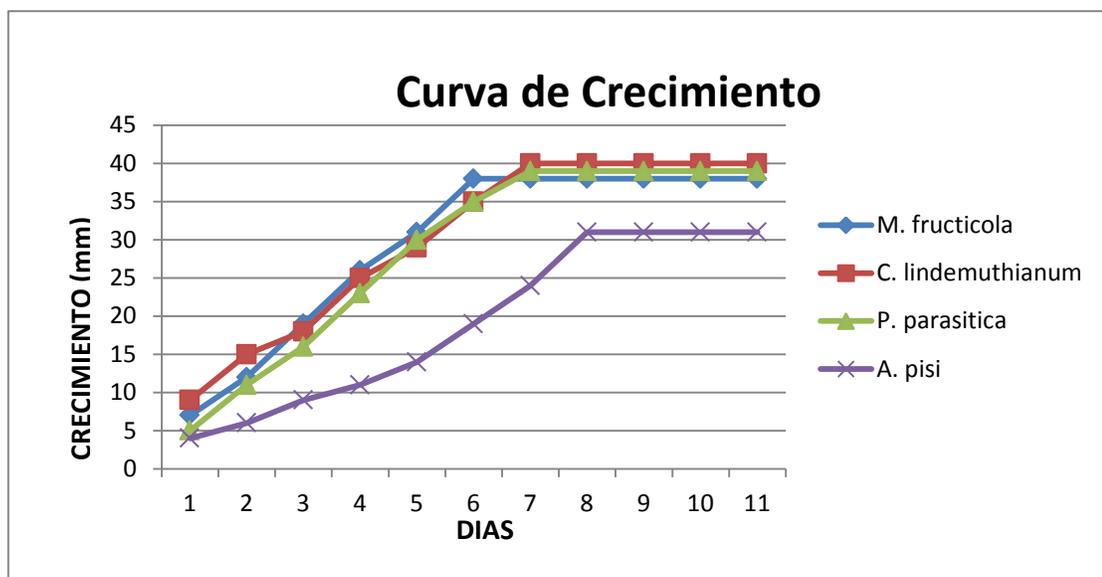
El procedimiento para la preparación de extractos etanólicos de las cinco especies vegetales utilizadas en el estudio puede verse en el Anexo I, en donde una vez se obtuvo el extracto, se procedió a pesarlo y desecarlo para subsiguientemente realizar las diluciones de los extractos.

### C. Validación de la metodología

El método de Brancato & Golding (1983) modificado por MacRae (1988) está descrito para el crecimiento *in vitro* de hongos filamentosos, por lo que fue necesario adaptar el método para evaluar la actividad contra hongos septados y contra un Oomycete.

El método fue adaptado realizando una curva de crecimiento para cada hongo, en donde se determinaron los días en que el hongo llegaba a su crecimiento máximo después de ser inoculado, teniendo una media del crecimiento máximo de todos los hongos de siete días, como se muestra en la Gráfica 1 (fase micelial) y Gráfica 2 (fase asexual).

Gráfica 1



Curva de crecimiento fase micelial de los hongos fitopatógenos: *A. pisi*, *M. fructicola*, *C. lindemuthianum* y *P. parasitica* a los 7 días de incubación.

**Fuente:** Datos experimentales

Gráfica 2



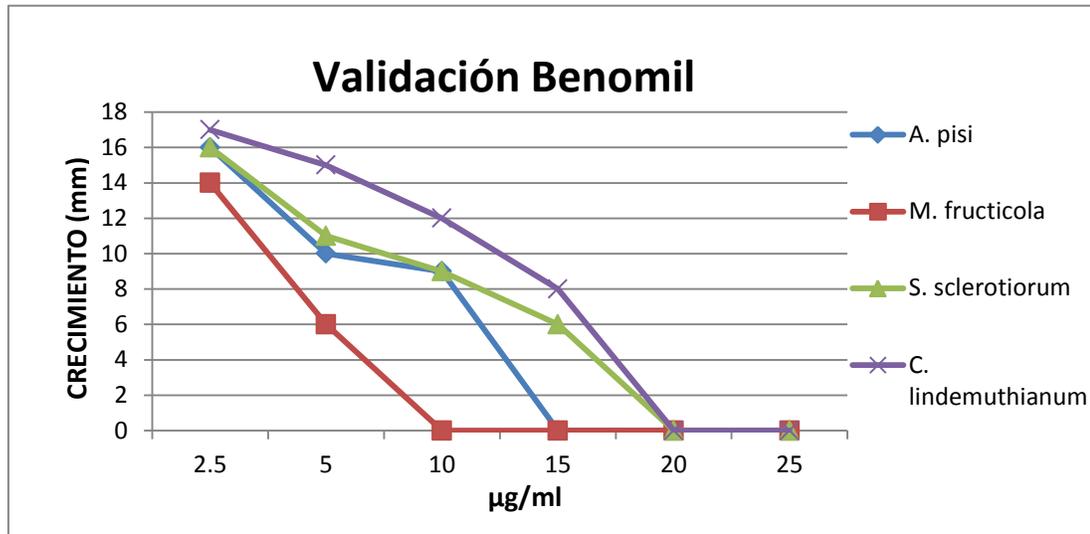
Curva de crecimiento fase asexual del hongo *S. sclerotiorum* a los 7 días de incubación.

**Fuente:** Datos experimentales

Como parte de la validación del estudio, se realizaron curvas de crecimiento con cuatro fungicidas, dos de origen sintético (benomil y metconazol) y dos de origen orgánico (extracto de neem y vinagre de humo de encino) para analizar su comportamiento frente a los cinco hongos evaluados.

*M. fructicola* presentó una inhibición con el fungicida benomil a una menor concentración (10 µg/mL) con respecto a los demás hongos (Gráfica 3).

Gráfica 3



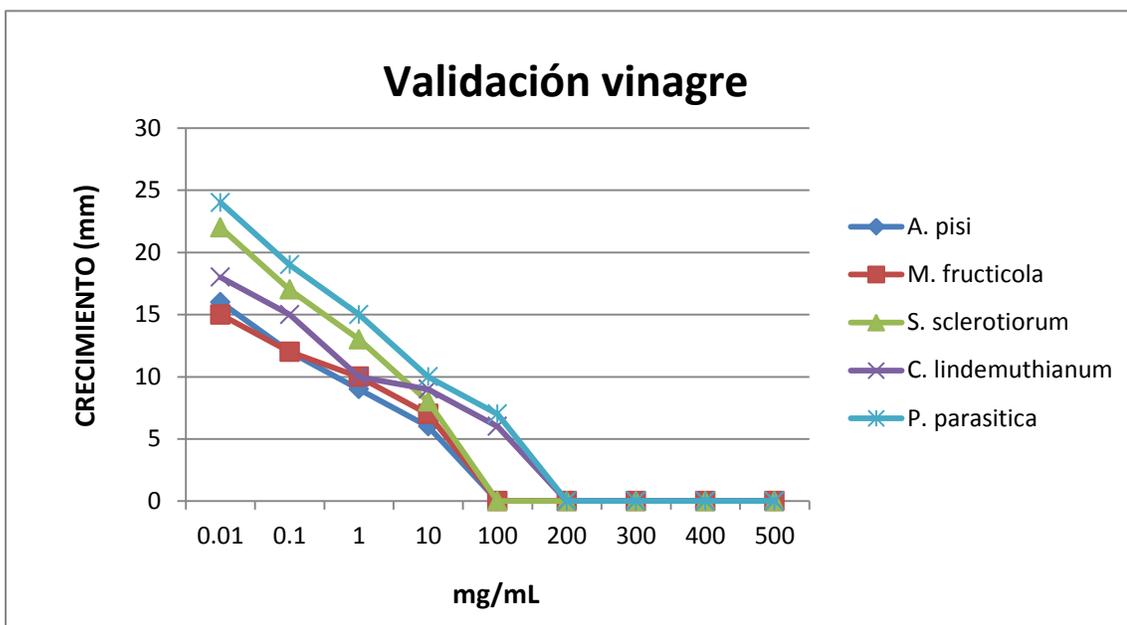
Validación del antifúngico sintético benomil a los siete 7 de incubación.

**Fuente:** Datos experimentales

Se realizó la validación utilizando metconazol como antifúngico químico de elección para *P. parasitica*, el cuál mostró una actividad positiva para todas las concentraciones utilizadas siendo la mínima 0.00045 µg/mL, con lo cual se evidenció la alta efectividad del fungicida.

El comportamiento de los fungicidas de origen natural evidenció que el vinagre de humo de encino presenta una mayor potencia a menores concentraciones para inhibir a los hongos fitopatógenos en comparación con el fungicida neem (Gráfica 4 y 5).

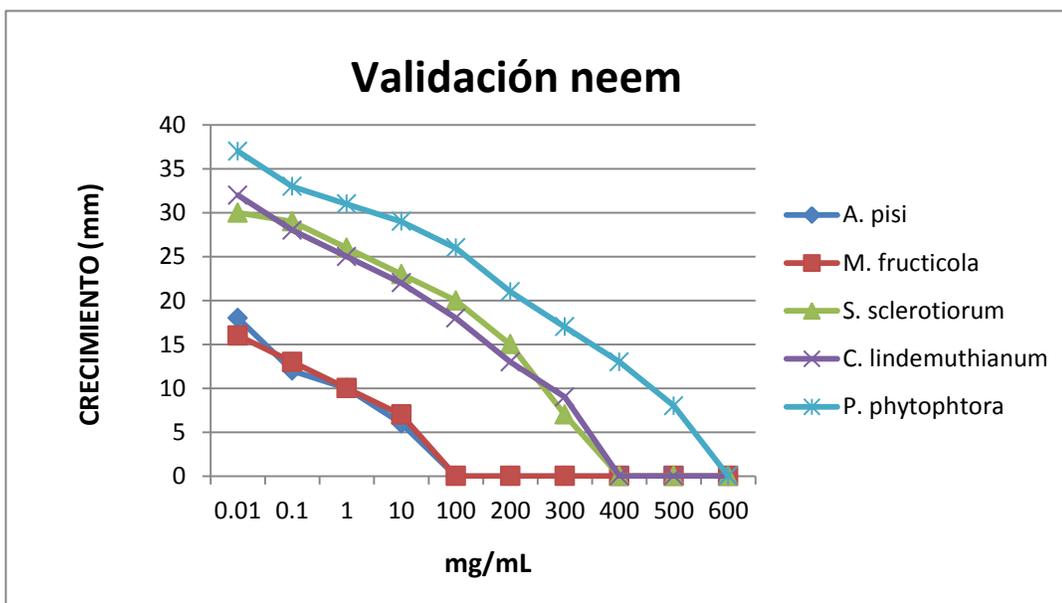
Gráfica 4



Validación del antifúngico natural vinagre de humo de encino a los 7 días de Incubación.

**Fuente:** Datos experimentales

Gráfica 5



Validación de antifúngico natural neem a los 7 días de incubación.

**Fuente:** Datos experimentales

En el caso de *P. parasítica*, por ser un oomycete fue necesario usar otro antifúngico químico, tal es el caso de metconazol, como puede observarse este presenta mayor actividad fungicida en comparación con vinagre de humo de encino y neem inhibiendo el crecimiento en su mínima concentración (0.00045 µg/mL), considerándose un fungicida con alta efectividad. En el caso de los fungicidas de origen orgánico el vinagre de humo de encino presentó una actividad fungicida a 200 mg/mL, mayor que la presentada por neem (600 mg/mL) infiriendo así que el neem no posee una alta efectividad fungicida ante el oomycete como puede verse en la Figura 5 y Gráficas 3, 4 y 5).

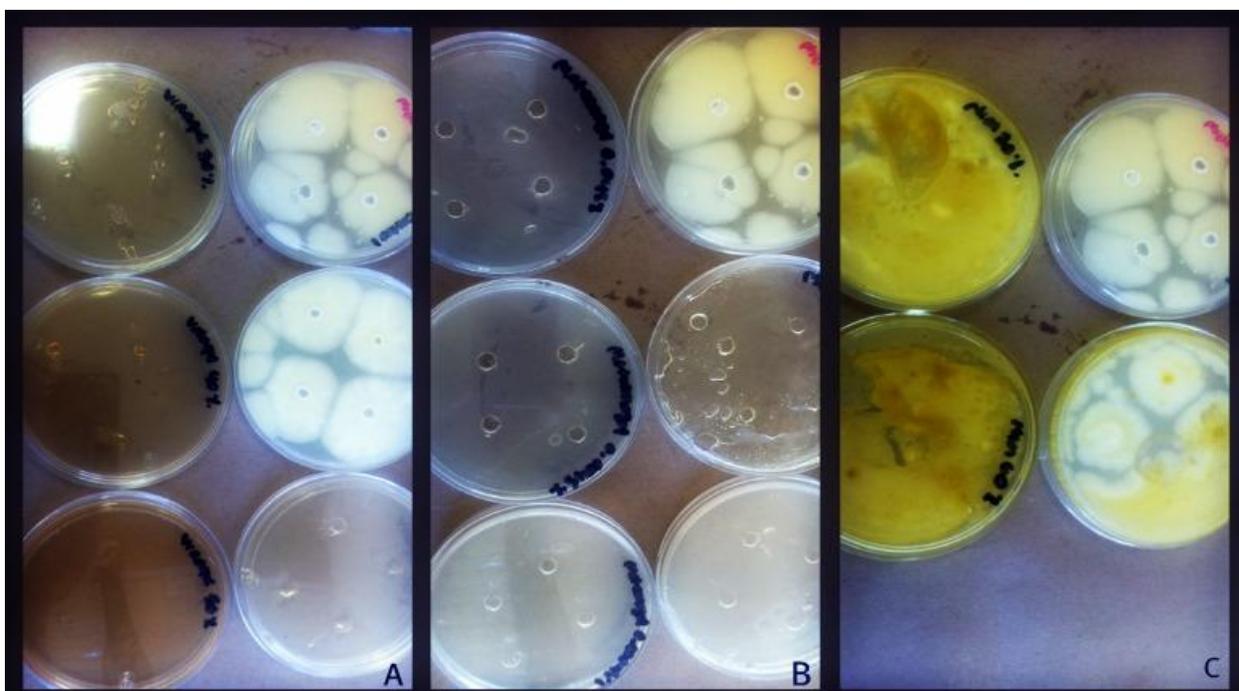


Figura 5 Tamizaje de *P. parasítica*. A. Validación en vinagre. B. Validación en metconazol. C. Validación en neem.

En la validación del fungicida químico benomil frente al hongo asexual, *S. sclerotiorum*, se observó que dicho fungicida presenta una mayor efectividad, inhibiendo el crecimiento del hongo a una concentración de 20 µg/mL. Por otra parte, de los fungicidas orgánicos utilizados el que manifestó una mejor actividad fungicida fue el vinagre de humo de encino, inhibiendo el crecimiento a una

concentración de 100 mg/mL, mientras que el neem lo inhibió hasta una concentración de 400 mg/mL como puede observarse en la Figura 6 y Gráficas 3, 4 y 5.

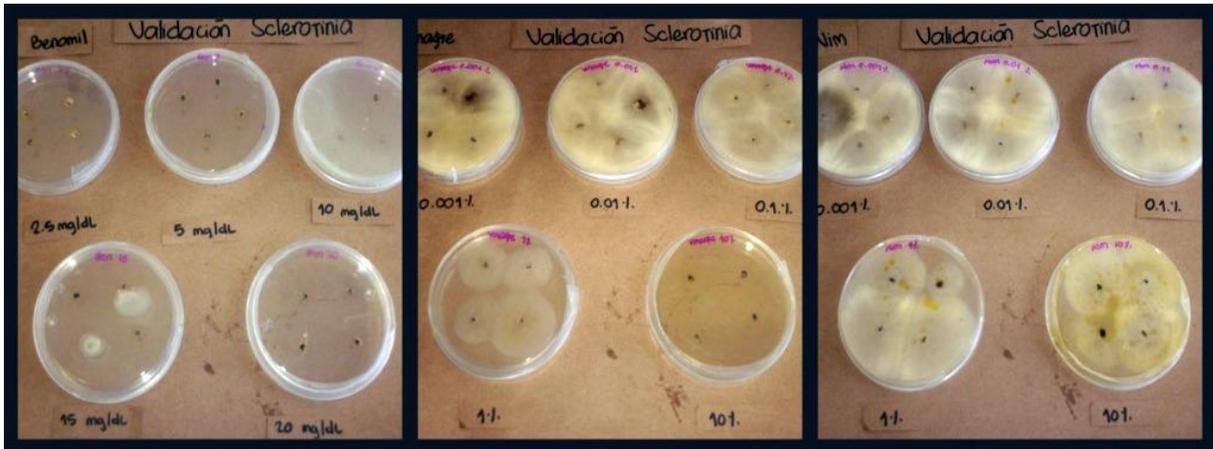


Figura 6. Validación de tres fungicidas frente a *S. sclerotiorum*. A. Validación de benomil. B. Validación de neem. C. Validación de vinagre.

#### D. Actividad antifúngica

Se realizó el tamizaje antifúngico de la fase micelial de tres hongos, *A. pisi*, *C. lindemuthianum*, *M. fructicola* y del oomycete *P. parasitica* frente a los cinco extractos, los tiempos de incubación correspondieron a los 7 días detectados en la fase de validación metodológica. Para cada bioensayo se utilizó un control negativo y tres controles positivos, neem y vinagre de humo de encino para todos los hongos, benomil para los miceliales y metconazol para el oomycete. Una vez realizado todos los bioensayos con sus respectivos controles se observó que *P. guajava* presentó actividad fungistática contra el hongo *C.lindemuthianum* a una concentración de 1 mg/mL a los 7 días de incubación. Por otra parte el resto de los hongos fitopatógenos y el oomycete no se vieron inhibidos frente a los cinco extractos utilizados a la misma concentración y tiempo de incubación, como se muestra en la Tabla 2 y las Figuras 7, 8 y 9.

Tabla 2

Tamizaje antifúngico de los cinco extractos contra los hongos fitopatógenos a los siete días de incubación

Hongo Fitopatógeno Control/ Extracto	<i>M. fruticola</i>				<i>C. lindemuthianum</i>				<i>A. pisi</i>				<i>P. parasitica</i>			
	D	I	A	Valor p*	D	I	A	Valor p*	D	I	A	Valor p*	D	I	A	Valor p*
Control negativo	38	0	-	0.06	32	0	-	0.06	28	0	-	0.06	33	0	-	0.06
Control vinagre	0 <sup>e</sup>	100	+	1	0 <sup>g</sup>	100	+	1	0 <sup>f</sup>	100	+	1	0 <sup>g*</sup>	100	+	1
Control neem	0 <sup>f</sup>	100	+	1	0 <sup>h</sup>	100	+	1	0 <sup>f</sup>	100	+	1	0 <sup>i*</sup>	100	+	1
Control benomil/	0 <sup>b</sup>	100	+	1	0 <sup>d</sup>	100	+	1	0 <sup>c</sup>	100	+	1	-	-	-	-
Control metconazol	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	0 <sup>a</sup>	100	+	1
<i>C. ambrosioides</i>	31	18.4	-	0.06	26	18.7	-	0.06	24	14.2	-	0.06	27	18.1	-	0.06
<i>L. graveolens</i>	29	23.7	-	0.06	28	12.5	-	0.06	22	21.4	-	0.06	28	15.1	-	0.06
<i>O. micranthum</i>	29	23.7	-	0.06	27	15.6	-	0.06	26	7.1	-	0.06	30	9.1	-	0.06
<i>P. dioica</i>	27	28.9	-	0.06	26	18.7	-	0.06	26	7.1	-	0.06	29	12.1	-	0.06
<i>P. Guajava</i>	30	21.0	-	0.06	24	25.0	-	0.06	23	17.8	-	0.06	28	15.1	-	0.06

Fuente: Datos experimentales: D (Diámetro), I (Inhibición), A (Actividad), (-) Actividad negativa a una concentración de 1mg/mL.

Concentraciones de los fungicidas orgánicos y sintéticos a = 0.00045 µg/ml, b = 10 µg/ml, c = (15 µg/ml), d = (20 µg/ml), e = 10, 000 µg/ml, f = 100, 000 µg/ml, g = 200, 000 µg/ml, h= 400, 000 µg/ml i = 600, 000.

(\*) Valor de la probabilidad con la prueba de hipótesis binomial ( $\alpha = 0.10$ ), de acuerdo con el diámetro de la colonia del hongo, respecto al control.

El tamizaje de *C. lindemuthianum* se realizó mediante el bioensayo con los cinco extractos etanólicos y una cepa control (Figura 7A), a los siete días de incubación de la cepa de *C. lindemuthianum* en el extracto etanólico *P. guajava* muestra una actividad fungistática (Figura 7A y 7B), no ocurriendo lo mismo para el resto de los extractos etanólicos en donde hubo crecimiento del hongo. Posteriormente a la actividad presentada por el extracto de *P. guajava* sobre el hongo, éste se dejó incubando hasta el día 14 observándose un crecimiento máximo (Figuras 7C y 7D).

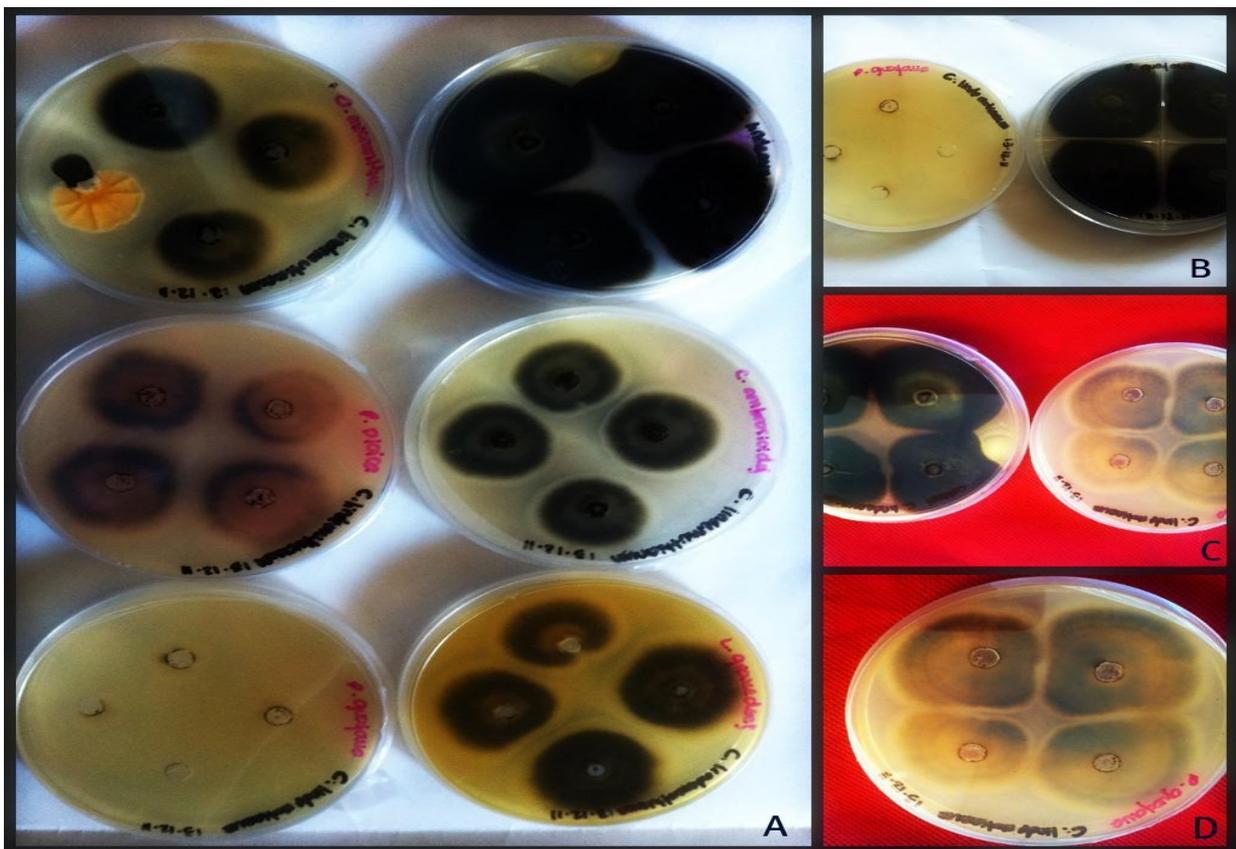


Figura 7. Tamizaje de *C. lindemuthianum*. A. Bioensayo de los cinco extractos etanólicos más una cepa control a los 7 días de incubación. B. Cepa control y *C. lindemuthianum* en extracto de *P. guajava* a los 7 días de incubación. C y D. cepa control y *C. lindemuthianum* en extracto de *P. guajava* a los 14 días de incubación.

Se realizó el tamizaje de *M. fructicola* frente a los extractos etanólicos donde se demostró que a los siete días de incubación no hubo actividad inhibitoria por parte de estos sobre el hongo fitopatógeno ( $p > 0.10$ ) como se puede observar en la Figura 8.

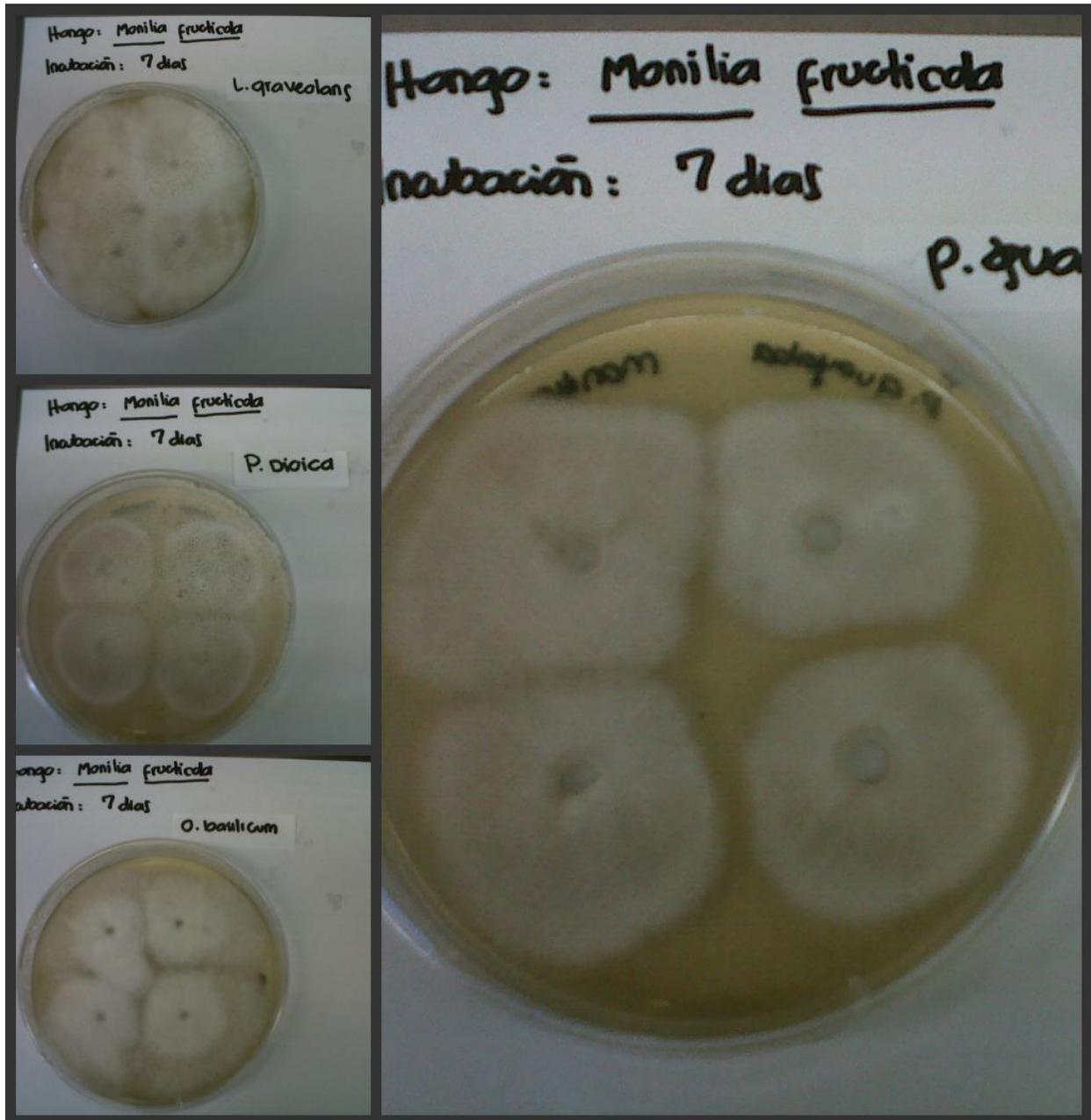


Figura 8. Tamizaje de *M. fructicola* contra cuatro extractos vegetales a 7 días de incubación.

El tamizaje realizado para el Oomycete *P. parasitica* frente a los cinco extractos etanólicos e incubados por 7 días bajo las mismas condiciones, evidenció que ninguno de los extracto presento actividad inhibitoria sobre el hongo fitopatogéno ( $p > 0.10$ ) como se muestra en la Figura 9.



Figura 9. Tamizaje de *P. parasitica*. Tamizaje en los cinco extractos etanólicos a los 7 días de incubación.

Se realizó el tamizaje antifúngico del hongo asexual *S. sclerotiorum* frente a los cinco extractos, el tiempo de incubación fue de 7 días detectados en la fase de validación del método. En el bioensayo se utilizó un control negativo y tres controles positivos, neem, vinagre de humo de encino y benomil para comprobar la reproducibilidad del método.

El bioensayo de *S. sclerotiorum* muestra la ausencia de actividad fungicida por parte de cada uno los extractos etanólicos utilizados como se muestra en la Tabla 3 y Figura 10.



Figura 10. Evaluación de la actividad antifúngica de los cinco extractos antes *S. sclerotiorum* a los 7 días de incubación.

Tabla 3

Tamizaje antifúngico de los cinco extractos contra el hongo fitopatógeno *S. sclerotiorum* a los siete días de incubación

Especie	Diámetro (mm)	Inhibición (%)	Actividad	Valor p*
Control negativo	49	100	-	0.06
Control vinagre (10 µg/mL)	31	36.7	-	1
Control neem (10 µg/mL)	43	12.2	-	1
Control benomil (2.5 µg/mL)	30	38.7	-	1
<i>C. ambrosioides</i>	38	22.4	-	0.06
<i>L. graveolens</i>	40	18.3	-	0.06
<i>O. micranthum</i>	37	24.5	-	0.06
<i>P. dioica</i>	41	16.3	-	0.06
<i>P. guajava</i>	39	20.4	-	0.06

Fuente: Datos experimentales

(-) Actividad negativa a una concentración de 1 mg/mL. (\*) Valor de la probabilidad con la prueba de hipótesis binomial ( $\alpha = 0.10$ ), de acuerdo con el diámetro de la colonia del hongo, respecto al control.

## IX. DISCUSION DE RESULTADOS

Se realizó una encuesta con ingenieros agrónomos especialistas que promueven la agricultura orgánica, la cual permitió seleccionar cultivos de importancia comercial susceptibles a infecciones por hongos fitopatógenos. Los cultivos susceptibles de infección propuestos por los informantes en este estudio fueron: *L. sativa*, *L. esculentum*, *P. vulgaris*, *P. sativum* y *P. persica* ya que la comercialización de los productos de dichos cultivos representa un gran aporte a la economía guatemalteca, en la que la agricultura ocupa el tercer lugar del PIB (Banco de Guatemala [BANGUAT], 2010). En el caso particular de dichos cultivos, durante la cosecha las enfermedades causadas por hongos y bacterias representan pérdidas que ascienden a los Q.280,350,000. Para *L. sativa* se reportó una pérdida de Q.13,500,000, *L. esculentum* de Q.182,400,000, *P. vulgaris* de Q.53,700,000, *P. sativum* de Q.16,500,000 y *P. persica* de Q.14,250,000 reportadas en el año 2010 (INE, 2010). Además, el daño que ocasionan no sólo se refiere a las pérdidas de producción económica, sino también a las pérdidas en la producción biológica, es decir a la alteración que existe en el crecimiento y desarrollo de las plantas hospederas atacadas por estos microorganismos (Agrios, 1988).

Con la información de los especialistas se seleccionaron las especies botánicas guatemaltecas en base al uso popular que estas poseen para el manejo de cultivos infectados con hongos fitopatógenos. Dichas especies botánicas, que provenían de varias regiones del país fueron: *C. ambrosoides*, *L. graveolens*, *P. dioica*, *P. guajava* y *O. micranthum*. A pesar del uso popular en la agricultura ecológica no existen estudios científicos que avalen su utilización.

De la misma forma, se escogieron productos que sufren de infección por hongos fitopatógenos, los cuales fueron colectados en sus lugares de crecimiento silvestre, en la región de Patzicia, Chimaltenango. Se seleccionaron

cinco hongos fitopatógenos en base a su efecto en los cultivos comerciales, *A. pisi* que provoca antracnosis en la arveja, *C. lindemuthianum* que produce la antracnosis del frijol, *M. fructicola* que infecta al durazno provocando

podrición café, *P. parasitica* que provoca mildiu del tomate y *S. sclerotiorum* que infecta la lechuga produciendo moho blanco. Para su obtención se utilizó la metodología de Agrios (1991) mediante el aislamiento del hongo del material vegetal infectado.

Tras la selección de los cinco especímenes botánicos de uso popular para el manejo de cultivos se prepararon extractos etanólicos de cada uno, determinándose el porcentaje de rendimiento de estos. Por medio de una técnica estándar de percolación y concentración por rotavapor se obtuvo el rendimiento de las diferentes especies vegetales siendo *C. ambrosoides* la especie que presentó el mayor rendimiento (Tabla 1).

El ensayo antifúngico se llevó a cabo utilizando la metodología modificada descrita anteriormente para hongos filamentosos que fue adaptada para poner de manifiesto la inhibición de hongos septados y un hongo Oomicete. Se realizó una curva de crecimiento para evaluar el comportamiento de los hongos utilizados en este estudio (Gráfica 1 y 2), en base a la metodología se esperaba el crecimiento de los mismos a los 21 días de incubación, pero según la naturaleza de los hongos utilizados, al séptimo día de incubación estos alcanzaron un crecimiento máximo.

Se utilizaron dos antifúngicos sintéticos como controles positivos para el estudio, benomil para *A. pisi*, *C. lindemuthianum* y *M. fructicola* en donde se pudo observar que este último se vio inhibido a 10 µg/mL, mientras que *A. pisi* fue inhibida a los 15 µg/mL. Por su parte, *C. lindemuthianum* se vio inhibido a una concentración de 20 µg/mL (Gráfica 3). En cuanto al metconazol contra *P. parasitica*, no se observó crecimiento, ya que esta fue inhibida por completo. Los resultados de los dos controles sintéticos obtenidos indican que todos los hongos fitopatógenos en su fase miceliar fueron significativamente susceptibles.

Un quinto hongo, en su fase asexual, *S. sclerotiorum* que infecta la lechuga produciendo moho blanco mostro susceptibilidad para el antifungico sintético benomil, siendo inhibido a una concentración de 20 µg/mL ( $p = 0.06$ ). El

metconazol inhibió el crecimiento de *P. parasitica* a una concentración 0.00045 µg/mL comprobándose de esta manera la alta efectividad que este fungicida posee.

Así mismo, se utilizaron dos antifúngicos de origen orgánico como controles positivos que poseen actividad contra diversos hongos microscópicos, extracto de neem y vinagre de humo de encino. En cuanto al extracto de neem, se observó inhibición del crecimiento de *M. fructicola* a una concentración de 100 mg/mL. *C. lindemuthianum*, *P. parasitica* y *S. sclerotiorum* presentaron inhibición a los 400 mg/mL. Para el vinagre de humo de encino los hongos fitopatógenos *A. pisi*, *M. fructicola* y *S. sclerotiorum* se observó inhibición a los 100 mg/mL mientras que para *P. parasitica* y *C. lindemuthianum* se observó inhibición a los 200 mg/mL. Los resultados de ambos antifúngicos orgánicos mostraron inhibición contra los hongos fitopatógenos ( $p = 0.06$ ), (Gráfica 4 y 5).

Estudios *in vitro* han demostrado que las hojas de neem inhiben la formación de biofilms. Se han reportado efectos inhibitorios en muestras de saliva de personas que utilizan neem contra *Streptococcus mutans* y especies de *Lactobacillus*. Además se ha registrado que el extracto de corteza de neem, tiene actividad contra varias especies de *Candida* (Ansorg, Fabry, & Okemo, 1996). Respecto al vinagre de humo de encino se ha reportado que la infusión de hojas y corteza de encino se utiliza comúnmente en el tratamiento de afecciones gastrointestinales, hemorragias, anemia y para la desinfección de heridas, fistulas y úlceras ya que disminuye el crecimiento bacteriano (Ribeiro, Fiuza de Melo, De Barros, & Gómez, 2000).

De acuerdo a los resultados obtenidos, el antifúngico orgánico que presentó mayor actividad contra los hongos *A. pisi*, *C. lindemuthianum*, *M. fructicola*, *P. parasitica* y *S. sclerotiorum* fue el vinagre de humo de encino (Gráfica 4). Esto podría deberse al alto contenido de compuestos fenólicos conocidos como taninos (Ribeiro, Fiuza de Melo, De Barros, & Gómez, 2000).

Se evaluó la actividad contra los hongos *A. pisi*, *C. lindemuthianum*, *M. fructicola*, *P. parasitica* en su fase micelial y *S. sclerotiorum* en su fase asexual, utilizando extractos obtenidos por concentración. En cuanto al extracto etanólico de *P. guajava* se observó actividad inhibitoria contra la fase micelial del hongo *C. lindemuthianum* a una concentración de 1 mg/mL leída a los siete días de incubación, se considero este extracto fungistático debido al crecimiento del hongo observado a los 14 días con respecto a la lectura del crecimiento de los otros hongos fitopatógenos. (Tabla 2).

Estudios anteriores han demostrado que *P. guajava* posee compuestos biológicamente activos contra la bacteria *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Stauffer, Orrego y Aquino, 2000). Esta es una bacteria fitopatógena que produce infección en diversos tipos de cultivos y plantas ornamentales (Zapata & Gaud, 2001). Así mismo, en otros estudios se ha observado que extractos metanólicos de los frutos maduros de *P. guajava* poseen actividad fungicida contra los hongos filamentosos *Arthrinium sacchari* y *Chaetomium funicola* (Sato et al., 2000)

En cuanto a los extractos de *C. ambrosoides*, *L. graveolens*, *P. dioica*, *P. guajava* y *O. micranthum*, se determinó que estos a una concentración de 1 mg/mL no presentaron actividad fungicida *in vitro* contra las cinco especies de hongos fitopatógenos utilizados en el estudio.

La literatura ha demostrado que diversas especies vegetales poseen actividad fungicida, capaz de complementar productos sintéticos (Tripathi & Dubey, 2004). Sin embargo los resultados generados en este estudio indican que no se encontró dicha actividad por parte de los extractos etanólicos utilizados. Al consultar bibliografía especializada se encontró que la utilización de aceites esenciales de diversas especies vegetales es una alternativa en la agricultura orgánica para el control de pestes, teniendo su mayor impacto en sus propiedades ecotoxicológicas (baja toxicidad humana, degradación rápida e impacto ambiental reducido) lo cual hace que los aceites esenciales podrían ser los adecuados para este tipo de agricultura ya que a menudo estos constituyen la fracción bioactiva de

los extractos de plantas (Cosimi, Rossi, Cioni, & Canale, 2009) aunque su acceso para los campesinos es menor.

En el caso de esta investigación se usaron extractos etanólicos ya que es un producto que puede ser utilizado por el agricultor por su mayor disponibilidad y bajo costo, pero la falta de actividad de los extractos y los hallazgos en la literatura sugieren que los aceites esenciales podrían ser empleados como alternativas contra diversos tipos de pestes y adecuados para la producción orgánica mientras que en países en vías de desarrollo como el nuestro, pueden significar bajos costos de protección en cultivos (Cosimi, Rossi, Cioni, & Canale, 2009).

De acuerdo a los resultados obtenidos sería conveniente seguir trabajando en los mismos extractos etanólicos para evaluar su actividad contra otros hongos fitopatógenos que producen enfermedades de importancia en la agricultura del país.

## X. CONCLUSIONES

1. Ninguno de los extractos etanólicos utilizados en este estudio presentó actividad fungicida ( $p > 0.10$ ).
2. El extracto etanólico de *P. guajava* presentó una actividad fungistática significativa ( $p = 0.06$ ) frente a *C. lindemuthianum* a los siete días de incubación, pero no mantuvo la inhibición a los 14 días.
3. El metconazol inhibió el crecimiento de *P. parasítica* a la más baja concentración ( $0.00045 \mu\text{g/mL}$ ) demostrando su alta potencia.
4. El vinagre de humo de encino tuvo mayor actividad significativa ( $p=0.06$ ) como antifúngico orgánico frente a *A. pisi*, *C. lindemuthianum*, *M. fructicola*, *P. parasítica* y *S. sclerotiorum*, en comparación con el extracto de neem.
5. El crecimiento de los hongos fitopatógenos en los medios de cultivos utilizados alcanzan su máximo crecimiento a los 7 días de incubación.

## XI. RECOMENDACIONES

1. Someter los hongos fitopatógenos de este estudio a los aceites esenciales de las especies vegetales propuestas.
2. Continuar con la investigación de la actividad contra los hongos fitopatógenos utilizando otras especies vegetales.
3. Estudiar la actividad de las plantas utilizadas contra hongos distintos a los propuestos en este estudio.
4. Realizar nuevas investigaciones enfrentando *P. guajava* contra otros hongos fitopatógenos para conocer su espectro de inhibición.
5. Experimentar en cultivos infectados con *C. lindemuthianum* el uso de formulaciones a base de *P. guajava*.

## XII. REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

Agrios, G. (1988). *Plant Pathology* (3er ed). San Diego, CA: Academic Press.

Agrios, G. (1991). *Manual de enfermedades de las plantas*. México: Limusa.

Akhtar, M., & Munir, M. (1989). *Evaluation of the gastric antiulcerogenic effects of Solanum nigrum, Brassica oleracea and Ocimum basilicum in rats, Journal of Ethnopharmacology, 27,163-176.*

Alexopoulos, C.J. (1985). *Introducción a la micología*. Barcelona: Omega.

Anaya, S.A., y Nápoles, J.R. (2007). *Hortalizas: plagas y enfermedades*. México: Trillas.

Ansorg, R., Fabry, W., & Okemo, P. (1996). *Fungistatic and fungicidal activity of East African medicinal plants. Mycoses, 39, 67–70.*

Banco de Guatemala. (2010). *Producto interno bruto medido por el origen de la producción Años: 2001–2010*. Recuperado el 04 de Abril de 2011 de <http://www.banguat.gob.gt/estaeco/boletin/envolver.asp?karchivo=boescu50>

Brancato, F.P., & Golding, N.S. (1983). *The diameter of the mould colony as a reliable measure of growth. Journal of Mycology, 45, 848-863.*

Bernal, H., Cáceres, A., y Martínez, J. (2000). *Fundamentos de agrotecnología de cultivo de plantas medicinales Iberoamericanas*. Santa Fe de Bogotá: Programa Iberoamericano de Ciencia y Tecnología para el Desarrollo.

Burlingame, E.M., & Reddish, G.P. (1973). *Laboratory methods for testing fungicides used in the treatment of epidermophytoses. Journal of Laboratory and Clinical Medicine, 14, 649-653.*

- Cáceres, A., Herrera, D., Jauregui, E., & Logemann, H. (1991). *Plants used in Guatemala for the treatment of dermatomucosal infections. 1: Screening of 38 plants for anticandidal activity. Journal of Ethnopharmacology, 33, 277-283.*
- Casseres, E. (1980). *Producción de hortalizas*. San José, Costa Rica: Instituto Interamericano de Ciencias Agrícolas.
- Cañigüeral, S., Freixa, B., Milo, B., Pérez, F., Portillo, A., Risco, E., y Vila, R., (2002). *Vademécum de fitoterapia*. Barcelona: Masson.
- Chiang, H., Guo, S., & Lee, S. (1986). *Active principles of hypoglycemic effect from Psidium guajava. Part II. Journal of Asian Pharmacology Supply, 6, 58.*
- Christensen, M. (1981). *Species diversity and dominance in fungal communities. In: The fungal community. Its organization and role in the ecosystem. Journal of Mycology. New York, 504-507.*
- Ciencia y Tecnología para el desarrollo -CYTED-. (2002). *Vegetales aromáticos en Latinoamérica, Su aprovechamiento industrial para la producción de aromas y sabores*. (segunda ed.). (A. Bandoli, Ed.) Argentina: CYTED.
- Cook, R.J., & Beaker, K.F. (1983). *The Nature and Practice of Biological Control of Plant Pathogens*. St. Paul, Minn: APS Press.
- Cosimi, S., Rossi, E., Cioni, P.L., & Canale, A. (2009). *Bioactivity and qualitative analysis of some essential oils from Mediterranean plants against stored-product pest: Evaluation of repellency against Stophilus zeamais Motschulsky, Cryptolestes ferrugineus (Stephens) and Tenebrio molitor (L.)*. *Journal of Stored-Products Research, 125-132.*
- Cruz, S. (2001). *Fraccionamiento bioguiado y tamizaje fitoquímico del extracto etanólico con actividad antiartemia de Ocimum micranthum Willd, albahaca*

*de monte*. (Tesis de licenciatura inédita). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Desta, B. (1993). *Ethiopian traditional herbal drugs. Part II: antimicrobial activity of 63 medicinal plants*. *Journal of Ethnopharmacology*, 39, 129-139.

Díaz, A. (1993). *Enfermedades infecciosas de los cultivos*. México: Trillas.

Dinham, B., & Malik, S. (2003). *Pesticides and humanrights*. *International Journal of Occupational and Environmental Health*, 9, 40-52.

Dixit, S., Dubey, N., Kishore, & Singh S. (1981). *Fungitoxicity of some volatile natural products against human pathogenic fungitoxicity*. *Journal of Indian Botanical Society*, 25, 1-3.

Duke, J. (1984). *Handbook of medicinal herbs*. Boca Raton, CA: CRC press

Erwin, D. C., & Ribeiro, O. K. (1996). *Phytophthora Diseases Worldwide*. *The American Phytopathological Society*, 568.

Fernández, H. (1992). *Etnobotánica de los recursos filogenéticos de uso medicinal presentes en 8 municipios del área de influencia étnica Mam, del departamento de Huehuetenango*. (Tesis de licenciatura inédita). Universidad de san Carlos de Guatemala, Guatemala.

García, J. (1997). *Introducción a los plaguicidas* *Revista Panamericana de Salud Pública* 6(2), 476.

Gibson, D. (1970). *Flora of Guatemala*. *Fieldiana Botany*, 24(9), 211.

Gonzáles, U., Hepp, G., Salvadores Y., y Tapia, V. (2007). *Polvos de especies aromáticas para el control del gorgojo del maíz Sitophilus zeamais*

Motschulsky, en trigo almacenado. *Agricultura Técnica de Chile*, 67, 147-154.

Gosselin, R.E., Smith, R., & Hodge, H. (1984). *Clinical toxicology of commercial products*. Baltimore, MD.: Williams y Wilkins.

Gudiel, V. (1987). *Manual de Floricultura*. Guatemala: Litografía Modernas.

Gupta, M.P. (Ed.). (1995). *Doscientas Setenta Plantas Medicinales Iberoamericanas*. Bogotá: Editoriales Presencia.

Hall, G. (1994). *Phytophthora nicotianae*. (I. (. Institute), Ed.) *Descriptions of Pathogenic Fungi and Bacteria Nº 1200*, 126: 61-63.

Harper, J. (1990). *Pests, pathogens and plant communities: An introduction in: pests, pathogens and plant communities*. Blackwell Scientific Publications. Oxford, Inglaterra.

Hernández, C. (1998). *Evaluación de cuatro colores de trampas para la captura de mosca minadora (*Liriomyza huidobrensis* Blanchard) en arveja china (*Pisum sativum* L.), aldea Xeabaj, Santa Apolonia, Chimaltenango*. (Tesis de Licenciatura inédita). Universidad de San Carlos de Guatemala. Guatemala.

Herrmann, K. (2001). *Inhaltsstoffe von Obst und Gemüse*. Stuttgart (Hohenheim), Deutschland:Verlag Eugen Ulmer.

Hiokim, Kiuchi, F., Kondok, Nakamura, N., Miyashitan, & Tsuda, Y. (1989). *Scrinig of crude drugs used un Sri Lanka for nematocidal activity on the larva of *Toxocara canis**. *Shoyakugaku Zasshi*, 43(4), 228-293.

Hussain, R. (1990). *Sweetening agents of plant origen: Phenylpropanoid constituents of seven sweeten-tasting plants*, *Society for Economic Botany*, 44, 174-182.

Instituto Nacional de Estadística. (2007). *Encuesta nacional agropecuaria 2007*.

Recuperado el el 03 de Marzo de 2011 de:

<http://www.ine.gob.gt/descargas/ENA2006/resultados/index.htm>

Investigación Científica y Uso Popular de Plantas Medicinales en el Caribe. (1998). TRAMIL *Farmacopea Vegetal Caribeña*. Francia: Edna- Caribe.

Investigación Científica y Uso Popular de Plantas Medicinales en el Caribe. (1990). TRAMIL *Pruebas in vivo para paludismo realizadas en Bolivia sobre varias plantas*. Bolivia, 112-117.

Koul, O., Isman, M., & Kethar, C. (1990). *Properties and uses of neem (Azadirachta indica)*. *Canadian Journal of Botany*, 68,1-11.

Kuklinsky, C. (2000). *Farmacognosia: Estudio de las drogas y sustancias medicamentosas de origen natural*. Barcelona: Omega.

Lacourt, I., Panabieres, A., & Marais, P. (1994). *Intraespecific polymorphism of Phytophthora parasitica revealed by analysis of mitochondrial DNA restriction fragment length polymorphism*. *Journal of Mycology*, 98, 562-568.

Larone, D. (2002). *Medically important fungi. A guide to identification*. Washington, DC: ASM Press.

Linares, M., Maurillo, P., & Viña, P. (2002). *Composición Química, Actividad Insecticida Y Fungicida de Ocimum micranthum Willd*. *Revista Colombiana de Entomología*, 28, 109-113.

MacRae, W.D., Hudson J.B., & Towers, G.H.N. (1988) *Studies on the pharmacological activity of Amazonian Euphorbiaceae*. *Journal Ethnopharmacology*. 22:143-172.

- Mair, A., Pandiyan, M., & Venkasubramaniam, H. (1987). *Polyphenolic compounds from flowers of Psidium guajava*. *Fitoterapia*, 58, 204-205.
- Medinilla, B. (1996). *Manual de laboratorio de fitoquímica*, Guatemala: Universidad de San Carlos de Guatemala.
- Milsra, K. & Senshadrit, T. (1968). *Chemical components of the fruits of Psidium guajava*. *Journal of Phytochemistry*, 7, 641-645.
- Ministerio de Agricultura, Ganadería y Alimentación. (1983). *Cultivo del Durazno*. Guatemala: González R.
- Ministerio de Economía [ME], Asociación guatemalteca de exportadores [AGEXPORT] y Cámara de la industria de Guatemala [CIG]. (2007). *Guía básica por producto para aprovechar el tratado de libre comercio con México*. Guatemala: Agro Frescos.
- Morataya, M. (2006). *Caracterización farmacopéica de cuatro plantas aromáticas nativas de Guatemala Albahaca de monte (Ocimum micranthum), Orégano (Lippia graveolens), Salvia sija (Lippia alba) y Salviyá (Lippia chiapasensis)* (tesis de licenciatura inédita). Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Peralta, I.E., & Spooner, D.M. (2000). *Classification of wild tomatoes: Kurtziana*, 2, 45-54.
- Potter, D. A., Buxton, M. C., Redmond, C. T., Patterson, C. T. & Powell, A. J. (1990). *Toxicity of pesticides to earthworms (Oligochaeta: Lumbricidae) and effects on thatch degradation in Kentucky bluegrass*. *Journal of Economic Entomology*, 83, 2362-2369.
- Ribeiro, R., Fiuza de Melo, N.M., De Barros, F., & Gómez, C. (2000). *Acute antihypertensive effect in conscious rats produced by some medicinal*

- plants used in the state of Sao Paulo. Journal of Ethnopharmacology*, 15, 261-269.
- Rodríguez, Ma. (1980). *Biodiversidad de los hongos fitopatógenos del suelo de México. Zoológica mexicana*, 1, 53-78.
- Sato, J., Goto, K., Nanjo, F., Hawai, S., & Murata, K., (2000). *Antifungal activity of plant extracts against Arthrinium sacchari and Chaetomium funicola. Journal of Biochemical Engineering and Sciences*, 90, 442-446
- Sharapin, N. (2000). *Fundamento de tecnología de productos fitoterapéuticos*. Santafé de Bogotá: CYTED-CAB.
- Singleton, L., Mihail, J., & Rush. (1993). *Methods for research on soliborne phytopathogenic Fungi*. (2da. ed.). Washington, DC.: APS Press.
- Standley, J., & Williams L. (1961). *Flora of Guatemala. Fieldiana Botany*, 24 (7), 289.
- Stauffer, A., Orrego, F., y Aquino, A. (2000). *Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. Revista de Ciencia y Tecnología*, 1, 29-33.
- Tejeda, M.S. (2001). *Estudio etnobotánico de las plantas medicinales de 6 comunidades del municipio de San Juan Chamelco del departamento de Alta Verapaz*. Universidad de San Carlos de Guatemala, Guatemala.
- Toriello, M.C., y Ulloa, M. (2002). *Hongos microscópicos saprobios y parásitos. Métodos de Laboratorio*. México: UNAM.
- Tripathi, P., & Dubey, N.K., (2004). *Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Postharvest Biology and Technology*, 32, 235-245.

- Valor, O., y Manzano, J. (2000). *Efecto del tratamiento hidrotérmico, temperatura y tiempo de almacenamiento sobre el mango criollo "Bocado" (Mangifera indica L.)*. *Tecnologías Postcosecha*, 3, 11-15.
- Vanbrenseghem, R., & Takashio, M. (1922). *Production of macroconidia by microsporium ferrugineum*. 7, 252-256.
- Walker, J.C. (1973). *Enfermedades provocadas por hongos imperfectos*. Madrid: Omega.
- Ware, G.W. (1989). *The Pesticida Book*. (3er. Ed). Fresno C.A: Thomson Publications.
- Wolf, I. (1932). *Fatal poisoning with oil of Chenopodium in a negro child with sickle-cell anemia*. *Journal of Pediatrics*, 52, 126-130.
- Zapata, M., & Gaud, R. (2001). *Estrategias para diferenciar Xanthomonas campestris pv. Phaseoli con sales inorgánicas*. *Agronomía mesoamericana*, 12(1): 01-07.

### XIII. ANEXOS

Anexo I. Obtención de los extractos etanólicos de especies vegetales.



Extractos de especies vegetales sugeridas por especialistas en el área, que fueron tamizados para determinar su actividad antifúngica contra los hongos fitopatógenos implicados en este estudio; estas especies se obtuvieron de colectas procedentes de Izabal y Suchitepéquez.