



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE *Mycosphaerella fijiensis* MORELET

TRABAJO DE GRADO

Requisito parcial para optar al título de Tecnólogo en Química

Presentado por:

LINA MARCELA ECHEVERRY CLAVIJO

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP
Pereira, 4 de Agosto de 2008**



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE *Mycosphaerella fijiensis* MORELET

TRABAJO DE GRADO

Requisito parcial para optar al título de Tecnólogo en Química

Presentado por:

LINA MARCELA ECHEVERRY CLAVIJO

Director: JAIME NINO OSORIO

**UNIVERSIDAD TECNOLÓGICA DE PEREIRA
FACULTAD DE TECNOLOGÍA
ESCUELA DE TECNOLOGÍA QUÍMICA
GRUPO DE BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP
Pereira, 4 de Agosto de 2008**



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD FUNGICIDA DE EXTRACTOS VEGETALES SOBRE *Mycosphaerella fijiensis* MORELET

NOTA DE ACEPTACIÓN DEL TRABAJO DE GRADO

Presentado por:

LINA MARCELA ECHEVERRY CLAVIJO

**Los suscritos director y jurado del presente trabajo de grado, una vez
revisada la versión escrita y presenciado la sustentación oral, decidimos
otorgar la nota de:** _____

Con la connotación: _____

Para constancia firmamos en la ciudad de Pereira hoy

_____.

El director: _____

Nombre: Jaime Niño Osorio

Jurado: _____

Nombre: Luz Estela Ramírez



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

AGRADECIMIENTOS

Muchas personas han contribuido, de una u otra forma, a la elaboración de este trabajo. A todas ellas quiero expresar mi más sincero agradecimiento. De forma especial, quiero agradecer, a mis padres Hernando y Consuelo, por el apoyo, comprensión y esfuerzo durante toda mi vida y mi carrera. También quiero agradecer de forma muy especial a mi director Jaime Niño Osorio por las enseñanzas y por guiarme hacia el éxito de este trabajo. Al profesor Oscar Marino Mosquera por las asesorías y al grupo de Biotecnología y Productos naturales por el apoyo y colaboración durante la ejecución de este trabajo.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

TABLA DE CONTENIDO

	RESUMEN	
	ABSTRACT	
	INTRODUCCIÓN.....	17
1.	ANTECEDENTES.....	18
1.1	Surgimiento del problema.....	19
1.2	Objetivos.....	21
1.2.1	Objetivo general.....	21
1.2.2	Objetivo específico.....	21
1.3	Justificación.....	22
2.	Marco teórico.....	24
2.1	Descripción de familias.....	24
2.2	Cultivo de Plátano.....	30
2.3	<i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet causante de la Sigatoka negra en las musáceas.....	31
2.3.1	Historiar.....	31
2.3.2	Identificación y Clasificación.....	32
2.4	Reproducción, epidemiología e interacción con el huésped.....	33
2.4.1	Reproducción sexual.....	33
2.4.2	Reproducción asexual.....	35
2.5	Síntomas de la Sigatoka Negra.....	37
3.	SECCIÓN EXPERIMENTAL.....	41
3.1	Localización.....	41
3.2	Recolección y caracterización de las especies de las plantas recolectadas.....	41
3.3	Obtención de extractos.....	42
3.4	Marcha Fitoquímica.....	43
3.5	Reactivos.....	44
3.6	Equipos.....	44
3.7	Actividad antifúngica de los extractos.....	45
3.7.1	Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos por medio de la medición de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas.....	45
3.7.1.1	Recolección del material vegetal infectado.....	45
3.7.1.2	Procedimiento para la realización de la Cámara Húmeda.....	46
3.7.1.3	Descarga de ascosporas.....	47
3.7.2	Procedimiento para la evaluación de extractos por medio del crecimiento radial del micelio del hongo <i>M. fijiensis</i> Morelet.....	49
3.7.2.1	Cultivo monospórico.....	49
3.7.2.2	Crecimiento radial.....	50
3.8	Toma de datos y análisis estadístico.....	52



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

3.8.1	Análisis estadístico de la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos por medio de la medición de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas.....	52
3.8.2	Análisis estadístico de la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos por medio del crecimiento radial del micelio del hongo <i>M. fijiensis</i> Morelet.....	52
4.	ANÁLISIS DE RESULTADOS.....	53
4.1	Análisis de resultados de la medición de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas.....	53
4.2	Análisis de resultados de la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos por medio del crecimiento radial del micelio del hongo <i>M. Fijiensis</i> Morelet.....	66
5.	DISCUSION.....	71
6.	CONCLUSIONES.....	72
	BIBLIOGRAFÍA.....	73
	ANEXOS.....	79



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1	Familias de plantas recolectadas.....	24
Tabla 2	Clasificación del hongo <i>M. fijiensis</i> Morelet.....	33
Tabla 3	Patrones y reveladores utilizados en CCD para la detección de los núcleos fitoquímicos en estudio.....	43
Tabla 4	Resultados de la primera repetición de conglomerado de extractos metanólicos a 1000mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas.....	55
Tabla 5	Resultados de la segunda repetición de conglomerado de extractos metanólicos a 1000mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascospora.....	57
Tabla 6	Resultados de la primera repetición de conglomerado de extractos metanólicos a 500mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas.....	61
Tabla 7	Resultados de la segunda repetición de conglomerado de extractos metanólicos a 500mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas.....	63
Tabla 8	Resultados de Kruskal Wallis para la primera repetición de extractos UTP metanólicos a 1000mg/L para la medición del crecimiento radial del micelio de <i>M. fijiensis</i>	66
Tabla 9	Resultados de Kruskal Wallis para la segunda repetición de extractos UTP metanólicos a 1000mg/L para la medición del crecimiento radial del micelio de <i>M. fijiensis</i>	67
Tabla 10	Resultados de Kruskal Wallis para la primera repetición de extractos UTP metanólicos a 1000mg/L para la medición de crecimiento radial del micelio de <i>M. fijiensis</i>	67
Tabla 11	Resultados de Kruskal Wallis para la segunda repetición de extractos UTP metanólicos a 1000mg/L para la medición de crecimiento radial del micelio de <i>M. fijiensis</i>	68
Tabla 12	Resultados de Kruskal Wallis para la primera repetición de extractos UTP metanólicos a 1000mg/L.....	68
Tabla 13	Resultados de Kruskal Wallis para la segunda repetición de extractos UTP metanólicos a 1000mg/L	69
Tabla 14	Plantas activas contra <i>M. fijiensis</i>	71



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1	Registro de la enfermedad de la Sigatoka Negra en el mundo.....	32
Figura 2	A). Espermogonio. B). Espermacios.....	34
Figura 3	Reproducción sexual del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet.....	35
Figura 4	Reproducción asexual del hongo <i>Mycosphaerella fijiensis</i> Morelet.....	36
Figura 5	Ciclo de infección del hongo <i>M. fijiensis</i> Morelet.....	37
Figura 6	Primer síntoma de la enfermedad con aparición de manchas.....	37
Figura 7	Alargamiento de pecas y formación de conidios.....	38
Figura 8	Cambio de color de las rayas de pardo rojizo a pardo oscuro. Aumenta el deterioro en la hoja.....	39
Figura 9	Ensanchamiento de las rayas.....	39
Figura 10	Oscurecimiento de las mismas.....	40
Figura 11	Deterioro total de la hoja y colapso de la misma.....	40
Figura 12	Puntos de recolección del material vegetal en el PRNU....	42
Figura 13	Recolección del material infectado.....	46
Figura 14	Preparación cámara húmeda.....	46
Figura 15	Discos de papel con material vegetal infectado.....	47
Figura 16	Procedimiento de evaluación de la actividad antifúngica de los extractos vegetales sobre el hongo <i>M. fijiensis</i> Morelet, por medio de la medición del tubo germinativo de las ascosporas.....	48
Figura 17	Procedimiento de cultivo monospórico.....	50
Figura 18	Procedimiento de evaluación de la actividad antifúngica de los extractos vegetales sobre el hongo <i>M. fijiensis</i> Morelet, por medio del crecimiento radial del micelio.....	51
Figura 19	Porcentaje (%) de inhibición de las familias de extractos metanólicos a 1000mg/L para la elongación del tubo germinativo de ascosporas (GN: germinación normal; GC: germinación corta; GD: germinación deforme; NG: no germinado).....	53
Figura 20	Conglomerado primera repetición de extractos metanólicos a 1000mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas.....	54
Figura 21	Conglomerado segunda repetición de extractos metanólicos a 1000mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas.....	56
Figura 22	Porcentaje (%) de inhibición de extractos metanólicos a	



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

	500mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas. (GN: germinación normal; GC: germinación corta; GD: germinación deforme: NG: no germinado).....	59
Figura 23	Conglomerado primera repetición de extractos metanólicos a 500mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascospora.....	60
Figura 24	Conglomerado segunda repetición de extractos metanólicos a 500mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas.....	62



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

ÍNDICE DE ANEXOS

Anexo 1	Familias de plantas recolectadas en la zona Otún-Quimbaya y en el Parque Regional Ucumari (PRNU).....	79
Anexo 2	Metodología para la obtención de los extractos vegetales para realizar los bioensayos.....	81
Anexo 3	Resultados de la Marcha fitoquímica para los extractos UTP metanólicos.....	83
Anexo 4	Conteo de ascosporas de extractos UTP metanólicos a 1000 mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas.....	87
Anexo 5	Promedios de los conteos para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas con extractos UTP a 1000 mg/L.....	89
Anexo 6	Promedios de los conteos para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas con extractos UTP a 500 mg/L.....	91
Anexo 7	Diámetros del crecimiento radial del micelio de <i>M. fijiensis</i> para extractos metanólicos del UTP 141 al UTP 163 con concentración de 1000 mg/L.....	92
Anexo 8	Diámetros del crecimiento radial del micelio de <i>M. fijiensis</i> para extractos metanólicos del UTP 164 al UTP 175 con concentración de 1000 mg/L.....	93
Anexo 9	Diámetros del crecimiento radial del micelio de <i>M. fijiensis</i> para extractos metanólicos del UTP 176 al UTP 187 con concentración de 1000 mg/L.....	94



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

RESUMEN

Los cultivos de plátano y banano son afectados por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet causante de la enfermedad más destructiva para estos cultivos conocida como Sigatoka Negra (SN) generando pérdidas económicas tanto para los grandes como los pequeños cultivadores.

Para el control de esta enfermedad se emplean diversos tipos de fungicidas que aumentan los costos de producción, además causan deterioros significativos al medio ambiente. En este trabajo se evaluaron 47 extractos metanólicos de 47 plantas recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumarí (Risaralda, Colombia) para determinar su actividad fungicida a través del método de elongación del tubo germinativo de las ascosporas y de la medición del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*. La información obtenida con la ejecución de éste trabajo será de gran importancia para los cultivadores de plátano y banano; además, permitirá evaluar las potencialidades de la flora regional sobre ésta enfermedad de origen fúngico.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

ABSTRACT

The plantain and banana crops are affected by the fungus *Mycosphaerella fijiensis* Morelet the causal agent of one of the most destructive disease for these crops known as Black Sigatoka, creating great economic losses for both large and small growers.

To control this disease it is employed several types of fungicides that increase the production costs; in addition, they cause significant damage to the environment. In this work 47 methanolic extracts from 47 plants collected at the Natural Regional Park Ucumari (Risaralda, Colombia) were evaluated to determine their anti-fungic activity through methods of measuring the germ tube elongation length of ascospore and the measurement of radial growth of the *M. fijiensis* mycelium. The information obtained with the implementation of this work will be very important for the plantain and banana growers, as well as to evaluate the potentialities of the regional flora against this disease of fungi origin.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

INTRODUCCIÓN

La Sigatoka negra (SN) es causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, es una de las enfermedades más destructivas que afecta los cultivos de banano y plátano a escala mundial (Fullerton, 1994; Fullerton y Stover, 1990; Stover, 1980).

La SN, se ha constituido como la enfermedad de mayor impacto económico para la industria de plátano de exportación en el mundo. En Colombia los costos del control químico de la enfermedad varían entre US\$ 700 – 900 hectárea/año; cifra que representa el 46% del valor global de los agroquímicos y cerca del 14 % de los costos totales de producción de la fruta (Chica et al., 2004). La enfermedad produce una destrucción rápida del área foliar, reduciendo el área fotosintética y produciendo un efecto perjudicial sobre la calidad de la fruta, la cual puede presentar una reducción de hasta un 60% en el peso del racimo, cuando no se implementan medidas de control (Chica et al. 2004). Adicionalmente, se presenta maduración prematura de los racimos, lo cual es la causa principal de pérdidas ocasionadas por la enfermedad (Marín et al., 1992).



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

1. ANTECEDENTES

La SN fue identificada inicialmente en el valle de Sigatoka en la isla de Fiji en el año 1963. En América hizo su aparición en 1972, en Honduras. En 1979, había invadido el 60% de la superficie cultivada en Centro América, apareciendo en Panamá en 1980 y a finales de Octubre de 1981, fue localizada en Colombia en el Municipio de Apartadó (Bustamante, 1982). La SN ataca el área foliar de la planta y se caracteriza por la presencia de manchas necróticas de color negro. Existe la Sigatoka amarilla, pero la negra se propaga con mayor rapidez y virulencia. Las esporas del hongo germinan sobre la superficie inferior de la hoja en dos o tres horas, toma entre 48 y 72 horas para penetrar en los estomas. La enfermedad se propaga por el transporte de banano y plátanos; por la movilización de colinos infectados para la siembra y por la dispersión natural de las esporas del hongo (Bustamante, 1982).



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

1.1 SURGIMIENTO DEL PROBLEMA

El plátano es un alimento básico de la canasta familiar de los colombianos y su exportación constituye un factor importante en la generación de divisas para la economía nacional. En Colombia se cultivan 350.000 ha de plátanos distribuidas por todo el país y el volumen de producción supera los 2.5 millones de toneladas de racimos anuales, destinadas en un 86% al mercado interno y el resto a la exportación (Ministerio de Agricultura, 2002).

Los cultivos de plátano son muy adaptables en cuanto a las condiciones ambientales, pero estos se encuentran amenazados por la presencia de múltiples enfermedades foliares, entre ellas la SN. Esta enfermedad es la más devastadora de los cultivos del plátano en el mundo, ataca las hojas de la planta y disminuye su capacidad para la absorción de luz solar, al reducir significativamente su capacidad fotosintética y acelerar la maduración de los frutos (Ministerio de Agricultura, 2002).

Adicionalmente, la SN es la enfermedad de mayor impacto económico en los cultivos de plátano y banano, debido a la alta demanda de uso de fungicidas de síntesis necesarios para obtener una fruta que cumpla con los estándares de calidad para exportación, los cuales se ven afectados por la enfermedad principalmente en la duración de la vida verde de la fruta cosechada. Dichos fungicidas deben ser aplicados en intervalos de 7-12 días, lo cual genera la aplicación de 35-50 ciclos de fungicidas/año en los países bananeros, con altos costos de producción en sus cultivos (Chica et al., 2004).

Adicionalmente estos fungicidas sintéticos tienen un alto costo, afectan la economía de los pequeños productores; causan contaminación a los ecosistemas



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

y son tóxicos para los trabajadores y las poblaciones vecinas implicadas (Stover, 1987).

Con el objetivo de proteger los cultivos de plátano en la región del eje cafetero, se propone evaluar la actividad fungicida de 47 plantas nativas recolectadas en Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU), con potencial para ser utilizados en el manejo de la SN, de una forma efectiva, económica y como una alternativa más amigable con el medio ambiente.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 OBJETIVO GENERAL

- Evaluar la actividad fungicida de 47 extractos de plantas nativas recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU), para el control efectivo y económico, de la Sigatoka negra en los cultivos de plátano.

1.2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Recolectar plantas en el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU).
- Obtener los extractos de *n*-hexano (C_6H_{14}), metanol (CH_3OH) y diclorometano (CH_2Cl_2), de las plantas recolectadas.
- Determinar la actividad antifúngica *in vitro* a 1000 mg/L con los extractos metanólicos obtenidos de las 47 plantas recolectadas, a través de los métodos de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas y de la medición del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

1.3 JUSTIFICACIÓN

El cultivo de plátano y banano, ha sido un sector tradicional de la economía campesina, de subsistencia para los pequeños productores, de alta dispersión geográfica y de gran importancia socioeconómica desde el punto de vista de la seguridad alimentaria y de generación de empleo en Colombia (Covaleda, 2006).

Con relación al mercado internacional, se observa un descenso en los últimos años de los volúmenes comercializados de plátano colombiano hacia Estados Unidos y la Unión Europea. La baja productividad nacional y el deterioro de la calidad, se debe principalmente a deficiencias en aspectos administrativos y fitosanitarios, siendo este último factor, el mayor responsable de las pérdidas, causadas por el hongo *M. fijiensis*. Este hongo está ampliamente difundido en Colombia y es el más difícil de controlar puesto que sus esporas pueden viajar kilómetros en el aire y dada su agresividad, se desarrollan más rápido que las otras variedades de Sigatoka (Covaleda, 2006; Stover, 1971, 1976, 1987).

La SN causa desordenes significativos en el crecimiento vegetativo de la planta, ataca y disminuye el área viva de las hojas y como consecuencia afecta directamente los frutos, que no alcanzan su peso óptimo, ni logran madurar correctamente (Douglas y Ronald, 1992). Esta enfermedad altamente destructiva en los cultivos de plátanos, puede ocasionar pérdidas entre un 50 a un 100% en el rendimiento, afectando de manera notoria la economía del productor (Burt et al., 1997; Orozco, 1998).

Por otro lado, para el control de esta enfermedad se usan fungicidas sintéticos que traen consigo problemas colaterales como es el caso de la contaminación ambiental, daños a la salud humana y resistencia del hongo causal (Orozco, 1998).



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Una alternativa de control biológico es el uso de extractos vegetales, que en algunas investigaciones revelan un efecto positivo sobre el control de hongos fitopatógenos, debido a que éstos contienen metabolitos secundarios capaces de causar inhibición sobre dichos hongos (Ribeiro et al., 1999; Amorim et al., 2004; McMahon et al., 2004).

Por lo anterior, como solución a esta problemática, se busca analizar la actividad antifúngica de 47 extractos vegetales de plantas nativas recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumarí, con el fin de implementar el uso de bioproductos y disminuir el uso de fungicidas sintéticos.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

2. MARCO TEÓRICO

2.1 Descripción de las familias

Para el desarrollo de este trabajo, se recolectaron 47 plantas nativas, pertenecientes a las familias Apiaceae, Asclepiadaceae, Clusiaceae, Lamiaceae, Lauraceae, Malvaceae, Melastomataceae, Moraceae, Passifloraceae, Piperaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae, Urticaceae, recolectadas en el Parque Regional Natural Ucumarí (PRNU) (Risaralda/Colombia).

Tabla 1. Familias de plantas recolectadas.

FAMILIA	CARACTERÍSTICAS	CONSTITUCIÓN
<p>Apiaceae</p>  <p><i>Arracacia elata</i></p>	<p>Existen entre 2500 y 3000 especies de esta familia, que se encuentra en todo el mundo, pero principalmente en las zonas templadas. Algunas verduras y hierbas conocidas se encuentran en esta familia como zanahoria, rábano y apio; y algunas se cultivan como plantas ornamentales de jardín (Font quer, 1993).</p>	<p>La familia Apiaceae está constituida por plantas herbáceas, sólo algunas presentan porte arbustivo. El tallo, articulado en nudos y entrenudos, con hojas alternas y en su mayoría divididas. Una de las características más sobresaliente de la familia es la inflorescencia en forma de umbela, simple o compuesta. Las flores pueden ser unisexuales o estériles (Font quer, 1993).</p>
<p>Asclepiadaceae</p> 	<p>La familia Asclepiadaceae constituye un gran grupo que comprende unas 1700 especies ubicadas principalmente en áreas tropicales y subtropicales, especialmente en</p>	<p>Esta familia esta compuesta por plantas herbáceas o arbustos con hojas sencillas, enteras y opuestas sin estípulas. Las flores son bisexuales, actinomorfas y se disponen en racimos (García, 1992).</p>



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

<p><i>Barnadesia parviflora</i></p>	<p>Sudamérica (Font quer, 1993).</p>	
<p style="text-align: center;">Clusiaceae</p>  <p style="text-align: center;"><i>Clusia sp</i></p>	<p>Las Clusiaceae son una familia de plantas que comprende 1200 especies (Font quer, 1993).</p>	<p>Las plantas leñosas, raramente herbáceas, con hojas opuestas, generalmente sin estipulas. Las flores son actinomorfas y pueden ser bisexuales o unisexuales (García, 1992).</p>
<p style="text-align: center;">Lamiaceae</p>  <p style="text-align: center;"><i>Salvia</i></p>	<p>Las Lamiaceae son una familia de Angiospermas. Consta de 55 géneros con unas 3500 especies, que se distribuyen en el trópico del Viejo y Nuevo Mundo y algunas de sus zonas templadas (Stearn, 1980).</p>	<p>Comprenden plantas herbáceas, anuales y perennes. El aparato vegetativo está caracterizado por el tallo de forma cuadrangular, debido a la presencia de engrosamientos de colénquima en los ángulos; las hojas son opuestas y sin estipulas; presentan glándulas con aceites volátiles de aromas característicos. Las flores son unisexuales (Stearn, 1980).</p>
<p style="text-align: center;">Lauraceae</p>	<p>La familia Lauraceae reúne cerca de 1000 especies, prevaleciendo la distribución tropical (Font quer, 1993).</p>	<p>Las Lauraceae están representadas por árboles perennes aromáticos. Las hojas, enteras y coriáceas, generalmente alternas (raramente opuestas o verticiladas), son ricas en</p>



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

 <p style="text-align: center;"><i>Rodostemonodaphne</i></p>		<p>glándulas con aceites esenciales. Las flores de esta familia comúnmente son hermafroditas (García, 1992).</p>
<p style="text-align: center;">Malvaceae</p>  <p style="text-align: center;"><i>Pavonia spinifex</i></p>	<p>La familia Malvaceae reúne cerca de un millar de especies distribuidas por las regiones templadas y cálidas de todo el Mundo (Font quer, 1993).</p>	<p>El aparato vegetativo es herbáceo o leñoso, con hojas palmatilobadas con estípulas. Las flores en su mayoría son hermafroditas (Font quer, 1993).</p>
<p style="text-align: center;">Melastomataceae</p>  <p style="text-align: center;"><i>Tibouchina multiflora</i></p>	<p>La Melastomataceae es una familia de plantas compuesta por 150 géneros y unas 4500 especies. Se distribuyen en las regiones tropicales y subtropicales de todo el mundo, principalmente en centro y sur América (Font quer, 1993).</p>	<p>Son principalmente arbustos, pero también existen árboles, hierbas y lianas. Las hojas son simples, opuestas, carecen de estípulas, presentan de uno a cuatro pares de nervaduras desde la base (Font quer, 1993). Sus flores son actinomorfas y unisexuales (García, 1992).</p>
<p style="text-align: center;">Moraceae</p>	<p>Comprende alrededor de 40 géneros y más de 1000 especies de plantas muy extendida en las regiones tropicales y</p>	<p>Las flores son unisexuales (Stearn, 1980).</p>



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

 <p style="text-align: center;"><i>Ficus andicola</i></p>	<p>subtropicales, menos frecuente en climas templados (Stearn, 1980).</p>	
<p style="text-align: center;">Passifloraceae</p>  <p style="text-align: center;"><i>Passiflora apoda</i></p>	<p>La familia Passifloraceae es muy llamativa desde varios puntos de vista, entre los que se cuentan el económico y el ornamental. Algunas especies, como <i>Passiflora edulis</i> (maracuyá), <i>P. ligularis</i> (granadilla) y <i>P. mollissima</i> (curuba), son de importancia económica por sus frutos comestibles.</p> <p>En Colombia existen aproximadamente 48 especies de Passifloraceae endémicas, 45 de ellas exclusivamente andinas y una compartida con la región Pacífica (Hernández et al., 2000)</p>	<p>Son enredaderas que trepan por medio de zarcillos, aunque existen especies arbóreas o arbustivas. Sus hojas son alternas y con estípulas. Los pecíolos pueden o no llevar glándulas, las cuales pueden ser sésiles y casi siempre pareadas. Las láminas foliares generalmente son enteras o 2-3 lobadas. Algunas especies de <i>Passiflora</i> presentan en la lámina unas glándulas llamadas ocelos, que cumplen la función de engañar a las mariposas de la subfamilia Heliconiinae que se alimentan de ellas, y evitar así que pongan sus huevos sobre la planta (Hernández et al., 2000). Su flor es hermafrodita, a veces unisexual (Stearn, 1980). Las flores tienen un androginóforo prominente, con menos frecuencia solamente ginóforo y en pocas especies el ovario es sésil (Hernández et al.,</p>



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

		2000).
Piperaceae  <i>Piper umbellatum</i>	<p>La familia Piperaceae es una familia de Angiospermas del Orden Piperales. Consta de 6 géneros y unas 3000 especies, que se distribuyen en las regiones tropicales del planeta (Stearn, 1980).</p>	<p>La familia Piperaceae comprende especies leñosas y herbáceas, con hojas alternas, raramente verticiladas, con o sin estípulas. Las flores son hermafroditas (Stearn, 1980).</p>
Ranunculaceae  <i>Thalictrum podocarpum</i>	<p>La familia Ranunculaceae es una familia de Angiospermas del Orden Ranunculales. Consta de 54 géneros con unas 2525 especies, presentando una distribución prácticamente cosmopolita. Muchas especies presentan flores hermosas y numerosos cultivares son obtenidos por selección artificial se usan para engalanar los jardines. Otros géneros tienen interés farmacológico por los alcaloides y los glucósidos cardiotónicos que contienen (Font quer, 1993).</p>	<p>La familia Ranunculaceae comprende mayoritariamente plantas herbáceas, sobre todo perennes y con hojas alternas sin estípulas, bastante divididas. Sus flores son unisexuales (Font quer, 1993).</p>
Rubiaceae	<p>La familia de las Rubiaceae es una gran</p>	<p>Comprende árboles, arbustos o hierbas, a veces</p>



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

 <p style="text-align: center;"><i>Guettarda crispiflora</i></p>	<p>familia que reúne unas 6000 especies distribuidas por toda la tierra (Taylor et al., 2001).</p>	<p>espinosos, con hojas simples, opuestas o verticiladas, enteras o rara vez pinnadas, con estípulas en las hojas. Las flores, son hermafroditas (Font quer, 1993).</p>
<p style="text-align: center;">Solanaceae</p>  <p style="text-align: center;"><i>Solanum sp</i></p>	<p>La familia Solanaceas comprende 98 géneros y unas 2700 especies, distribuidas principalmente en América central y América del sur. En esta familia se cuentan especies alimenticias tan importantes para el hombre como la papa (<i>Solanum tuberosum</i>), el tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>), el pimiento (<i>Capsicum annuum</i>) o la berenjena (<i>Solanum melongena</i>) (Nee, 1999).</p>	<p>Se trata de plantas leñosas y herbáceas, anuales o perennes, con hojas en espiral o alternas, sin estípulas que, frecuentemente son inodoras pero, en ocasiones, son aromáticas o fétidas. La lámina foliar puede ser simple o compuesta, en este último caso, pueden ser ternadas o pinnatífidas. Las flores son en general hermafroditas (Nee, 1999).</p>
<p style="text-align: center;">Urticaceae</p>  <p style="text-align: center;"><i>Boehmeria bullata</i></p>	<p>La familia Urticaceae comprende cerca de 500 especies distribuidas principalmente en América y Asia suroriental, y en menor medida también en Europa y en África (Stearn, 1980).</p>	<p>Urticaceae es una familia de plantas herbáceas, anuales o perennes, raras veces leñosas; frecuentemente con pelos urticantes (cistolitos). Sin látex. Hojas simples, opuestas o alternas, con frecuencia estipuladas. Sus flores son unisexuales (Stearn, 1980).</p>



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

2.2 Cultivo de plátano:

Colombia es el tercer país productor mundial de plátano con 2,7 millones de toneladas anuales, después de Uganda y Ruanda. Esta cifra es baja si se tiene en cuenta que la producción mundial es de 27 millones de toneladas. Existen actualmente en Colombia 350.000 hectáreas del cultivo de plátano, de las cuales unas 50.000 ha se encuentran en los Llanos Orientales, 22.000 ha están ubicadas en el departamento del Meta, 8.000 ha en Casanare y 20.000 ha en Arauca. El resto de hectáreas nacional se encuentra en la región del eje cafetero. Existen en la zona de Urabá (Antioquia) 10.000 hectáreas de plátano para exportación, fruta que se comercializa hacia los mercados de Estados Unidos, Europa y las Antillas (Martínez, 1998).

En Colombia, cerca del 95% de la producción de plátano se consume internamente; un 4% de la producción nacional se destina al mercado de exportación y una muy pequeña proporción, menos del 1%, se utiliza como materia prima para la agroindustria nacional (Covaleda, 2006).

Las regiones del golfo de Urabá y el nororiente del departamento del Magdalena, sobresalen por el grado de especialización que han alcanzado en la producción y exportación de banano y plátano con altos niveles de productividad e integración de los productores y comercializadores; entre otras razones, gracias a las ventajas comparativas de localización y calidad de los suelos con respecto a otras zonas productoras del mundo.

La producción bananera mundial se encuentra en uno de los momentos más difíciles de su historia. Dentro de un contexto extremadamente difícil desde el punto de vista de precios y comercialización de la fruta, la situación es aún más crítica cuando se presentan grandes problemas para alcanzar una producción estable a través del tiempo (Vargas, 2000).



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Aunque los cultivos de plátano son muy adaptables a las condiciones ambientales, la producción comercial requiere de varias actividades previas como el manejo y control de las enfermedades. Una de las enfermedades más agresiva que ataca estos cultivos es la SN, causada por el hongo *M. fijiensis* Morelet. Esta enfermedad se desarrolla rápidamente produciendo la muerte del tejido verde de las hojas y acelerando el proceso de maduración del fruto inclusive refrigerado haciendo que el tiempo entre siembra y recolección sea menor, como también la producción.

2.3 *Mycosphaerella fijiensis* Morelet causante de la Sigatoka Negra en las musáceas.

2.3.1 Historia.

El plátano es uno de los principales productos agrícolas de exportación en el mundo. En la actualidad la industria platanera en América Central, Sudamérica y algunas islas del Caribe está afectada notablemente por la SN (Orozco, 1998), la cual es el principal problema fitosanitario que amenaza la producción de esta fuente de alimentos y divisas (Jácome, 1998).

La enfermedad de la SN fue descubierta en el valle de Sigatoka en la isla de Fiji, donde el hongo *M. fijiensis* se reportó en el año 1963 (Rhodes, 1964; Leach, 1964), Ese año, la SN, se descubrió como una enfermedad nueva aunque hubo evidencia de su presencia en Hawai y en algunas zonas del Pacífico desde mucho antes (Stover, 1972). En Centro América se registró por primera vez en Honduras en 1972 y desde allí se diseminó por el resto de la región; en Sudamérica, se registró en Colombia en 1981; posteriormente en Ecuador en 1989 y más tarde en Cuba y Venezuela (Morichon and Fullerton, 1990). De 1990 a 1999 se reportaron nuevos registros de la enfermedad desde seis países en



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

África, ocho en Asia, América latina y el Caribe, también se reportó en Australia. En todos esos países, *M. fijiensis* ha estado expandiéndose para llegar a los nichos ecológicos que solo estaban ocupados por *M. musicola*, agente causal de la Sigatoka Amarilla, amenazando la supervivencia de este patógeno (Jácome et al., 2002).



Figura 1. Registro de la enfermedad de la Sigatoka Negra en el mundo (Mourichon and Fullerton; 1990).

2.3.2 Identificación y clasificación.

El agente causal de la SN es el hongo Ascomiceto llamado *Mycosphaerella fijiensis*, el cual se reproduce en forma sexual y asexual durante su ciclo de vida (Douglas y Ronald, 1992). La fase asexual (*Pseudocercospora fijiensis* Morelet) se presenta en el desarrollo de las primeras lesiones de la enfermedad (manchas), en donde se observa la presencia de un número relativamente bajo de conidióforos



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

(estructura donde se producen las esporas asexuales llamadas conidios) que salen de los estomas, principalmente en el envés de la hoja. La fase sexual (*M. fijiensis*) es la más importante en la expansión de la enfermedad, ya que produce un gran número de ascosporas a partir de estructuras llamadas pseudotecios (algunas veces llamadas peritecios). Las ascosporas son las esporas sexuales que se dispersan por el aire, sus conidias son arrastradas por corrientes hídricas y ambas constituyen las estructuras de diseminación de la enfermedad (Douglas et al., 1992). En la Tabla 2 se muestra la clasificación del hongo *M. fijiensis* Morelet.

Tabla 2. Clasificación del hongo *M. fijiensis* Morelet (González et al., 1995).

Clase	<i>Ascomycetes</i>
Sub-clase	<i>Loculoascomycetidae</i>
Orden	<i>Dothideales</i>
Familia	<i>Dophideaceae</i>
Género	<i>Mycosphaerella</i>
Especie	<i>Fijiensis</i>

2.4 Reproducción, epidemiología e interacción con el huésped.

2.4.1 Reproducción sexual.

Mycosphaerella fijiensis Morelet es el nombre que fue dado al hongo en la fase sexual. Para el hongo reproducirse en esta fase, desarrolla muchos espermogonios (estructura donde se producen células llamadas espermacios, semejantes a esporas que se comportan como los gametos masculinos) en el envés de la hoja. El espermacio es oscuro y de forma periforme. Son diminutos y fertilizan las hifas hembras (Fullerton, 1994). En la figura 2A se observa el espermogonio y en la figura 2B se observan los espermacios en el proceso de germinación



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

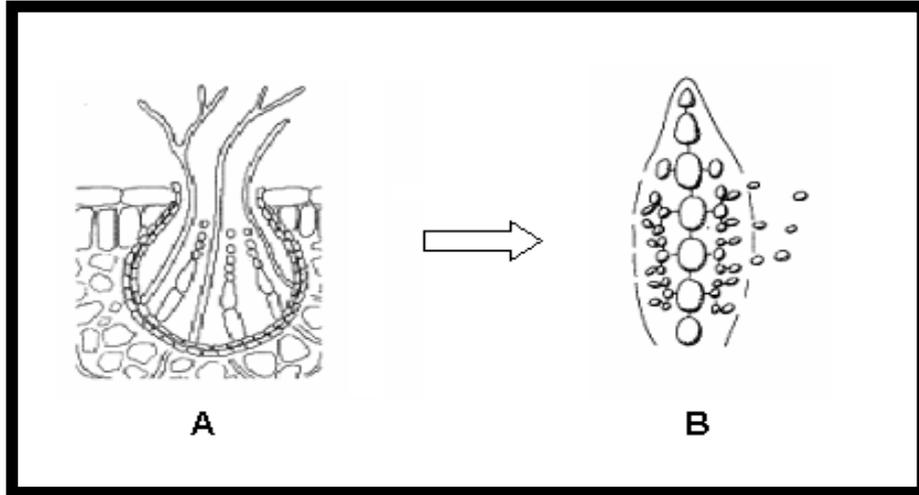


Figura 2. (A) Espermogonio. **(B)** Espermacios.

Al efectuarse la fertilización, los seudotecios se forman dentro de las lesiones maduras emergiendo de los tejidos vegetales. Las ascas, tienen dos paredes y contienen ocho esporas sexuales que están alineadas de dos en dos. Las ascosporas son hialinas, miden de 14-20 μm de longitud y de 4 hasta 6 μm de ancho y poseen una septa (Fullerton, 1994).

En la Figura 3, se muestra el diagrama de la reproducción sexual del hongo *M. fijiensis* Morelet.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

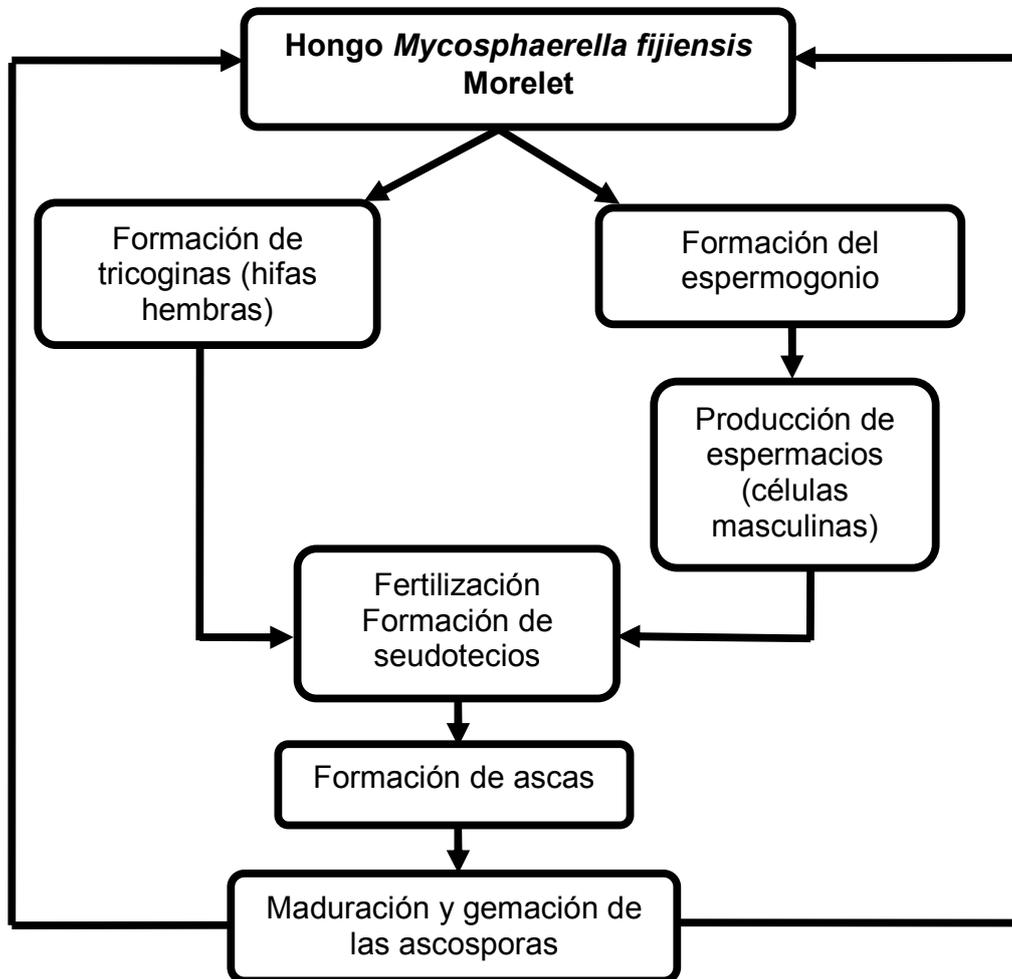


Figura 3. Reproducción sexual del hongo *M. fijiensis* Morelet (Fullerton, 1994).

2.4.2 Reproducción asexual

La forma asexual se designa *Pseudocercospora fijiensis*. Los conidios se originan individual y apicalmente en el conidióforo. Los conidios son lisos, largos y presentan tres o más septas.

Los conidios germinan durante el periodo de alta humedad e infectan a las hojas a través de los estomas, usualmente en el envés. Bajo condiciones de alta humedad



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

las hifas pueden emerger por los estomas y crecer a lo largo de las superficie de la hoja y penetrar a otros estomas, expandiéndose de esta forma la lesión (Fullerton, 1994). Los conidios del hongo se diseminan a través de las corrientes de agua. Germinan en un periodo de alta humedad relativa y sus esporas son arrastradas por el aire, transmitiendo la enfermedad a otros cultivos a gran distancia (Fullerton, 1994). En la Figura 4, se muestra el diagrama de la reproducción asexual del hongo *M. fijiensis* Morelet.

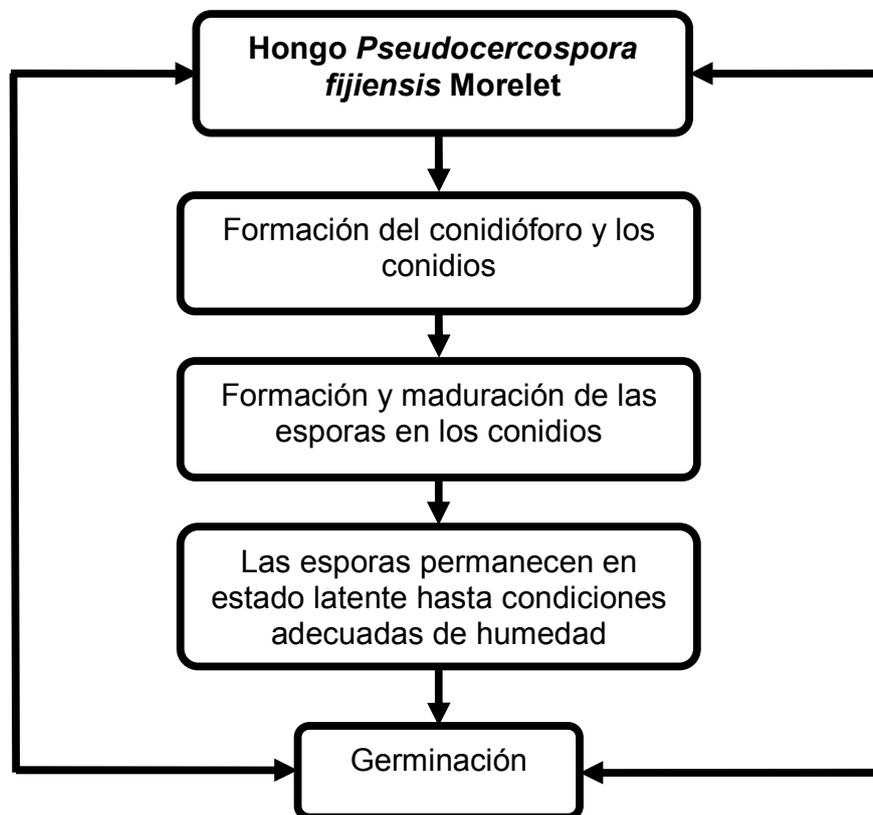


Figura 4. Reproducción asexual del hongo *M. fijiensis* Morelet (Fullerton, 1994).

A continuación se muestra el ciclo de infección tanto sexual como asexual, del hongo *M. fijiensis* (Mourichon *et al.*, 1997).



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

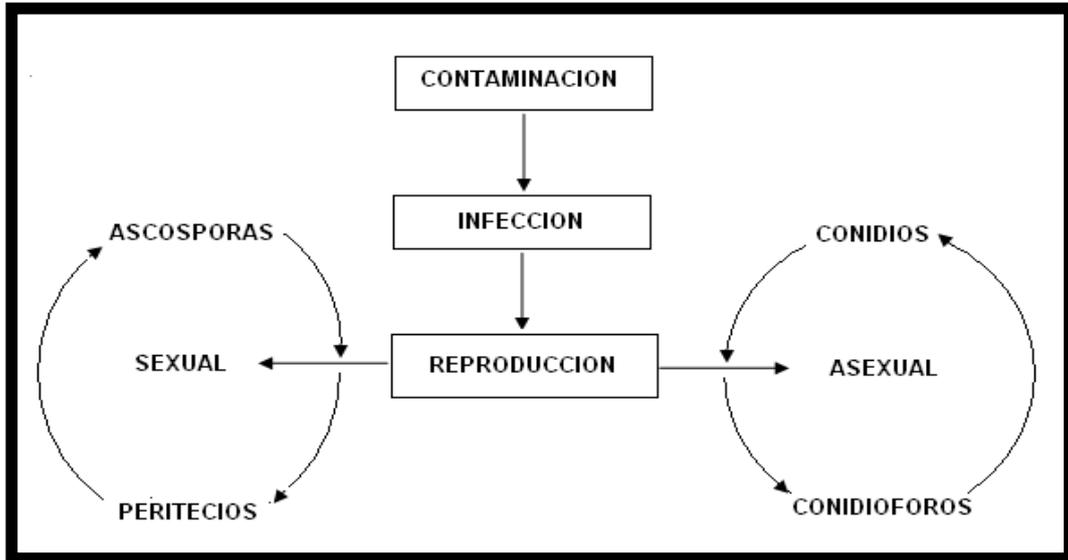


Figura 5. Ciclo de infección del hongo *Mycosphaerella fijiensis* (Mourichon et al., 1997)

2.5 Síntomas de la Sigatoka Negra.

Según el Ministerio de la Agricultura, (1990) se describen los siguientes estadios que se observan en las hojas

1. Los primeros síntomas visibles son pequeñas pecas menores de 0.25 mm de color pardo rojizo en la superficie inferior de la hoja, no hay síntomas en la parte superior. Cuando el ataque es severo pueden observarse en la segunda hoja abierta de plantas que no han producido racimo. Usualmente aparecen en la tercera y cuarta hoja abierta.



Figura 6. Primer síntoma de la enfermedad con la aparición de pequeñas pecas



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

2. Las pecas iniciales se alargan hasta 20 mm y dos mm de ancho, paralelos a las nerviaciones de la hoja, más evidentes en la superficie inferior que en la superior y en algunos casos, son más numerosas en ambas bandas de la cara izquierda de la hoja. Estos estadios son los más importantes para diferenciarlos de la Sigatoka amarilla. A partir del segundo estadio se produce la formación de conidios tipos cercospora (fase asexual), a diferencia de la Sigatoka amarilla, que en esta fase no produce conidios. Los conidios en estas rayas se producen sobre conidióforos aislados o agrupados durante la noche y el aire lo dispersa durante la mañana. La producción de conidióforos y conidios en estas manchas no es permanente.



Figura 7. Alargamiento de las pecas y formación de conidios.

3. Las rayas se alargan ligeramente, el cambio notable es el color de pardo rojizo a pardo oscuro casi negro, algunas veces con un matiz purpúreo. La raya es visible en la superficie superior de la hoja, cuando son numerosas y están más o menos uniformemente distribuidas, las hojas toman un color negruzco. En clones muy susceptibles se produce necrosis de los tejidos en el mismo se produce abundante formación de seudotecios y ascosporas.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP



Figura 8. Cambio de color de las rayas de pardo rojizo a pardo oscuro. Es más notable el deterioro de la hoja.

4. Las rayas se ensanchan y se hacen de contornos fusiformes, esta transición se caracteriza por un halo verde acuoso, ligeramente carmelita alrededor de las manchas. El efecto acuoso es claro en horas tempranas de la mañana cuando aún existe rocío en las hojas o después de llover.



Figura 9. Ensanchamiento de las rayas.

5. El área central de la mancha ligeramente se comprime y el borde oscuro es más pronunciado debido al oscurecimiento. En esta fase se observan esporadiquitos de menor tamaño que del patógeno.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP



Figura 10. Oscurecimiento de las manchas.

6. El centro de la mancha se seca y se vuelve gris y después deprimido, la mancha está rodeada de un borde estrecho, bien definido entre este y el color verde de la hoja, se observa una zona amarilla de transición. Después que la hoja se colapsa y cuelga, las manchas quedan claramente visibles debido al centro claro y al borde oscuro.



Figura 11. Deterioro total de la hoja y colapso de la misma.

Según Craenen, (1998) se requiere un mínimo de ocho hojas funcionales durante todo el ciclo para obtener buenos rendimientos en la producción; las plantas que presenten menos de ocho hojas sin manchas antes de la floración se califican como susceptibles a la SN.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

3 SECCIÓN EXPERIMENTAL

3.1 Localización

Este trabajo se realizó en el Laboratorio del Grupo Biotecnología-Productos Naturales de la Escuela de Tecnología Química de la Universidad Tecnológica de Pereira, sede La Julita en el municipio de Pereira (Risaralda) que tiene una temperatura promedio de 22°C, una humedad relativa del 80%, una precipitación promedio de 2400 mm/año y una altitud de 1340 msnm (CARDER, 2001).

3.2 Recolección y caracterización de las especies vegetales recolectadas.

El material vegetal correspondiente a 47 plantas fue recolectado en la zona media y baja del Parque Regional Natural Ucumarí, ubicado en el departamento del Risaralda. Esta zona constituye la segunda ventana de estudio propuesta por el CIEBREG. Las plantas recolectadas pertenecen a las familias Apiaceae, Asclepiadaceae, Clusiaceae, Lauraceae, Melastomataceae, Moraceae, Passifloraceae, Piperaceae, Ranunculaceae, Rubiaceae, Solanaceae, Urticaceae, (Anexo 1). Los puntos de recolección se muestran en la figura 12.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

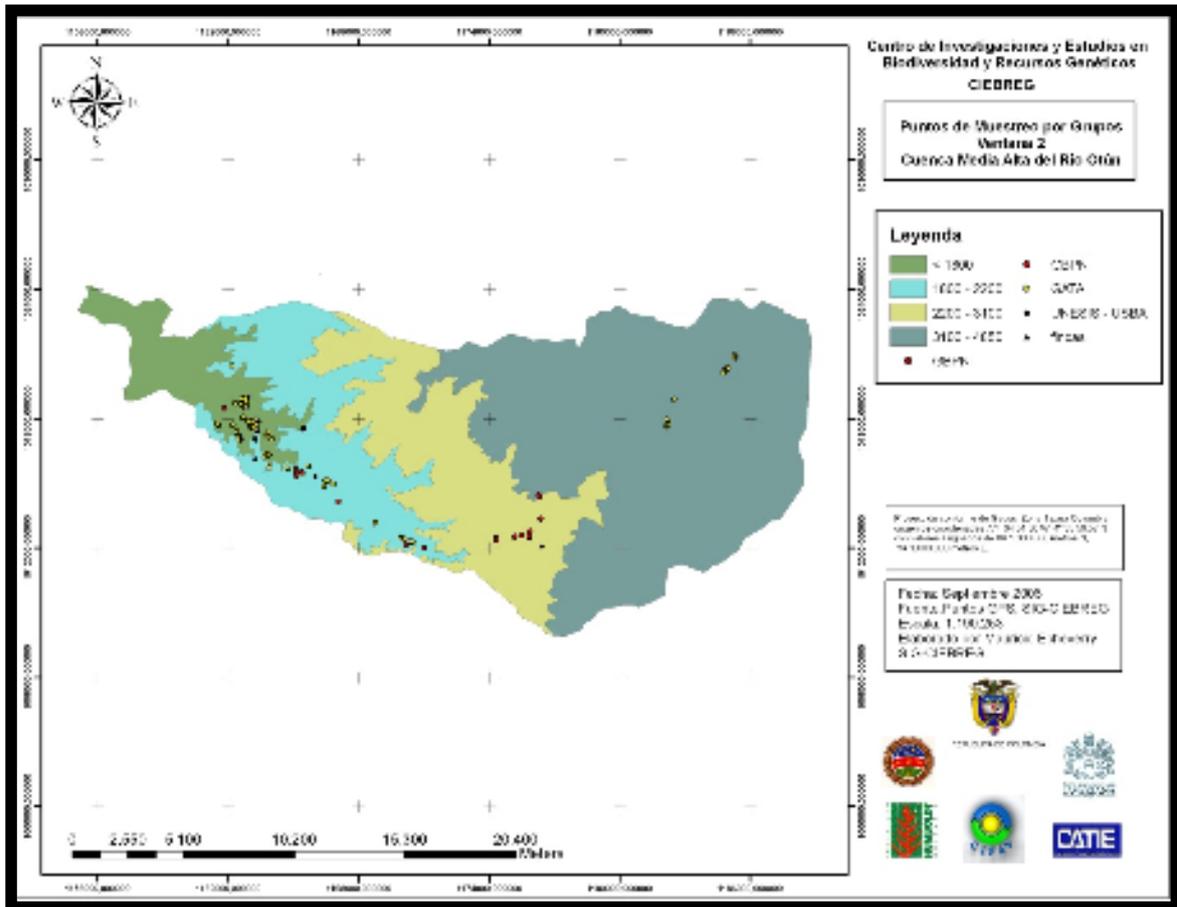


Figura 12. Puntos de recolección del material vegetal en el PRNU.

3.3 Obtención de los extractos

Para la obtención de los extractos, se pesaron 300 g de material vegetal seco y molido. Se sometieron a extracción por lixiviación con los solventes *n*-hexano, diclorometano y metanol. Se comenzó la lixiviación del material vegetal con *n*-hexano por 72 horas. Dicho material se filtró, se concentró en rota evaporador hasta sequedad. El extracto se codificó y se almacenó a una temperatura de -10°C. El marco se sometió al mismo procedimiento de lixiviación con *n*-hexano dos veces más. Finalmente se realizaron los mismos procedimientos con los solventes



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

de diclorometano y metanol. Los extractos fueron almacenados a -10°C hasta su utilización en los bioensayos (Ver anexo 2).

3.4 Marcha Fitoquímica: Identificación y Caracterización de metabolitos secundarios presentes en los extractos metanólicos

Con el fin de detectar los núcleos fitoquímicos presentes en los diferentes extractos crudos evaluados, se realizó una marcha fotoquímica por cromatografía de placa delgada (CCD) (Ver anexo 3) para cada extracto vegetal, siguiendo la metodología descrita por Stahl (1969).

Los solventes utilizados para la elusión de las cromatoplasmas con los extractos polares fueron cloroformo/acetato de etilo/metanol (2:2:1) y para extractos apolares se utilizó hexano/acetato de etilo (7:3). Para el desarrollo de las cromatoplasmas, se utilizaron placas de sílica gel 60F₂₅₄ soportadas sobre placas de aluminio de 20x20 cm.

En la tabla 3 se presentan los reveladores y patrones utilizados para detectar los núcleos fitoquímicos presentes en los extractos de *n*-hexano, diclorometano y metanol obtenidos de las plantas en estudio.

Tabla 3. Patrones y reveladores utilizados en CCD para la detección de los núcleos fitoquímicos en estudio (Wagner, 1996).

Núcleo fitoquímico	Patrón	Revelador
Alcaloides	Papaverina	Dragendorff
Terpenos	Taxol y lanosterol	Anisaldehído/ CH_3COOH - H_2SO_4
Triterpenos		
Esteroles		
Flavonoides	Kaempferol	AlCl_3 al 2% en EtOH absoluto
Taninos	Acido gálico y ácido tánico	FeCl_3 al 5% en solución salina saturada
Fenoles		



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Saponinas esteroidales y triterpénicas	Digitonina	H ₂ SO ₄ 10% en EtOH absoluto
Sesquiterpenlactonas	Digitoxina	Acido 3,5-dinitrobenzónico MeOH-KOH

3.5 Reactivos

Para el desarrollo del proyecto, se utilizaron los siguientes reactivos:

- *n*-Hexano, Metanol y Diclorometano grado analítico Mallinckrodt
- Medio de cultivo bacteriológico N° 1 Oxoid
- Medio de cultivo PDA (Agar papa dextrosa) Oxoid
- BENLATE (fungicida)
- Estreptomina Sigma

3.6 Equipos

Para la realización del proyecto se utilizaron los siguientes equipos:

- Balanza analítica Mettler Toledo AB204
- Autoclave Sterilof modelo 144 Lb
- Micro pipetas Eppendorf de 10-100 y 100-1000 µL
- Rota evaporador Heidolph y Labconco
- Cámara de flujo laminar
- Material de vidrio Schott Duran (Mainz, Alemania)
- Mechero de gas
- Incubadora Binder de 30-80°C
- Microscopio Zeiss
- Vortex IKA MS1



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

3.7 Actividad antifúngica de los extractos:

Para evaluar la actividad antifúngica de los extractos frente al hongo *M. fijiensis* se utilizaron dos métodos: 1) La medición del tubo germinativo de las ascosporas y 2) crecimiento radial del hongo.

3.7.1 Evaluación de la actividad antifúngica de los extractos por medio de la medición de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas

En este procedimiento lo que se busca es medir la longitud del tubo germinativo de las ascosporas. Para el desarrollo del ensayo se deben realizar varios procedimientos como:

- a. Recolección del material vegetal infectado
- b. Montaje de cámara húmeda
- c. Descarga de las ascosporas

3.7.1.1 Recolección del material vegetal infectado

Para la selección del material vegetal infectado, se recolectaron las hojas más jóvenes de plantas de plátano con tejido necrótico (Figura 13). Preferiblemente, la recolección se debe realizar después de 2 – 3 días sin llover para asegurar la presencia de inóculo en el tejido foliar. La masa seca de tejidos infectados de apariencia blanco-grisácea produce el mayor número de ascosporas.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Figura 13. Recolección del material infectado (DU PONT, 1980).

3.7.1.2 Procedimiento para la realización de la cámara húmeda.

Luego de la recolección del tejido necrótico se realizó el procedimiento esquematizado en la figura 14.

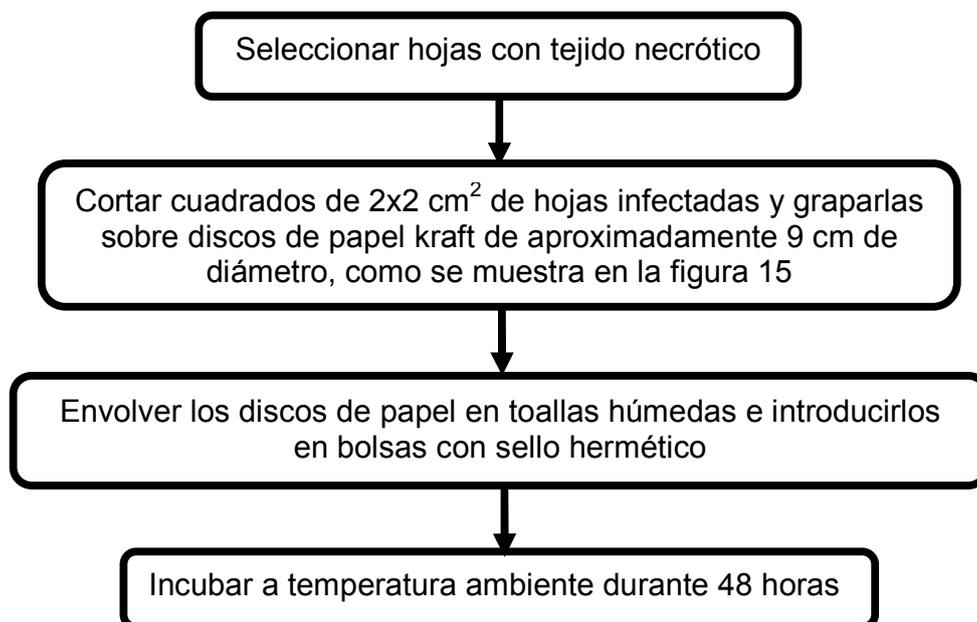


Figura 14. Preparación de la cámara húmeda (González, 1975; Du pont, 1980).



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

En la figura 15, se muestran los discos de papel kraft con el material vegetal infectado, para la preparación de la cámara húmeda y posteriormente la realización de la descarga de ascosporas. Para este ensayo se utilizó como control positivo solución de BENLATE 1 mg/L y como control negativo etanol al 1%.

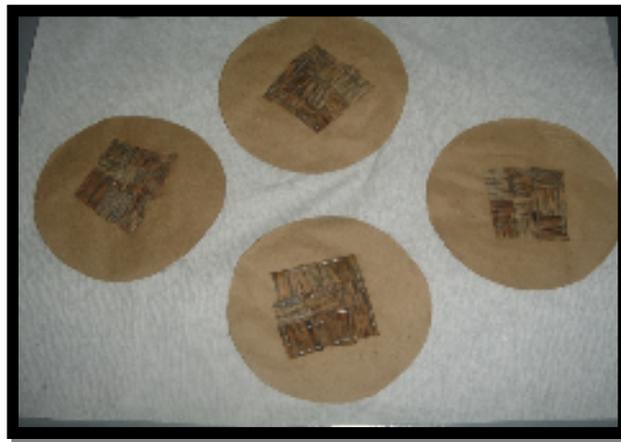


Figura 15. Discos de papel con material vegetal infectado

3.7.1.3 Descarga de ascosporas

Para la realización de este ensayo se siguió el procedimiento que se muestra en la figura 16:



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

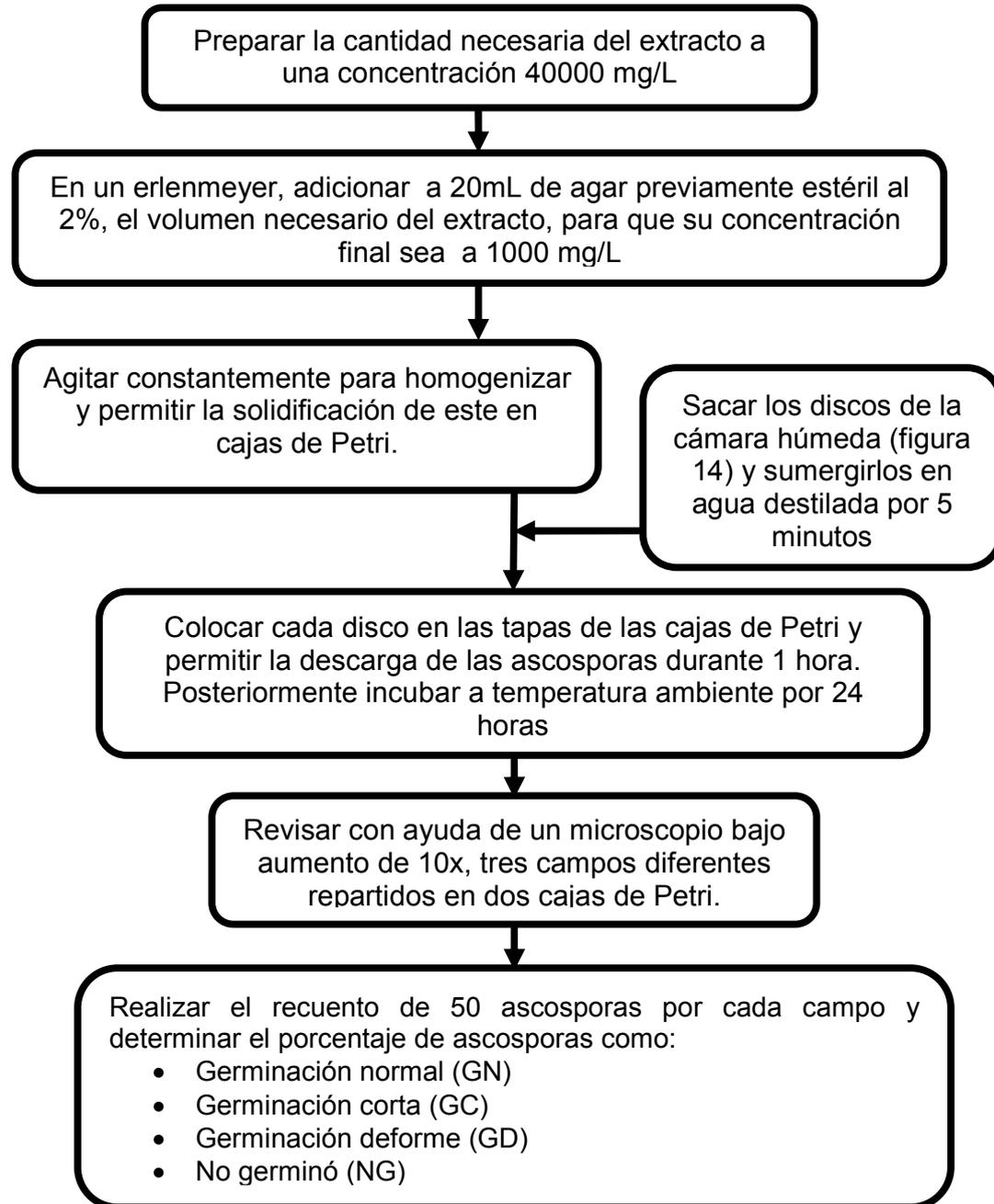


Figura 16. Procedimiento de evaluación de la actividad antifúngica de los extractos vegetales sobre el hongo *M. fijiensis* Morelet, mediante la elongación del tubo germinativo de las ascosporas (González, 1975; Du pont, 1980).



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Para la preparación de los extractos se utilizó una solución patrón a una concentración inicial de 40000 mg/L en EtOH-H₂O (2:3), para que en la solución final del extracto más los 20 mL de medio, quedara a una concentración de 1000 mg/L en el agar. El agua utilizada para la preparación de los extractos fue estéril.

3.7.2 Procedimiento para la evaluación de los extractos por medio del crecimiento radial del micelio del hongo *M. fijiensis* Morelet

En este procedimiento lo que se busca es la medición del crecimiento radial del micelio del hongo. Para el desarrollo de estos ensayos se deben realizar los siguientes procedimientos:

- a. Obtención del cultivo monospórico
- b. Obtención del crecimiento radial.

Del cultivo monospórico se deriva el ensayo de crecimiento radial, puesto que se requieren para permitir el crecimiento del hongo.

3.7.2.1 Cultivo monospórico

El procedimiento para el cultivo monospórico se muestra a en la figura 17



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

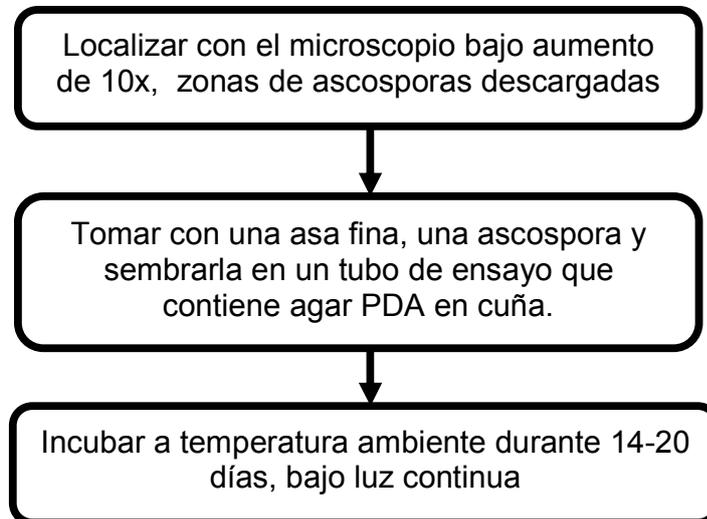


Figura 17. Procedimiento del cultivo monospórico (González, 1975; Du pont, 1980).

3.7.2.2 Crecimiento radial

Para determinar la actividad antifúngica de los extractos en la fase de reproducción asexual del hongo, se realizó la medición del crecimiento radial del micelio. El procedimiento se muestra en la figura 18.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

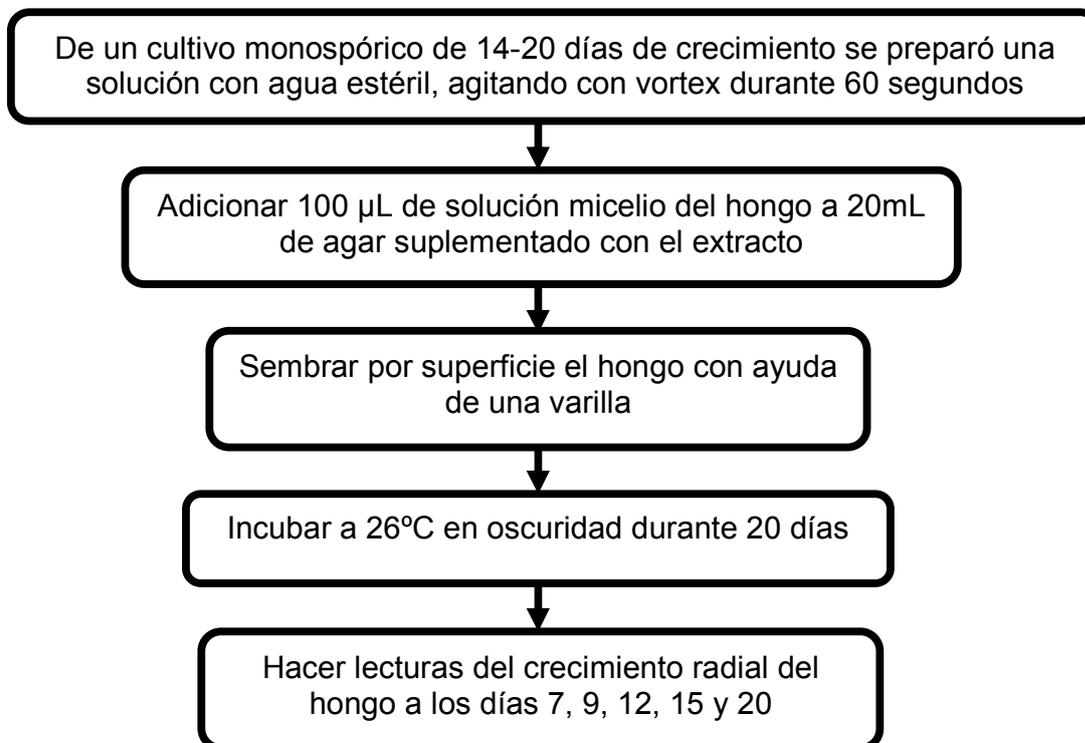


Figura 18. Procedimiento de evaluación de la actividad antifúngica de los extractos vegetales sobre el hongo *M. fijiensis* Morelet, por medio del crecimiento radial del micelio (González, 1975; Du pont, 1980).

En este ensayo, se adicionó al agar, la cantidad necesaria de estreptomicina a 250 mg/L para evitar la contaminación por bacterias.

Para la preparación de los extractos se tuvo en cuenta que la concentración final del extracto en la caja Petri siempre fuera de 1000 mg/L.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

3.8 Toma de datos y análisis estadístico

3.8.1 Análisis estadístico de la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos por medio de la medición de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas

Los datos para este ensayo se tomaron 24 horas después del periodo de incubación posterior a la descarga, como se mostró anteriormente en la figura 16. Para analizar estadísticamente los datos (ANEXO 4) obtenidos en el ensayo de medición de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas, se analizaron inicialmente los promedios (ANEXO 5) en Excel, obteniéndose los resultados que se muestran en la figura 19 del análisis de resultados. Posteriormente, se utilizó el método de análisis de conglomerados, cuya finalidad fue la de tener un mejor conocimiento de los datos y agrupar en una misma clase, aquellos que en su comportamiento fueran semejantes.

3.8.2 Análisis estadístico de la evaluación de la actividad antifúngica de los extractos por medio del crecimiento radial del micelio del hongo *M. fijiensis* Morelet

El análisis estadístico de los datos obtenidos en este ensayo fue realizado con base al método de Kruskal Wallis, a través del software Infostat (versión 2005). La prueba de Kruskal-Wallis es el método más adecuado para examinar si un grupo de datos proviene de la misma población; y para comparar poblaciones cuyas distribuciones no son normales.

Para realizar el análisis, fue necesario tomar los datos correspondientes al día 20 de crecimiento, puesto que en este día se pudo determinar la actividad de los extractos metanólicos contra *M. fijiensis*.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

4. ANÁLISIS DE RESULTADOS

4.1 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA MEDICIÓN DE LA ELONGACIÓN DEL TUBO GERMINATIVO DE ASCOSPORAS.

Después de haber realizado los procedimientos representados en las figuras 15 y 16 de la sección experimental, se tomaron los datos de los 47 extractos metanólicos a concentraciones de 1000 mg/L, correspondientes a las 47 plantas recolectadas. En la figura 19, se muestran los datos de los promedio de las ascosporas, analizados inicialmente por EXCEL.

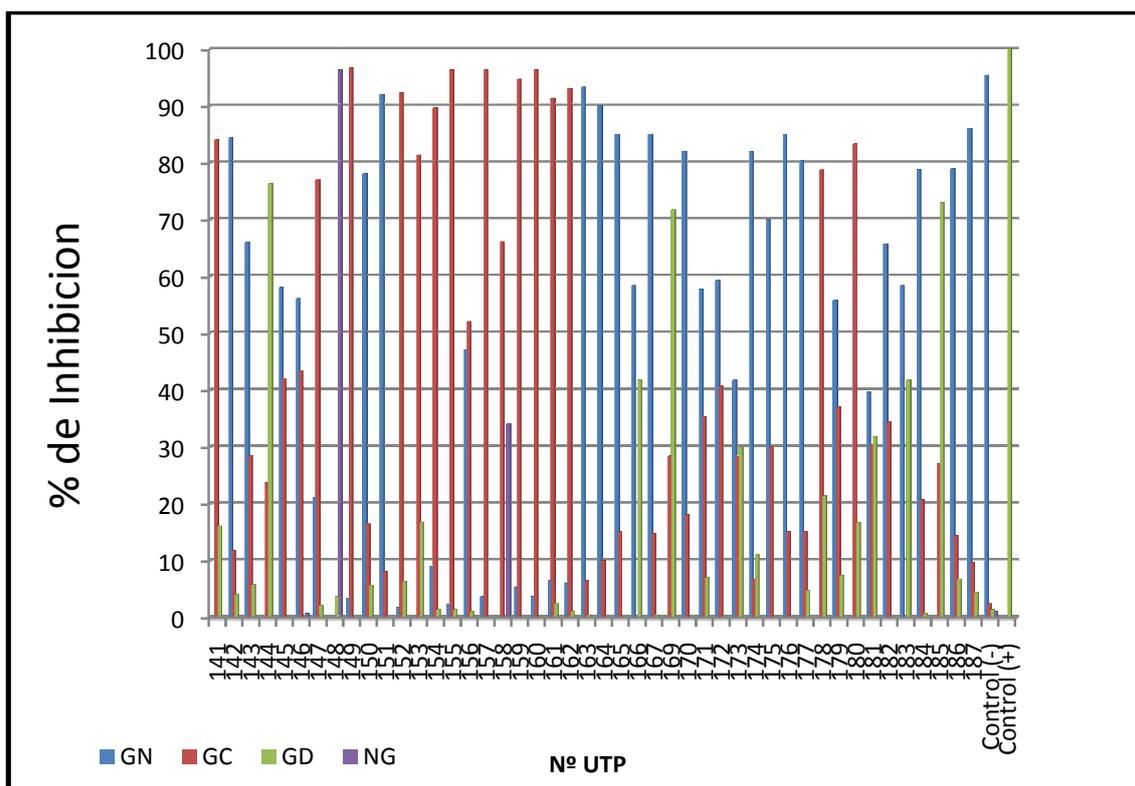


Figura 19. Porcentaje de inhibición de las familias de los extractos metanólicos a 1000mg/L de las especies evaluadas para la elongación del tubo germinativo de



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

ascosporas (GN: germinación normal; GC: germinación corta; GD: germinación deforme; NG: no germinado).

Posteriormente, se tomaron los conteos de ascosporas (Anexo 4) para procesarlos por medio del análisis de conglomerado, obteniéndose los siguientes resultados para la primera repetición.

- I Repetición:

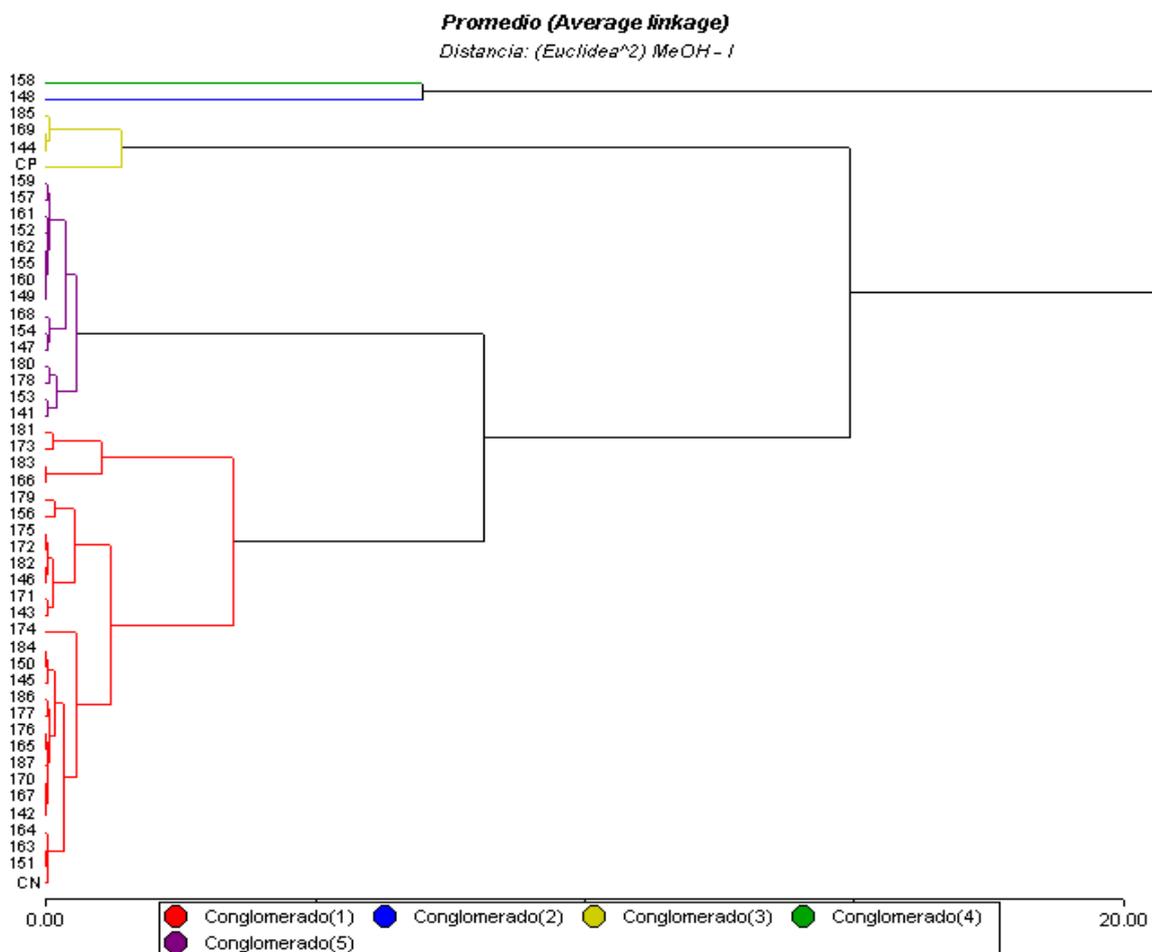


Figura 20. Conglomerado primera repetición de extractos metanólicos a 1000mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Tabla 4. Resultados de la primera repetición de conglomerado de extractos metanólicos a 1000mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas.

			Media
Conglomerado I MeOH	1	Normal I	107.75
		Corto I	30.54
		Deforme I	11.43
		No Germinado I	.00
	2	Normal I	.00
		Corto I	.00
		Deforme I	6.00
		No Germinado I	144.00
	3	Normal I	.00
		Corto I	26.00
		Deforme I	124.00
		No Germinado I	.00
	4	Normal I	.00
		Corto I	62.00
		Deforme I	.00
		No Germinado I	88.00
	5	Normal I	8.80
		Corto I	132.47
		Deforme I	8.25
		No Germinado I	.00

Para verificar los resultados de la primera repetición, se analizaron los datos en la segunda repetición (Anexo 4), obteniéndose los siguientes resultados en el análisis de conglomerados:



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

- II Repetición:

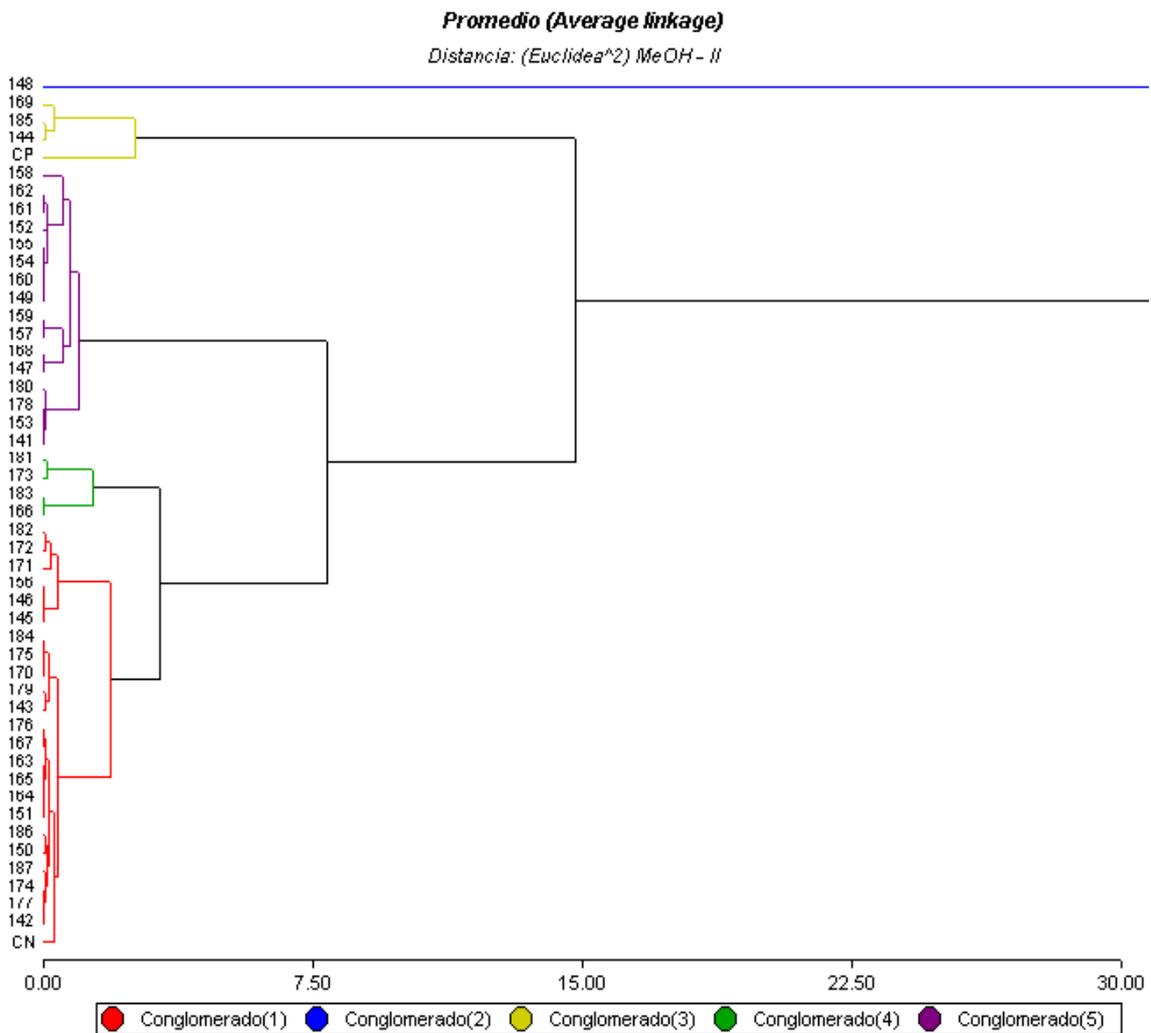


Figura 21. Conglomerado segunda repetición de extractos metanólicos a 1000mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Tabla 5. Resultados de la segunda repetición de conglomerado de extractos metanólicos a 1000mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas.

			Media
Conglomerado II MeOH	1	Normal II	113.21
		Corto II	33.08
		Deforme II	3.63
		No Germinado II	.08
	2	Normal II	.00
		Corto II	.00
		Deforme II	5.00
		No Germinado II	145.00
	3	Normal II	.00
		Corto II	33.25
		Deforme II	116.75
		No Germinado II	.00
	4	Normal II	76.00
		Corto II	23.00
		Deforme II	51.25
		No Germinado II	.00
5	Normal II	8.06	
	Corto II	126.81	
	Deforme II	8.00	
	No Germinado II	.88	

Según los análisis de conglomerados para ambas repeticiones, se concluye lo siguiente:

- **Germinación normal:** Teniendo en cuenta los conglomerados y las medias de ambas repeticiones, se pudo determinar que los extractos UTP: 142, 143, 145, 146, 150, 151, 156, 163, 164, 165, 166, 167, 170, 171, 172, 173,



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

174, 175, 176, 177, 179, 181, 182, 183, 184, 186, 187, presentaron una germinación normal, lo cual indica que estos extractos no inhibieron el ciclo de reproducción sexual del hongo.

- **Germinación corta:** Los extractos UTP: 141, 147, 149, 152, 153, 154, 155, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 168, 178, 180, para ambas repeticiones, presentaron un crecimiento corto del tubo germinativo, lo cual indica inhibición contra el hongo *M fijiensis*.
- **Germinación deforme:** Los extractos UTP: 144, 169 y 185, indujeron una germinación deforme en las ascosporas. Estos extractos tuvieron un comportamiento similar al control positivo (BENLATE 1 mg/L), lo cual indica que produjeron inhibición contra la elongación del tubo germinativo del *M. Fijiensis*.
- **No Germinado:** En ambas repeticiones se pudo observar, que el extracto UTP 148 inhibió el ciclo de desarrollo del hongo puesto que las ascosporas no lograron germinar.

Con base a los resultados obtenidos con el método estadístico para ambas repeticiones, se pudo deducir que los extractos activos contra a la Sigatoka Negra fueron UTP: 141, 147, 149, 152, 153, 154, 155, 157, 158, 159, 160, 161, 162, 168, 178, 180 que presentaron una germinación corta; los extractos UTP: 144, 169 y 185 indujeron germinación deforme; y por último el extracto UTP: 148, inhibió la germinación de las ascosporas.

Debido al gran número de extractos activos en la fase de reproducción sexual de *M. fijiensis* a 1000mg/L, se decidió determinar cuáles de estos presentan la actividad antifúngica más potente. Para esto, se realizaron nuevos experimentos



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

con dichos extractos pero a una concentración de 500 mg/L. Los resultados de los promedios para ambos análisis a 500 mg/L se muestran en el Anexo 6.

Nuevamente, los resultados se evaluaron inicialmente por Excel. La gráfica correspondiente a los porcentajes de inhibición de los extractos metanólicos a 500 mg/L, sobre las ascosporas, se muestra en la grafica 22.

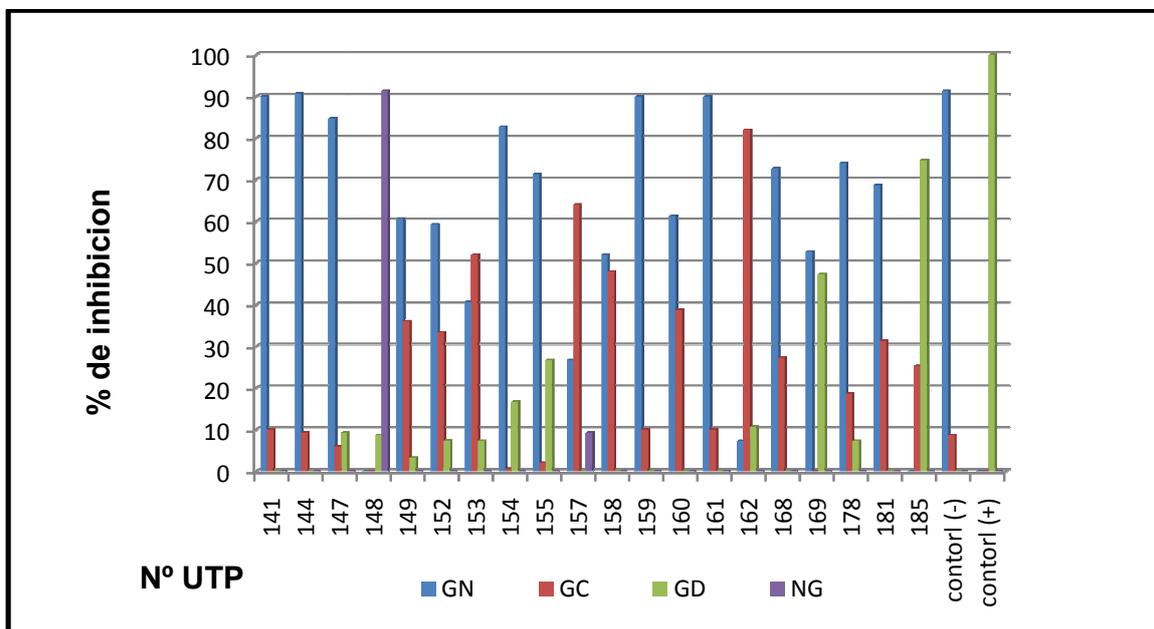


Figura 22. Porcentaje de inhibición de extractos metanólicos a 500mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas. (GN: germinación normal; GC: germinación corta; GD: germinación deforme; NG: no germinado).

Se repitieron nuevamente los análisis de conglomerados y a esta concentración, se obtuvo los siguientes resultados, para la primera repetición:

- I Repetición:



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

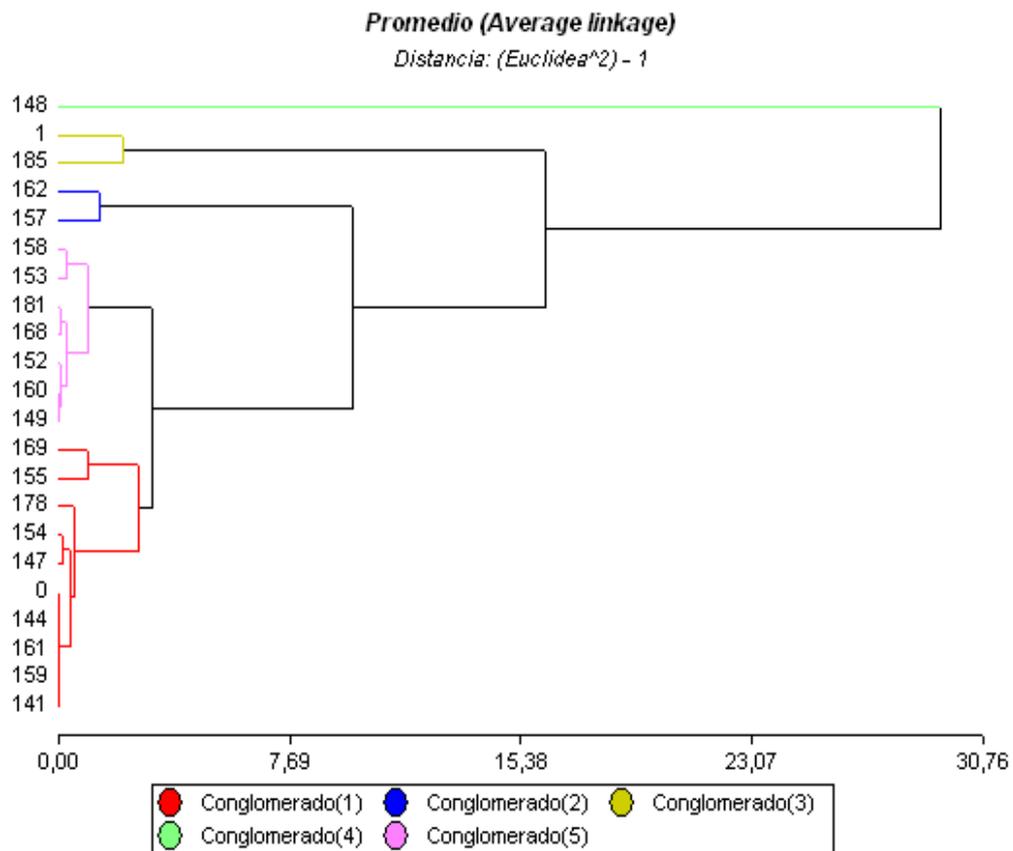


Figura 23. Conglomerado primera repetición de extractos metanólicos a 500mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascospora.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Tabla 6. Resultados de la primera repetición de conglomerado de extractos metanólicos a 500mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas.

			Proporción
Conglomerado I MeOH	1	Normal I	81,7
		Corto I	7,5
		Deforme I	10,7
		No Germinado I	,0
	2	Normal I	17,0
		Corto I	73,0
		Deforme I	5,4
		No Germinado I	4,7
	3	Normal I	,0
		Corto I	12,7
		Deforme I	87,4
		No Germinado I	,0
	4	Normal I	,0
		Corto I	,0
		Deforme I	8,7
		No Germinado I	91,3
	5	Normal I	59,3
		Corto I	38,1
		Deforme I	2,6
		No Germinado I	,0

- II Repetición:



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

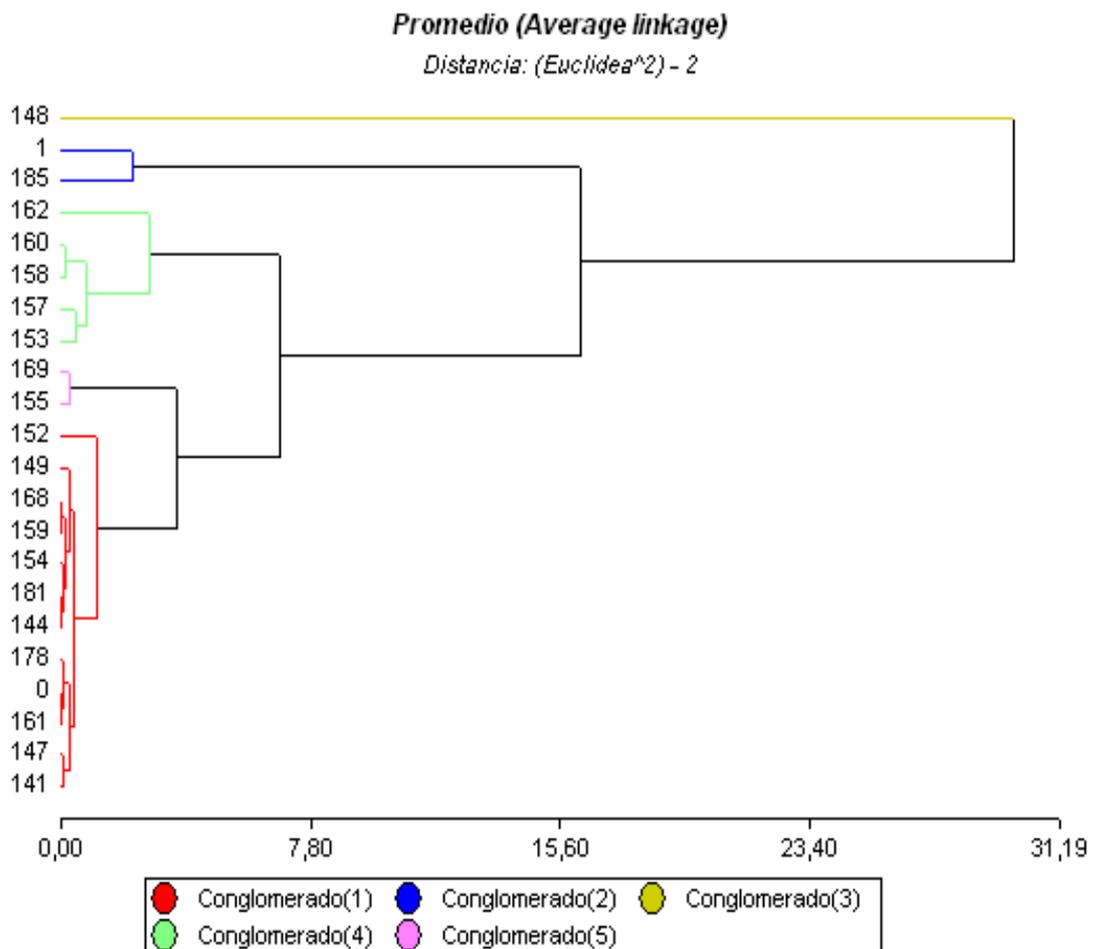


Figura 24. Conglomerado segunda repetición de extractos metanólicos a 500mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Tabla 7. Resultados de la segunda repetición de conglomerado de extractos metanólicos a 500mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas

			Proporción
Conglomerado II MeOH	1	Normal II	80,1
		Corto II	15,5
		Deforme II	4,4
		No Germinado II	,0
	2	Normal II	,0
		Corto II	12,0
		Deforme II	88,0
		No Germinado II	,0
	3	Normal II	,0
		Corto II	,0
		Deforme II	9,3
		No Germinado II	90,7
	4	Normal II	39,2
		Corto II	53,9
		Deforme II	4,8
		No Germinado II	2,1
	5	Normal II	56,3
		Corto II	,0
		Deforme II	43,7
		No Germinado II	,0

Después de haber realizado nuevamente los protocolos 15 y 16 de la sección experimental, se tomaron los datos de los extractos metanólicos activos a concentraciones de 1000mg/L y se evaluaron a una concentración de 500mg/L. Se pudo observar, gracias al análisis de conglomerados, y comparando ambas repeticiones lo siguiente:



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

- **Germinación normal:** Teniendo en cuenta los conglomerados y las medias de ambas repeticiones, se pudo concluir que los extractos UTP: 141, 144, 147, 149, 152, 151, 153, 154, 155, 158, 159, 160, 161, 168, 169, 178 y 178 presentaron una germinación normal, lo cual indica que estos extractos no inhibieron el ciclo de reproducción sexual de hongo a una concentración de 500mg/L.
- **Germinación corta:** Los extractos *Clusia multiflora* (UTP-157) y *Rodostemonodaphne* (UTP-162), para ambas repeticiones, presentaron un crecimiento corto del tubo germinativo a 500 mg/L, lo cual se considera que de alguna manera dichos extractos inhibieron el crecimiento del hongo en la fase sexual.
- **Germinación deforme:** El extracto *Vismia* (UTP-185), presentó una germinación deforme en las ascosporas. Este extracto tuvo un comportamiento similar al control positivo (BENLATE 1 mg/L), lo cual indica que este extracto inhibió el crecimiento del tubo germinativo de las ascosporas de contra *M. Fijiensis*.
- **No Germinado:** En ambas repeticiones se pudo observar, que el extracto *Piper pesaresanum* (UTP-148) presentó inhibición contra el hongo ya que las ascosporas no germinaron.

Con base a los resultados obtenidos con el método estadístico aplicado para ambas repeticiones, se pudo inferir que los extractos metanólicos activos frente a la Sigatoka Negra a una concentración de 500 mg/L fueron los *Clusia multiflora* (UTP-157) y *Rodostemonodaphne* (UTP-162), con germinación corta en el tubo germinativo de las ascosporas; el extracto *Vismia* (UTP-185) produjo una



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

germinación deforme; y por último el extracto *Piper pesaresanum* (UTP-148), no permitió la germinación de las ascosporas.

Estos extractos presentaron una actividad antifúngica potente sobre la fase sexual del hongo, con un porcentaje de inhibición por encima del 70%, lo cual es un porcentaje significativo para asegurar la inhibición del hongo.

Según los resultados obtenidos de la marcha fitoquímica (ANEXO 3), se puede concluir que en el extracto *Clusia multiflora* (UTP-157), perteneciente a la familia Clusiaceae hay presencia de flavonoides, fenoles y taninos. Mientras que el extracto *Rodostemonodaphne* (UTP-162), perteneciente a la familia Lauraceae, se detectaron alcaloides y flavonoides; adicionalmente, en el extracto *Vismia* (UTP-185), perteneciente a la familia Clusiaceae se encontraron flavonoides y por último en el extracto *Piper pesaresanum* (UT-148), perteneciente a la familia Piperaceae se encontraron alcaloides, flavonoides, fenoles y taninos. A estos fitocompuestos, presentes en los extractos activos se les puede atribuir la acción inhibitoria contra la SN.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

4.2 ANÁLISIS DE RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA DE LOS EXTRACTOS POR MEDIO DEL CRECIMIENTO RADIAL DEL MICELIO DEL HONGO *M. fijiensis* MORELET

Luego de haber realizado los procedimientos representados en las figuras 17 y 18 de la parte experimental, se realizaron tres ensayos cada uno por duplicado y se analizaron los resultados por medio del método de Kruskal Wallis, mencionado en la sección 3.8.2, de la sección experimental. Los resultados se muestran a continuación.

- Extractos metanólicos del UTP-141 al UTP-163

I Repetición

Tabla 8. Resultados de Kruskal Wallis para la primera repetición de extractos UTP metanólicos a 1000 mg/L para la medición del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*.

Trat.	Ranks																				
148,00	26,00	A																			
160,00	26,00	A																			
159,00	76,80	A																			
146,00	112,30		B	C																	
145,00	112,93		B	C																	
147,00	121,93		B	C																	
153,00	125,37		B	C	D																
155,00	127,90		B	C	D																
149,00	134,30		B	C	D																
144,00	139,60		B	C	D	E															
154,00	154,23			C	D	E															
156,00	178,00			C	D	E	F														
150,00	188,77			C	D	E	F	G													
143,00	198,17				D	E	F	G													
152,00	205,90				D	E	F	G													
158,00	207,47				D	E	F	G													
151,00	209,85				D	E	F	G	H												
142,00	213,40				E	F	G	H	I												
162,00	241,27					F	G	H	I												
161,00	252,57					F	G	H	I	J											
141,00	260,20						G	H	I	J											
163,00	288,20							H	I	J											
101,00	303,46								I	J											
157,00	331,10									J											

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

II Repetición

Tabla 9. Resultados de Kruskal Wallis para la segunda repetición de extractos UTP-141 al UTP-163 metanólicos a 1000 mg/L para la medición del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*.

Trat.	Ranks										
148,00	20,50	A									
160,00	20,50	A									
153,00	114,97		B	C							
155,00	132,17		B	C	D						
150,00	138,63		B	C	D	E					
142,00	141,75		B	C	D	E	F				
147,00	143,73		B	C	D	E	F				
157,00	182,17			C	D	E	F	G			
145,00	215,53				D	E	F	G	H		
162,00	226,55					E	F	G	H	I	
141,00	232,23						F	G	H	I	
152,00	233,60							G	H	I	
154,00	240,67							G	H	I	
159,00	243,50							G	H	I	
144,00	245,00							G	H	I	
151,00	256,93							G	H	I	
158,00	259,00							G	H	I	
149,00	261,03							G	H	I	
163,00	262,67							G	H	I	
143,00	270,63								H	I	
102,00	270,73								H	I	
146,00	279,67								H	I	J
156,00	307,83									I	J
161,00	357,33										J

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

- Extractos metanólicos del UTP-164 al UTP-175

I Repetición

Tabla 10. Resultados de Kruskal Wallis para la primera repetición de extractos UTP metanólicos a 1000 mg/L para la medición de crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*.

Trat.	Ranks										
171,00	13,87	A									
173,00	37,07	A	B								
164,00	59,07		B	C							
170,00	68,30		B	C	D						
166,00	88,63			C	D	E					
168,00	96,17			C	D	E					
172,00	97,00			C	D	E					
167,00	107,60				D	E	F				
165,00	125,70					E	F	G			
175,00	143,60						F	G			
101,00	147,10							G			
174,00	163,37							G	H		
169,00	200,10								H		

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

II Repetición

Tabla 11. Resultados de Kruskal Wallis para la segunda repetición de extractos UTP metanólicos a 1000 mg/L para la medición de crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*.

Trat.	Ranks							
173,00	25,00	A						
171,00	30,37	A						
170,00	65,67	A	B					
172,00	66,79	A	B	C				
164,00	81,60		B	C	D			
169,00	101,70		B	C	D	E		
168,00	104,87		B	C	D	E		
167,00	112,09			C	D	E	F	
165,00	124,95				D	E	F	
174,00	129,77					E	F	
166,00	129,90					E	F	
102,00	144,34						F	G
175,00	174,17							G

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)

- Extractos metanólicos del UTP-176 al UTP-187

I Repetición

Tabla 12. Resultados de Kruskal Wallis para la primera repetición de extractos UTP-176 al UTP-187 metanólicos a 1000 mg/L mediante la medición de crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*.

Trat.	Ranks					
181,00	21,85	A				
177,00	33,27	A				
182,00	46,10	A	B			
185,00	52,57	A	B			
180,00	60,20	A	B			
184,00	79,97		B	C		
183,00	111,03			C	D	
187,00	130,13				D	
179,00	139,43				D	E
186,00	144,43				D	E
104,00	144,56				D	E
176,00	155,95				D	E
178,00	175,83					E

Letras distintas indican diferencias significativas (p<= 0,05)



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

II Repetición

Tabla 13. Resultados de Kruskal Wallis para la segunda repetición de extractos UTP-176 al UTP-187 metanólicos a 1000 mg/L mediante la medición de crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*.

Trat.	Ranks			
182,00	15,53	A		
180,00	50,77	A	B	
185,00	50,87	A	B	
177,00	57,57		B	
184,00	60,37		B	
181,00	71,33		B	C
179,00	108,17			C D
187,00	109,47			D
183,00	110,67			D
186,00	140,83			D E
104,00	144,56			D E
178,00	153,57			E
176,00	156,87			E

Letras distintas indican diferencias significativas ($p < 0,05$)

Con base a los datos obtenidos por el método de Kruskal Wallis; se llegó a los siguientes resultados:

- Extractos metanólicos del UTP-141 al UTP-163: según los resultados publicados en las tablas 8 y 9 del análisis estadístico, se puede observar que para ambas repeticiones, los extractos metanólicos *Piper pesaresanum* (UTP-148) y *Topobea cf discolor* (UTP-160), tuvieron excelente comportamiento contra el hongo, debido a que no se registró crecimiento del mismo (medias y medianas = 0.0), y tuvieron un efecto inhibitorio similar al control positivo (BENLATE 1mg/L) utilizado para los ensayos.
- Extractos metanólicos del UTP-164 al UTP-175: de acuerdo a las tablas 10 y 11, se pudo deducir que los extractos metanólicos *Browalia speciosa* (UTP-171) y *Solanum ovalifolium* (UTP-173), fueron los que presentaron las medias más pequeñas; es decir, el diámetro de las colonias del hongo,



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

medido al día 20, fueron más pequeños en comparación a los diámetros medidos para los otros extractos. Sin embargo, se puede considerar, que aunque el crecimiento fue menor, el hongo no fue inhibido completamente por los extractos UTP-171 y UTP- 173 (Porcentajes de inhibición UTP-171: 47%, UTP-173: 36.1%, según el anexo 8)

- Extractos metanólicos del UTP-176 al UTP-187: en este ensayo se puede determinar según la tabla 12 y 13, que los extractos más activos frente al ciclo de reproducción asexual de hongo fueron UTP-177, UTP-180, UTP-181 y UTP-182. Sin embargo el hongo presentó crecimiento.

Al comparar los extractos activos frente al crecimiento radial del micelio, se concluye que los extractos *Piper pesaresanum* (UTP-148) y *Topobea cf discolor* (UTP-160), fueron los extractos más potentes puesto que en ambas repeticiones, el hongo no se presentó crecimiento y tuvieron el mismo comportamiento que el control positivo (BENLATE 1 mg/L).



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

5. DISCUSIÓN

En los últimos años, la sociedad mundial ha priorizado los aspectos ambientales, conduciendo muchas investigaciones hacia el descubrimiento de nuevos agentes bioactivos que puedan ser empleados en el manejo de enfermedades que amenazan constantemente los cultivos, con menos efectos negativos al ambiente (Bowers, 2000).

Gracias a los resultados obtenidos durante este trabajo, tanto para el ensayo de la medición de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas, como para la medición del crecimiento radial del micelio, se pudo descubrir que los extractos vegetales, recolectados en el Parque Regional Natural Ucumarí (Risaralda, Colombia) que presentaron actividad antifúngica contra el *M. fijiensis* fueron:

Tabla 14. Plantas activas contra *M. fijiensis*.

PLANTA	UTP	FAMILIA
<i>Piper pesaresanum</i>	148	Piperaceae
<i>Clusia multiflora</i>	157	Clusiaceae
<i>Topobea cf discolor</i>	160	Melastomataceae
<i>Rodostemonodaphne</i>	162	Lauraceae
<i>Vismia</i>	185	Clusiaceae

De igual forma, se pudo observar con base a la literatura y a ensayos realizados contra este patógeno, que de estas plantas, no se ha reportado ninguna actividad biológica contra el agente causal de la Sigatoka negra, *M fijiensis*.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

6. CONCLUSIONES

- Se evaluó la actividad antifúngica *in vitro* de los 47 extractos metanólicos a 1000mg/L; a través de los métodos de medición de la longitud del tubo germinativo de las ascosporas y del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*.
- Al analizar estadísticamente los resultados de la medición de la elongación del tubo germinativo de las ascosporas, se concluyó que los extractos activos contra la Sigatoka Negra fueron: *Clusia multiflora* (UTP-157) y *Rodostemonodaphne* (UTP-162), produciendo una germinación corta en el tubo germinativo; El extracto *Vismia* (UTP-185) con germinación deforme; y por último el extracto *Piper pesaresanum* (UTP-148), el cual no produjo germinación sobre las ascosporas.
- Para el análisis del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*, se concluyó que los extractos *Piper pesaresanum* (UTP-148) y *Topobea cf discolor* (UTP-160), causaron un efecto potente de inhibición, ya que no permitieron el crecimiento del hongo y tuvieron un comportamiento similar al fungicida BENLATE (1 mg/L), utilizado para el control de la enfermedad y como control positivo en los bioensayos.
- Al comparar los resultados de todos los bioensayos, se pudo concluir que el extracto *Piper pesaresanum* (UTP-148), perteneciente a la familia Piperaceae, es un extracto potente contra el agente causal de la SN, ya que inhibió la fase sexual del hongo, permitiendo que las ascosporas no germinaran; y logrando inhibición total frente al crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis*. Según la marcha fitoquímica, en este extracto, hay presencia de alcaloides, flavonoides, fenoles y taninos.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

BIBLIOGRAFÍA

Amorim, A.C.L.; Cardoso, M. das G.; Pinto, J.E.B.P.; de Souza, P.E.; Filho, N.D. (2004). Fungitoxic activity evaluation of the hexane and methanol extracts of copaiba plant leaves *Copaifera langsdorffi* Desfon. Ciencia e Agrotecnologia 28: 316-324.

Bowers, J.H. y J.C.Locke. (2000). Effect of botanical extracts on the populations density of *Fusarium oxysporum* in soil and control of fusarium wilt in greenhouse. Plant. Dis. 84: 300-305.

Burt, P.J.A., Rutter, J., González, H. (1997). Short distance windborne dispersal of the fungal pathogens causing sigatoka diseases in banana and plantain. Plant pathology 46: 451-458.

Bustamante, R.E. (1982). Sigatoka negra. ICA-Infoma (Colombia); 16: 14-18.

CORPORACIÓN AUTÓNOMA REGIONAL DE RISARALDA, CARDER. (2001). Concepto sobre el caso de la contaminación atmosférica en el sector urbano de Pereira: Informe presentado al Departamento de Investigación y Planeamiento de la Alcaldía de Pereira. [documento mimeo]. 17.

Covaleda, H. (2006). La Cadena de Plátano en Colombia. Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural. Observatorio Agro cadenas Colombia. Bogotá D.C. Documento de trabajo N° 1002.

Craenen, K. (1998). Black Sigatoka disease of banana and plaitain. A referente manual. IITA Ibadan, Nigeria.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Chica, R., Herrera, M., Jiménez, I., Lizcano, S., Montoya, J.A., y Patiño, L.F. (2004). Impacto y manejo de la Sigatoka Negra en el cultivo del banano de exportación en Colombia. Memorias XVI Reunión Internacional Asociación para la Cooperación en Investigaciones de Bananos en el Caribe y la América Latina (ACORBAT), Oaxaca, México. Sep 26-oct 01 de 2004. ACORBAT, Oaxaca, México. 53-62.

Douglas, M., Ronald, R. (1992). El combate de la sigatoka negra. Boletín N° 4. Departamento de investigaciones. CORBANA. 22

Du Pont. (1980). A renewed challenge: Black and Yellow Sigatoka. Florida, EUA.

Fullerton, R.A. (1994). Sigatoka leaf disease in compendium of tropical fruit disease.(Ploetz R. C et al., eds). The American phytopathological society, st. Paul, Minnesota. 12-14.

Fullerton, R.A., y Stover, R.H. (1990). Sigatoka leaf spot diseases of bananas: Proceedings of an international workshop. INIBAP. San José, Costa Rica. 374.

Font Quer, P. (1993). *Diccionario de Botánica*. Ed. Labor, S. A., Barcelona.

González, L.C. (1975). Introducción a la fitopatología. San José, costa Rica, IICA. 148.

García H. (1992). Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica 1ª Edición. Tercer Mundo editores. 353.

García H. (1992). Flora Medicinal de Colombia. Botánica Médica 2ª Edición. Tercer Mundo editores. 463.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

González, R., Bustamante, E. (1995). Selección de microorganismos quitinolíticos en el control de la Sigatoka negra (*Mycosphaerella fijiensis*) en banano. Revista de Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica) N°. 40: 6-11.

González, W. (1980). Enfermedades del follaje en el banano. Dpto. de Investigación de BANDECO, S.A. 9.

Hernández, A., Bernal, R. (2000). Lista de Especies de *Passifloraceae* de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia. Bogotá D.C. - Colombia. 320-335.

Jácome, L. (1998). Sigatoka negra. La situación en América Latina y el Caribe. *In* memorias primer simposio internacional sobre sigatoka negra (M. M Robles et al, compil). Manzanillo, colima, México. 8-10 de Junio 1998. Sagar; INIBAP; Universidad de Colima; IICA. 18-23.

Jacome, L., Lepoivre P., Marin D., Ortiz R., Romero R., Escalant J.V. (2002) *Mycosphaerella* leaf spot diseases of bananas: present status and outlook. Costa Rica. 21-22

Leach, R. (1964). Report on investigations into the cause and control the new banana disease in fiji, black leaf streak. Leg. Coun. Fiji. Coun. 20

Marin, D; Romero, R. (1992). El combate de la sigatoka negra. Boletin 4. Corporafcion bananera nacional. Departamento de investigaciones, san jose de Costa Rica.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Martinez, A. (1998). El cultivo de plátano en los llanos orientales. Corporación Colombiana de Investigación Agropecuaria (CAPROICA). Meta, Villavicencio. Manual Instruccional N° 01.

McMahon, P. y Purwantara, A. (2004). Diversity and management of cocoa in Asia: Phytophthora on cocoa. In Diversity and Management of Phytophthora in Southeast Asia. Drenth, A.; Guest, D.I. (Editors). Australian Centre for International Agricultural Research (ACIAR). Monograph, 114. Canberra, AU. 104-115.

Ministerio de Agricultura, (2002). Acuerdo de Competitividad de la Cadena Productiva del Plátano en Colombia., ASOHOFrucol. Bogotá.

Mourichon, X., Fullerton, R.A. (1990). Geographical distribution of the two species *Mycosphaerella musicola*. Leach (*cercospora musae*) and *Mycosphaerella fijiensis* (*cercospora fijiensis*), respective agents of sigatoka disease in banana and plantains, fruits. 45: 213-218.

Mourichon, X., Carlier, J., Fouré, E. (1997). SIGATOKA LEAF SPOT DISEASES. In collaboration with the PROMUSA Sigatoka Working Group 1. *Musa* Disease Fact Sheet N° 8.

Nee, M. (1999). Synopsis of *Solanum* in the New World. In M. Nee, D. E. Symon, R. N. Lester & J. P. Jessop (eds.), *Solanaceae IV: Advances in Biology and Utilization*. Royal Botanic Gardens, Kew. 285-333.

Orozco Santos, M. (1998). Manejo integrado de la sigatoka negra del plátano. SAGAR, INIFAP, CIPAC. Campo experimental tecomán, Colima, México. Folleto técnico N° 1 División Agrícola 95.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Ribeiro, L.F., Bendendo, I.P. (1999). Efeito inibitório de extratos vegetais sobre *Colletotrichum gloeosporioides* - agente causal da podridão de frutos de mamoeiro. *Scientia Agricola* 56: 1267-1271.

Rodes. A. (1964). A new disease in fiji. *Commonwealth phytopathological news (kew)* 10: 30-41.

Sanabria, G.A. (1983). Análisis fitoquímico preliminar: Metodología y su aplicación en la evaluación de 40 plantas de la familia Compositae. Trabajo de investigación. Universidad Nacional de Colombia. Facultad de ciencias. Departamento de Farmacia. Santa Fe de Bogotá.

Stearn, W.T. (1980). *Botanical Latin: History, grammar, Syntax, Terminology, and Vocabulary*. David & Charles Newton Abbot, Londres.

Stahl, E. (1969). *Thin-layer chromatography*. 15^a impresión de la 2^a edición. Toppa Printing Co. Singapore. 1014.

Stover, R.H. (1971). *Banana, plantain and abaca diseases* commonwealth mycological institute, kew, Surrey, England 316

Stover, R.H. (1972). *Banana, Plantain and Abaca Diseases*. Commonwealth Mycological Institute, Kew.

Stover, R.H. (1976). Distribution and cultural characteristic of the pathogens causing banana leaf spot. *Tropical agriculture (Trinidad)* 53: 11-114.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Stover, R.H. y Simmonds, N.W. (1987). *Banana*. 3^a ed. Jhon Willey and Sons, inc. New York. 468.

Stover, R. H. y Simmonds, N. W. (1987) *Bananas* 3^a ed. Longman Scientific & Technical, Harlow U.K.

Stover, R.H. (1980). Sigatoka leaf spot of bananas and plantains. *Plant Disease* 64: 750-755.

Taylor, C. M. y D. H. Lorence. (2001). *Rubiacearum Americanarum Magna Hama Pars II. New and newly circumstribed taxa of Guettarda (Guettardeae)*. *Novon* 11: 127-134.

Vargas, R. (2000). *Corbana S.A. y su plan estratégico de investigaciones*. Corbana 26: 75-80.

Wagner H, Blatt S. (1996). *Plant drug analysis*. Springer, Berlin. 384.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

ANEXOS

Anexo 1. Familias de plantas recolectadas en la zona Otún-Quimbaya y en el Parque Regional Natural Ucumari (PRNU).

No. FJR	No. UTP	Familia	Nombre
3988	141	PASSIFLORACEAE	<i>Passiflora apoda</i>
3989	142	URTICACEAE	<i>Boehmeria bullata</i>
3990	143	URTICACEAE	<i>Phenax uliginosus</i>
3991	144	RANUNCULACEAE	<i>Thalictrum podocarpum</i>
3992	145	SOLANACEAE	<i>Dunalia solanacea</i>
3993	146	SOLANACEAE	<i>Lycianthes radiata</i>
3995	147	RUBIACEAE	<i>Palicourea petioaris</i>
3996	148	PIPERACEAE	<i>Piper pesaresanum</i>
3997	149	RUBIACEAE	<i>Indet</i>
3998	150	URTICACEAE	<i>Urera ballotaefolia</i>
3999	151	ASCLEPIADACEAE	<i>Blepharodon bifidus</i>
4000	152	PASSIFLORACEAE	<i>Passiflora antioquiensis</i>
4001	153	APIACEAE	<i>Arracacia elata</i>
4002	154	PIPERACEAE	<i>Peperomia acuminata</i>
4003	155	CLUSIACEAE	<i>Clusia sp</i>
4004	156	RANUNCULACEAE	<i>Clematis haenkeana</i>
4005	157	CLUSIACEAE	<i>Clusia multiflora</i>
4006	158	PIPERACEAE	<i>Piper eriopodon</i>
4007	159	CLUSIACEAE	<i>Tovomita guianensis</i>
4008	160	MELASTOMATACEAE	<i>Topobea cf discolor</i>
4009	161	SOLANACEAE	<i>Solanum sp</i>
4010	162	LAURACEAE	<i>Rodostemonodaphne</i>
4011	163	PIPERACEAE	<i>Piper umbellatum</i>
4012	164	SOLANACEAE	<i>Solandra coriacea</i>
4013	165	SOLANACEAE	<i>Witheringia coccoloboides</i>
4014	166	MORACEAE	<i>Ficus andicola</i>
4015	167	PIPERACEAE	<i>Piper crassinervium</i>



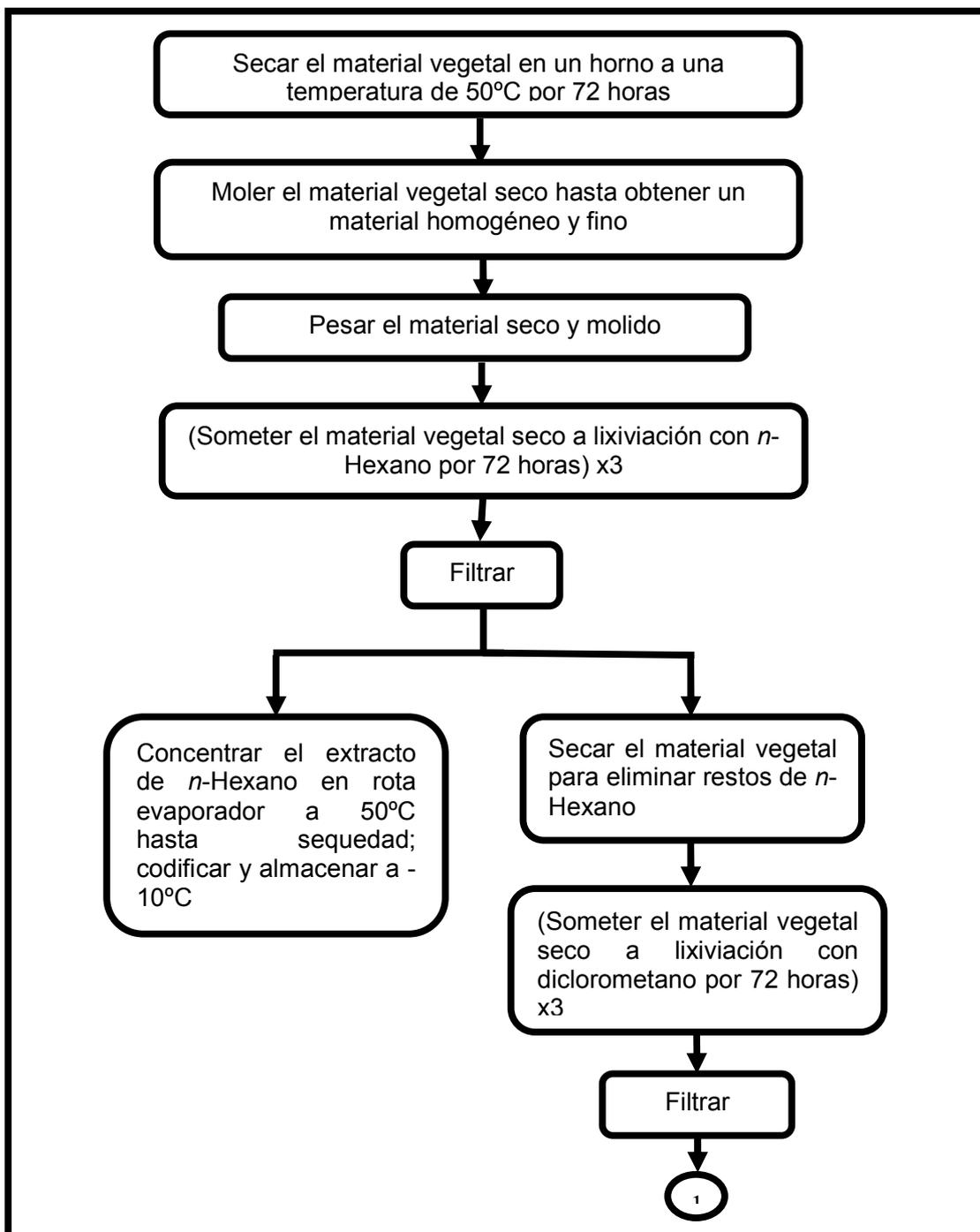
GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

4016	168	SOLANACEAE	<i>Cestrum humboldtii</i>
4016	169	RUBIACEAE	<i>Guettarda crispiflora</i>
4018	170	SOLANACEAE	<i>Deprea aff sachapapa</i>
4019	171	SOLANACEAE	<i>Browallia speciosa</i>
4020	172	PIPERACEAE	<i>Piper glanduligerum</i>
4021	173	SOLANACEAE	<i>Solanum ovalifolium</i>
4022	174	SOLANACEAE	<i>Solanum brevifolium</i>
4029	175	COSTACEAE	<i>Costus</i>
4030	176	PIPERACEAE	<i>Piper</i>
4031	177	LAURACEAE	<i>Lauracea 1</i>
4032	178	LAURACEAE	<i>Lauracea 2</i>
4033	179	LAURACEAE	<i>Lauracea 3</i>
4034	180	LAURACEAE	<i>Lauracea 4</i>
4035	181	CLUSIACEAE	<i>Clusiacea</i>
4036	182	MALVACEAE	<i>Pavonia</i>
4037	183	PASSIFLORACEAE	<i>Passiflora 1</i>
4038	184	PASSIFLORACEAE	<i>Passiflora 2</i>
4039	185	CLUSIACEAE	<i>Vismia</i>
4040	186	MELASTOMATACEAE	<i>Tibouchina</i>
4041	187	LAMIACEAE	<i>Salvia</i>



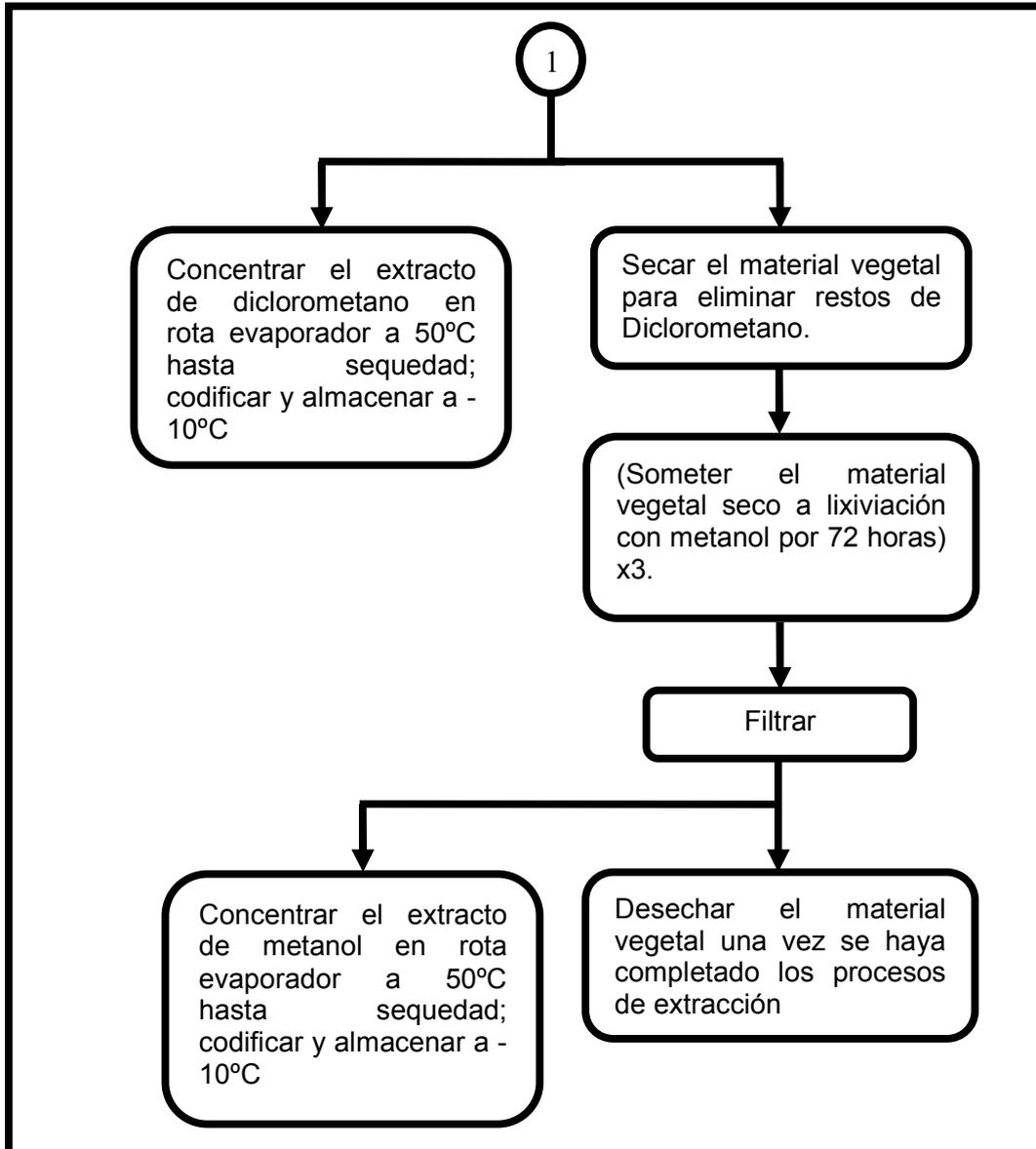
GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Anexo 2. Metodología para la obtención de los extractos vegetales para realizar los bioensayos.





GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP





GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Anexo 3. Resultados de la Marcha fitoquímica para los extractos UTP metanólicos.

PRUEBA			
PLANTA UTP No.	DRAGENDORFF	Anisaldehído/CH ₃ COOH-H ₂ SO ₄	Vainillina al 1% en EtOH-H ₂ SO ₄
	Alcaloides Ext. MeOH	Terpenos, triterpenos y esteroides Ext. MeOH	Saponinas esteroidales y triterpénicas Ext. MeOH
141	-	-	-
142	-	-	-
143	-	-	-
144	+++	-	-
145	++	-	-
146	+++	-	-
147	++	-	-
148	+++	-	-
149	-	-	-
150	-	+++	+++
151	-	-	-
152	+++	++	++
153	++	-	-
154	++	+++	+++
155	-	-	-
156	-	+++	+++
157	-	-	-
158	++	-	-
159	-	-	-
160	-	-	-
161	+++	++	++



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

162	++	-	-
163	-	-	-
164	-	-	-
165	++	-	-
166	-	-	-
167	-	++	++
168	++	-	-
169	-	-	-
170	++	-	-
171	-	+++	+++
172	++	-	-
173	-	-	-
174	++	-	-
175	++	-	-
176	-	-	-
177	-	-	-
178	-	-	-
179	+++	-	-
180	-	-	-
181	-	-	-
182	++	-	-
183	-	++	++
184	-	-	-
185	-	-	-
186	-	-	-
187	+++	-	-
Control (+): Licorina y escopolamina [5000]ppm		Control (+): Lanosterol, estigmasterol y diosgenina	Control (+): Patron mimakiano [5000]ppm



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

		[5000]ppm	PRUEBA		
PLANTA No.	FeCl ₃ al 5% en HCl 0,5N		AlCl ₃ al 1% en EtOH absoluto		CTA
	Fenoles y Taninos Ext. MeOH		Flavonoides Ext. MeOH		Sesquiterpenlactonas y cardenolidos Ext. MeOH
	141	-	+		
142	-	-			-
143	-	-			-
144	+	+++			+++
145	+	+			+
146	+	-			-
147	-	++			+++
148	++	+			-
149	+++	-			-
150	-	-			+
151	-	-			-
152	++	+++			-
153	-	+			++
154	+	++			-
155	++	++			++
156	-	-			-
157	++	++			-
158	-	-			-
159	+++	+++			-
160	+++	-			-
161	-	+			-
162	-	++			-



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

163	-	-	-	-	-
164	-	+	+	+	++
165	+	+	+	+	-
166	-	-	-	-	-
167	+++	++	++	++	-
168	-	-	-	-	+
169	-	-	-	-	-
170	+	-	-	-	-
171	-	-	-	-	+
172	-	+	+	+	++
173	-	-	-	-	++
174	-	-	-	-	-
175	++	+++	+++	+++	-
176	-	-	-	-	-
177	++	-	-	-	-
178	+	++	++	++	-
179	-	-	-	-	-
180	++	+++	+++	+++	++
181	-	-	-	-	-
182	++	++	++	++	++
183	-	-	-	-	+
184	-	+	+	+	-
185	-	+	+	+	-
186	-	++	++	++	-
187	-	-	-	-	-
Control (+): Catecol [5000]ppm	Control (+): Extracto San Joaquin y extracto de Ruda		Control (+): Digoxina [2000]ppm		
	(+) Presencia del núcleo		(-) Ausencia del núcleo		



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Anexo 4. Conteo de ascosporas de extractos UTP metanólicos a 1000 mg/L para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas.

EXTRACTO	ENSAYO 1				ENSAYO 2				
	N	C	D	NG	N	C	D	NG	
141	0	134	16	0	0	0	118	32	0
142	128	19	3	0	0	125	16	9	0
143	92	40	10	0	0	106	37	7	0
144	0	34	116	0	0	0	37	113	0
145	108	42	0	0	0	66	84	0	0
146	99	51	0	0	0	69	79	0	2
147	25	119	6	0	0	38	112	0	0
148	0	0	6	144	0	0	0	5	145
149	4	146	0	0	0	6	144	0	0
150	114	36	0	0	0	120	13	17	0
151	141	9	0	0	0	135	15	0	0
152	4	137	9	0	0	1	139	10	0
153	0	125	16,7	0	0	0	119	31	0
154	22	125	2	0	0	5	144	1	0
155	4	142	4	0	0	3	147	0	0
156	70	77	3	0	0	71	79	0	0
157	11	139	0	0	0	0	100	0	0
158	0	62	0	88	0	0	136	0	14
159	16	134	0	0	0	0	100	0	0
160	6	144	0	0	0	5	145	0	0
161	0	143	7	0	0	19	131	0	0
162	6	143	3	0	0	14	136	0	0
163	142	7	1	0	0	138	12	0	0
164	136	14	0	0	0	134	16	0	0
165	123	27	0	0	0	132	18	0	0
166	84	0	66	0	0	91	0	59	0
167	129	20	1	0	0	126	24	0	0
168	34	116	0	0	0	38	112	0	0
169	0	31	119	0	0	0	54	96	0



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

170	130	20	0	0	116	34	0	0
171	91	50	9	0	82	56	12	0
172	92	58	0	0	86	64	0	0
173	63	44	43	0	62	41	47	0
174	118	8	24	0	128	12	10	0
175	95	55	0	0	115	35	0	0
176	126	24	0	0	129	21	0	0
177	116	28	6	0	125	17	8	0
178	0	116	34	0	0	120	30	0
179	67	67	16	0	100	44	6	0
180	0	124	26	0	0	126	24	0
181	60	35	55	0	59	51	40	0
182	101	49	0	0	96	54	0	0
183	84	0	66	0	92	0	59	0
184	115	33	2	0	121	29	0	0
185	0	39	111	0	0	42	108	0
186	120	21	9	0	117	22	11	0
187	126	18	6	0	132	11	7	0
control (-)	147	3	0	0	148	2	0	0
control (+)	0	0	150	0	0	0	150	0

- **GN:** GERMINACIÓN NORMAL
- **GC:** GERMINACIÓN CORTA
- **GD:** GERMINACIÓN DEFORME
- **NG:** NO GERMINADO
- **CONTROL NEGATIVO:** EtOH-H₂O (2:3)
- **CONTROL POSITIVO:** BENLATE 1 mg/L.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Anexo 5. Promedios de los conteos para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas con extractos UTP a 1000 mg/L.

Nº Extracto	GN	GC	GD	NG
141	0	84	16	0
142	84,3	11,7	4	0
143	65,95	28,35	5,7	0
144	0	23,7	76,3	0
145	58	42	0	0
146	56	43,35	0	0,65
147	21	76,95	2	0
148	0	0	3,65	96,35
149	3,35	96,65	0	0
150	78	16,35	5,65	0
151	92	8	0	0
152	1,7	92,3	6,3	0
153	0	81,3	16,7	0
154	9	89,65	1,35	0
155	2,325	96,35	1,325	0
156	47	52	1	0
157	3,65	96,35	0	0
158	0	66	0	34
159	5,35	94,65	0	0
160	3,65	96,35	0	0
161	6,35	91,3	2,35	0
162	6	93	1	0
163	93,3	6,35	0,35	0
164	90	10	0	0
165	85	15	0	0
166	58,35	0	41,65	0
167	85	14,65	0,35	0
169	0	28,35	71,65	0
170	82	18	0	0
171	57,7	35,3	7	0
172	59,3	40,7	0	0
173	41,65	28,3	30	0
174	82	6,65	11	0



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

175	70	30	0	0
176	85	15	0	0
177	80,3	15	4,65	0
178	0	78,65	21,35	0
179	55,7	37	7,35	0
180	0	83,35	16,65	0
181	39,65	30,35	31,7	0
182	65,65	34,35	0	0
183	58,35	0	41,65	0
184	78,7	20,65	0,65	0
185	0	27	73	0
186	79	14,35	6,65	0
187	86	9,65	4,35	0
Control (-)	95,35	2,35	1,35	1
Control (+)	0	0	100	0

- **GN:** GERMINACIÓN NORMAL
- **GC:** GERMINACIÓN CORTA
- **GD:** GERMINACIÓN DEFORME
- **NG:** NO GERMINADO
- **CONTROL NEGATIVO:** EtOH-H₂O (2:3)
- **CONTROL POSITIVO:** BENLATE 1 mg/L.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Anexo 6. . Promedios de los conteos para la medición de la elongación del tubo germinativo de ascosporas con extractos UTP a 500 mg/L.

ENSAYO	GN	GC	GD	NG
141	130	11	3.5	0
144	129	21	0	0
147	121.5	12	16.5	0
148	0	0	13.5	136.5
149	99	40	11	0
152	91	47	12	0
153	58.5	78.5	13	0
154	124.5	11.5	14	0
155	99.5	1.5	49	0
157	46.5	88.5	0	15
158	77.5	72.5	0	0
159	126	24	2.5	0
160	89.5	60.5	0	0
161	89.65	10.35	0	0
162	16	115.5	18.5	0
168	11.5	35	3.5	0
169	78	0	72	0
178	124	19.5	6.5	0
181	113	37	0	0
185	0	37	113	0
control (-)	135	14.5	0	0
control (+)	0	0	100	0

- **GN:** GERMINACIÓN NORMAL
- **GC:** GERMINACIÓN CORTA
- **GD:** GERMINACIÓN DEFORME
- **NG:** NO GERMINADO
- **CONTROL NEGATIVO:** EtOH-H₂O (2:3)
- **CONTROL POSITIVO:** BENLATE 1 mg/L.



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Anexo 7. Diámetros del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis* para extractos metanólicos del UTP 141 al UTP 163 con concentración de 1000 mg/L.

ENSAYO	DIA	Variable	EXTRACTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
1,00	20,00	DIAMETRO	101,00	35	7,18	3,03	8,40	225,79	<0,0001
1,00	20,00	DIAMETRO	141,00	15	5,34	0,71	5,45		
1,00	20,00	DIAMETRO	142,00	15	4,78	1,14	5,20		
1,00	20,00	DIAMETRO	143,00	15	4,51	0,42	4,50		
1,00	20,00	DIAMETRO	144,00	15	3,94	0,48	4,05		
1,00	20,00	DIAMETRO	145,00	15	3,72	0,40	3,70		
1,00	20,00	DIAMETRO	146,00	15	2,74	2,05	3,80		
1,00	20,00	DIAMETRO	147,00	15	3,67	0,73	3,95		
1,00	20,00	DIAMETRO	148,00	15	0,00	0,00	0,00		
1,00	20,00	DIAMETRO	149,00	15	3,54	1,51	3,90		
1,00	20,00	DIAMETRO	150,00	11	4,49	1,02	4,80		
1,00	20,00	DIAMETRO	151,00	10	4,37	2,50	5,13		
1,00	20,00	DIAMETRO	152,00	15	4,42	1,32	4,70		
1,00	20,00	DIAMETRO	153,00	15	3,80	0,50	3,90		
1,00	20,00	DIAMETRO	154,00	15	4,09	0,75	3,85		
1,00	20,00	DIAMETRO	155,00	10	3,85	0,54	3,93		
1,00	20,00	DIAMETRO	156,00	15	4,31	0,53	4,25		
1,00	20,00	DIAMETRO	157,00	15	7,36	0,46	7,45		
1,00	20,00	DIAMETRO	158,00	15	4,59	0,66	4,80		
1,00	20,00	DIAMETRO	159,00	15	2,02	1,94	3,10		
1,00	20,00	DIAMETRO	160,00	15	0,00	0,00	0,00		
1,00	20,00	DIAMETRO	161,00	15	5,18	0,69	5,05		
1,00	20,00	DIAMETRO	162,00	15	5,05	0,67	4,80		
1,00	20,00	DIAMETRO	163,00	15	5,81	0,82	5,85		
ENSAYO	DIA	Variable	EXTRACTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
2,00	20,00	DIAMETRO	102,00	35	7,11	3,96	9,00	220,74	<0,0001
2,00	20,00	DIAMETRO	103,00	35	5,68	0,77	5,70		
2,00	20,00	DIAMETRO	141,00	15	8,06	0,61	8,15		
2,00	20,00	DIAMETRO	142,00	10	6,94	0,80	6,83		
2,00	20,00	DIAMETRO	143,00	15	8,40	0,73	8,45		
2,00	20,00	DIAMETRO	144,00	15	8,19	0,41	8,15		
2,00	20,00	DIAMETRO	145,00	15	7,90	1,03	7,75		
2,00	20,00	DIAMETRO	146,00	15	8,08	2,38	8,75		
2,00	20,00	DIAMETRO	147,00	15	6,96	0,85	7,15		
2,00	20,00	DIAMETRO	148,00	15	0,00	0,00	0,00		
2,00	20,00	DIAMETRO	149,00	15	8,35	0,69	8,20		
2,00	20,00	DIAMETRO	150,00	15	6,80	1,04	6,90		
2,00	20,00	DIAMETRO	151,00	15	8,25	0,65	8,40		
2,00	20,00	DIAMETRO	152,00	15	8,11	0,46	7,95		
2,00	20,00	DIAMETRO	153,00	15	6,41	0,97	6,45		
2,00	20,00	DIAMETRO	154,00	15	8,16	0,58	8,05		
2,00	20,00	DIAMETRO	155,00	15	6,86	0,62	7,05		
2,00	20,00	DIAMETRO	156,00	15	8,79	0,54	8,75		
2,00	20,00	DIAMETRO	157,00	15	6,77	2,27	6,80		
2,00	20,00	DIAMETRO	158,00	15	8,13	1,72	9,25		
2,00	20,00	DIAMETRO	159,00	15	8,13	0,73	8,20		
2,00	20,00	DIAMETRO	160,00	15	0,00	0,00	0,00		
2,00	20,00	DIAMETRO	161,00	15	9,46	0,74	9,55		
2,00	20,00	DIAMETRO	162,00	10	8,04	0,33	8,05		
2,00	20,00	DIAMETRO	163,00	15	7,90	2,33	8,55		



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Anexo 8. Diámetros del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis* para extractos metanólicos del UTP 164 al UTP 175 con concentración de 1000 mg/L.

ENSAYO	DIA	Variable	EXTRACTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
1,00	20,00	DIAMETRO	101,00	35	7,18	3,03	8,40	131,13	<0,0001
1,00	20,00	DIAMETRO	164,00	15	5,92	0,49	6,10		
1,00	20,00	DIAMETRO	165,00	15	7,23	0,79	7,10		
1,00	20,00	DIAMETRO	166,00	15	6,49	0,78	6,40		
1,00	20,00	DIAMETRO	167,00	15	6,77	0,50	6,80		
1,00	20,00	DIAMETRO	168,00	15	6,55	0,44	6,60		
1,00	20,00	DIAMETRO	169,00	10	9,45	0,55	9,25		
1,00	20,00	DIAMETRO	170,00	15	6,11	0,37	6,15		
1,00	20,00	DIAMETRO	171,00	15	4,47	0,21	4,45		
1,00	20,00	DIAMETRO	172,00	15	6,63	0,61	6,35		
1,00	20,00	DIAMETRO	173,00	15	5,37	0,59	5,40		
1,00	20,00	DIAMETRO	174,00	15	8,20	0,72	7,85		
1,00	20,00	DIAMETRO	175,00	15	7,83	1,26	8,20		
ENSAYO	DIA	Variable	EXTRACTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
2,00	20,00	DIAMETRO	102,00	35	7,11	3,96	9,00	107,90	<0,0001
2,00	20,00	DIAMETRO	164,00	15	6,47	0,56	6,35		
2,00	20,00	DIAMETRO	165,00	10	7,46	1,16	7,45		
2,00	20,00	DIAMETRO	166,00	15	7,38	0,34	7,40		
2,00	20,00	DIAMETRO	167,00	11	6,64	2,28	7,10		
2,00	20,00	DIAMETRO	168,00	15	6,92	0,82	6,85		
2,00	20,00	DIAMETRO	169,00	15	6,85	0,37	6,85		
2,00	20,00	DIAMETRO	170,00	15	6,01	0,58	5,95		
2,00	20,00	DIAMETRO	171,00	15	4,58	0,26	4,50		
2,00	20,00	DIAMETRO	172,00	14	5,83	1,27	6,20		
2,00	20,00	DIAMETRO	173,00	15	4,42	0,29	4,40		
2,00	20,00	DIAMETRO	174,00	15	7,48	0,92	7,50		
2,00	20,00	DIAMETRO	175,00	15	8,74	0,65	8,85		



GRUPO BIOTECNOLOGÍA - PRODUCTOS NATURALES UTP

Anexo 9. Diámetros del crecimiento radial del micelio de *M. fijiensis* para extractos metanólicos del UTP 176 al UTP 187 con concentración de 1000 mg/L.

ENSAYO	DIA	Variable	EXTRACTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
1,00	20,00	DIAMETRO	104,00	40	7,61	0,83	7,68	133,79	<0,0001
1,00	20,00	DIAMETRO	176,00	10	7,78	0,41	7,78		
1,00	20,00	DIAMETRO	177,00	15	5,75	0,45	5,75		
1,00	20,00	DIAMETRO	178,00	15	8,21	0,61	8,05		
1,00	20,00	DIAMETRO	179,00	15	7,54	0,52	7,50		
1,00	20,00	DIAMETRO	180,00	15	6,22	0,63	5,95		
1,00	20,00	DIAMETRO	181,00	10	5,53	0,41	5,60		
1,00	20,00	DIAMETRO	182,00	15	5,95	0,48	6,00		
1,00	20,00	DIAMETRO	183,00	15	7,08	0,66	7,10		
1,00	20,00	DIAMETRO	184,00	15	6,53	0,57	6,40		
1,00	20,00	DIAMETRO	185,00	15	6,05	0,71	6,10		
1,00	20,00	DIAMETRO	186,00	15	7,59	0,44	7,50		
1,00	20,00	DIAMETRO	187,00	15	7,40	0,78	7,15		
ENSAYO	DIA	Variable	EXTRACTO	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
2,00	20,00	DIAMETRO	176,00	15	8,21	0,65	8,05	127,75	<0,0001
2,00	20,00	DIAMETRO	177,00	15	6,14	0,54	6,10		
2,00	20,00	DIAMETRO	178,00	15	8,16	0,75	8,10		
2,00	20,00	DIAMETRO	179,00	15	6,99	0,82	7,10		
2,00	20,00	DIAMETRO	180,00	15	6,04	0,59	5,80		
2,00	20,00	DIAMETRO	181,00	15	6,34	0,33	6,40		
2,00	20,00	DIAMETRO	182,00	15	4,96	0,65	4,85		
2,00	20,00	DIAMETRO	183,00	15	7,05	0,44	6,93		
2,00	20,00	DIAMETRO	184,00	15	6,17	0,65	6,05		
2,00	20,00	DIAMETRO	185,00	15	5,97	0,66	6,00		
2,00	20,00	DIAMETRO	186,00	15	7,78	0,66	7,60		
2,00	20,00	DIAMETRO	187,00	15	7,04	0,64	6,90		