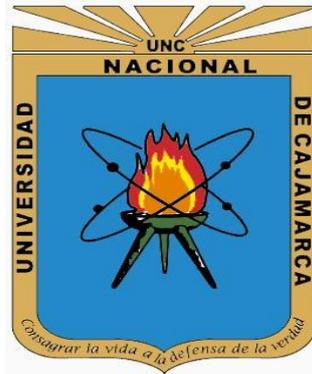


UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**PROPIEDADES ANTAGÓNICAS DE DILUCIONES DE
KOMBUCHA CONTRA *Sclerotium cepivorum* Berk.**

TESIS

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE
INGENIERO AGRÓNOMO**

PRESENTADO POR EL BACHILLER:

MIGUEL FERNANDO TORRES ROJAS

ASESOR:

Dr. Manuel Salomón Roncal Ordóñez.

CAJAMARCA – PERÚ

2016

*[Though nothing,
will keep us together
We could steal time,
just for one day
We can be Heroes,
for ever and ever
What d'you say?]*

*David Bowie.
"Heroes".*

AGRADECIMIENTO

A Rosa, Ricardo, Ceci, Jhampi y Bry. Por su amor,
por emocionarme y por demostrarme cada día
que todo el esfuerzo merece la pena. Siempre.

Al Dr. Manuel Salomón Roncal Ordóñez, por sus enseñanzas
e incansable dedicación, por su confianza y amistad.

ÍNDICE

Contenido	Página
AGRADECIMIENTO	ii
ÍNDICE	iii
Lista de tablas.....	v
Lista de figuras.	vi
Resumen	viii
Abstract	ix
CAPITULO I. INTRODUCCION	1
1.1. Objetivo.....	2
CAPITULO II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1. Generalidades sobre la Kombucha	3
2.2. Utilidad de la Kombucha	3
2.3. Géneros de levaduras presentes en Kombucha.....	4
2.4. Proceso de fermentación alcohólica.....	5
2.5. Obtención de ácido acético	6
2.6. Generalidades del té (<i>Camellia sinensis</i> L.)	9
2.7. Generalidades de los hongos fitopatógenos.	12
2.8. Generalidades del ajo (<i>Allium sativum</i>)	27
2.9. Generalidades de manejo integrado	31
2.10. Referencias de antagonicos.....	33
CAPÍTULO III. MATERIALES Y MÉTODOS	34
3.1. Ubicación del experimento	34
3.2. Materiales	34
3.2.1. Material biológico	34
3.2.2. Material de laboratorio	35
3.3. Metodología	35
3.3.1. Trabajo en campo	35
3.3.2. Trabajo en laboratorio	35
3.3.3. Ensayos de antagonismo de Kombucha contra <i>Sclerotium cepivorum</i> en condiciones “in vitro”	39

3.3.4. Ensayos de antagonismo de microorganismos que conforman Kombucha contra <i>Sclerotium cepivorum</i> en condiciones “in vitro”	41
3.3.5. Viabilidad de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> por tiempo de inmersión en diluciones de Kombucha	43
CAPITULO IV. RESULTADOS Y DISCUSIONES	44
4.1. Crecimiento y desarrollo de <i>Sclerotium cepivorum</i> en PDA.....	44
4.2. Efecto antagónico de diluciones de Kombucha frente a esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk.....	45
4.3. Efecto de diluciones de Kombucha sobre micelio de <i>Sclerotium cepivorum</i> Berk.....	48
4.4. Efecto de difusión de metabolitos de las diluciones de Kombucha sobre esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i>	53
4.5. Efecto antagónico de <i>Sacharomyces</i> sp. y <i>Zygosaccharomyces</i> sp. frente a esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i>	56
4.6. Tiempo de inactivación de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> por sumersión en Kombucha	59
CAPÍTULO V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES.....	62
CAPÍTULO VI. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	63
ANEXOS	74

Lista de tablas.

Tabla 1. Efecto de diluciones de Kombucha, en el brotamiento de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i>	39
Tabla 2. Efecto de diluciones de Kombucha, en el micelio de <i>Sclerotium cepivorum</i> . .	40
Tabla 3. Efecto de difusión de las diluciones de Kombucha en esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i>	41
Tabla 4. Tratamientos de antagonismo de <i>Saccharomyces</i> sp y <i>Zygosaccharomyces</i> sp. frente a <i>S. cepivorum</i> por el método de cultivos duales.....	42
Tabla 5. Viabilidad de esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> sumergidos en Kombucha.	43
Tabla 6. Efecto antagónico de diluciones de Kombucha frente a esclerocios de <i>S. cepivorum</i>	45
Tabla 7. Efecto de diluciones de Kombucha sobre micelio de <i>S. cepivorum</i>	48
Tabla 8. Efecto de difusión de las diluciones de Kombucha en esclerocios de <i>S. cepivorum</i>	53
Tabla 9. Porcentaje de inhibición de micelio <i>S. cepivorum</i> durante el periodo de crecimiento y desarrollo de <i>Saccharomyces</i> sp. y <i>Zygosaccharomyces</i> sp.....	56
Tabla 10. Tiempo de inactivación de <i>S. cepivorum</i> , sumergidos en el concentrado de Kombucha.	59
Tabla 11. Cantidades requeridas para la preparación de PDA.	74
Tabla 12. Porcentaje de inhibición de micelio <i>S. cepivorum</i> causado por <i>Saccharomyces</i> sp.....	77
Tabla 13. Porcentaje de inhibición de micelio <i>S. cepivorum</i> causado por <i>Zygosaccharomyces</i> sp.	77

Lista de figuras.

Fig. 1. Oxidación de cateninas.	11
Fig. 2. Sintomatología típica de la pudrición blanca causada por <i>Sclerotium cepivorum</i> , nótese la marchitez de las plantas, pobre sistema radicular, pudrición semiacuosa y presencia de micelio algodonoso y alta producción de esclerocios esféricos.	17
Fig. 3. Daño típico de pudrición blanca.	17
Fig. 4. Kombucha concentrada lista para preparar diluciones.	37
Fig. 5. Gráfica de la obtención de las diluciones. (T) testigo, (C) concentrado, (1/10) dilución uno en 10, (1/100) dilución uno en 100 y (1/1000) dilución uno en 1000.	38
Fig. 6. Diluciones de Kombucha.	38
Fig. 7. <i>Saccharomyces</i> sp. (A); <i>Zygosaccharomyces</i> sp. (B).	42
Fig. 8. Esquema del método de cultivos duales en placa Petri.	42
Fig. 9. Crecimiento y desarrollo de <i>Sclerotium cepivorum</i> en PDA. Día 0: siembra de inóculo. Día 4: esclerocios en brotamiento. Día 8: presencia de micelio. Día 12: formación de esclerocios en la superficie de PDA.	44
Fig. 10. Inhibición del brotamiento de esclerocios de <i>S. cepivorum</i> , tratado con el concentrado de Kombucha; presencia de colonias de <i>Saccharomyces</i> sp. y <i>Zygosaccharomyces</i> sp.	46
Fig. 11. Filamentos y esclerocios de <i>Sclerotium cepivorum</i> en PDA.	46
Fig. 12. Colonias de <i>Saccharomyces</i> sp. y <i>Zygosaccharomyces</i> sp. en la dilución 1/10.	47
Fig. 13. Limitada formación de hifas y ausencia de esclerocios de <i>S. cepivorum</i> , causado por el efecto antagónico que ejercen <i>Saccharomyces</i> sp. y <i>Zygosaccharomyces</i> sp. en la dilución 1/100 y 1/1000 de Kombucha (A) y (B).	48
Fig. 14. Efecto de 0.08 ml de concentrado de Kombucha sobre el micelio de <i>S. cepivorum</i> ; apreciar el área central libre de filamentos con esclerocios inactivos y presencia de colonias de <i>Saccharomyces</i> sp. y <i>Zygosaccharomyces</i> sp. (a) y el área libre de filamentos que dejan ver población de esclerocios de menor densidad (b), que el área exterior (c).	49
Fig. 15. Efecto de 0.08 ml de dilución 1/10 de Kombucha sobre el micelio de <i>S. cepivorum</i> ; apreciar la formación de esclerocios diferenciados en 1.2 cm, debido a la destrucción de filamentos (a) y la formación de esclerocios menos densos en un área de 1.1 cm de espesor y población densa de esclerocios en los extremos (b).	50
Fig. 16. Efecto de 0.08 ml de dilución 1/100 de Kombucha sobre el micelio de <i>S. cepivorum</i> ; apreciar un área de 0.5 cm libre de filamentos (a); formación de esclerocios de densidad uniforme en toda la placa.	51
Fig. 17. Efecto de 0.08 ml de dilución 1/1000 de Kombucha sobre el micelio de <i>S. cepivorum</i> ; apreciar un área de 0.4 cm de diámetro libre de filamentos (a) y la formación de mayor concentración de esclerocios en toda la placa.	52
Fig. 18. Inhibición total de crecimiento y desarrollo de <i>S. cepivorum</i> ; utilizando la dilución 1/1000 de Kombucha. Apreciar mayor proliferación de <i>Saccharomyces</i> sp. (a).	55
Fig. 19. Inhibición total de crecimiento y desarrollo de <i>S. cepivorum</i> ; utilizando la dilución 1/100 de Kombucha. Apreciar la proliferación de <i>Saccharomyces</i> sp. (a), que <i>Zygosaccharomyces</i> sp. (b).	55

Fig. 20. Inhibición total de crecimiento y desarrollo de <i>S. cepivorum</i> ; utilizando la dilución concentrada de Kombucha. Apreciarse mayor proliferación de <i>Saccharomyces</i> sp. (a) , que <i>Zygosaccharomyces</i> sp. (b)	55
Fig. 21. Inhibición total de crecimiento y desarrollo de <i>S. cepivorum</i> ; utilizando la dilución 1/10 de Kombucha. Apreciarse mayor proliferación de <i>Saccharomyces</i> sp. (a) , que <i>Zygosaccharomyces</i> sp. (b)	55
Fig. 22. Evidencia de inhibición de crecimiento de <i>Saccharomyces</i> sp. frente a <i>S. cepivorum</i>	57
Fig. 23. Evidencia de inhibición de crecimiento de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. frente a <i>S. cepivorum</i>	57
Fig. 24. Esclerocios de <i>S. cepivorum</i> sumergidos en Kombucha durante 1 minuto. A: Día 1 de observación. B: Día 12 de observación.	59
Fig. 25. Esclerocios de <i>S. cepivorum</i> sumergidos en Kombucha durante 5 minutos. A: Día 1 de observación. B: Día 12 de observación.	60
Fig. 26. Esclerocios de <i>S. cepivorum</i> sumergidos en Kombucha durante 15 minutos A: Día 1 de observación. B: Día 12 de observación.	60
Fig. 27. Esclerocios de <i>S. cepivorum</i> sumergidos en Kombucha durante 30 minutos. Inhibición del crecimiento del patógeno. A: Día 1 de observación. B: Día 12 de observación.	61
Fig. 28. Esclerocios de <i>S. cepivorum</i> sumergidos en Kombucha durante 60 minutos. Inhibición del crecimiento del patógeno y presencia de colonias de <i>Saccharomyces</i> sp. y <i>Zygosaccharomyces</i> sp. A: Día 1 de observación. B: Día 12 de observación.	61
Fig. 29. Estado de placas a los 15 días de evaluación.	75
Fig. 30. Estado de placas a los nueve días de observación, antes de aplicar las diluciones de Kombucha.	75
Fig. 31. Estado de placas a los 12 días de observación.	76
Fig. 32. Estado de las placas del cultivo dual <i>Saccharomyces</i> sp. frente a <i>S. cepivorum</i> a los 12 días de evaluación.	76
Fig. 33. Evidencia de inhibición de crecimiento de <i>Zygosaccharomyces</i> sp. frente a <i>S. cepivorum</i>	77

¹**Miguel Fernando Torres Rojas 2016.** Propiedades antagónicas de diluciones de Kombucha contra *Sclerotium cepivorum* Berk. Tesis Ingeniero Agrónomo. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cajamarca – Perú.

Resumen

En condiciones “in vitro”, el concentrado de Kombucha conformado por *Saccharomyces* sp., *Zygosaccharomyces* sp. y *Acetobacter* sp., metabolizan compuestos con propiedad fungicida, contra esclerocios de *Sclerotium cepivorum*. Este antagonismo se determinó utilizando 0.08 ml de concentrado y las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000; observando destrucción de filamentos e inactivación de esclerocios en forma proporcional. El área de destrucción de filamentos del concentrado fue de 1.8 cm de diámetro; de 1.2 cm de la dilución 1/10; de 0.7 cm de la dilución 1/100 y de 0.4 cm de la dilución 1/1000. Los esclerocios se inactivan cuando la siembra de éstos, se realiza en medio PDA, previamente tratados con el concentrado y las diluciones respectivas. Los microorganismos que conforman Kombucha, en forma individual ejercen limitado antagonismo, caso contrario cuando se encuentran asociados conformando Kombucha. Los esclerocios se inactivan en contacto con el concentrado en un intervalo de 15 a 30 minutos.

Palabras clave: *Sclerotium cepivorum*, kombucha, antagonismo.

¹ Bachiller en Agronomía de la Facultad de Ciencias Agrarias.

¹Miguel Fernando Torres Rojas 2016. Antagonistic properties of dilutions of Kombucha against *Sclerotium cepivorum* Berk. Agronomist Engineer thesis. Faculty of Agricultural Sciences. National University of Cajamarca – Peru.

Abstract

In conditions “in vitro”, Kombucha concentrate consisting of *Saccharomyces* sp., *Zygosaccharomyces* sp. and *Acetobacter* sp., metabolise compounds with fungicidal property, against sclerotia *Sclerotium cepivorum*. This antagonism was determined using 0.08 ml concentrate and dilutions 1/10, 1/100 y 1/1000; observing filaments destruction and inactivation of sclerotia in proportion. The area destroyed was concentrated filaments of 1.8 cm diameter; 1.2 cm dilution 1/10; 0.7 cm dilution 1/100 and 0.4 cm dilution 1/1000. Sclerotia are inactivated when planting thereof is done on PDA medium pretreated with the concentrate and their respective dilutions. Microorganisms that make Kombucha, individually exert limited antagonism, otherwise when they are associated forming Kombucha. Sclerotia are inactivated in contact with the concentrate in a range of 15 to 30 minutes.

Keywords: *Sclerotium cepivorum*, kombucha, antagonist.

¹ Bachelor in Agronomy from the Faculty of Agricultural Sciences.

CAPÍTULO I

INTRODUCCIÓN

La kombucha es conocida en nuestro medio como agua de hongo o té de hongo, bebida de tradición milenaria en diferentes países del oriente asiático, destaca por su refrescante y agradable sabor en las primeras 72 horas de su preparación debido al proceso de fermentación de la sacarosa. Su consumo contribuye con la salud, alivia malestares digestivos y otras dolencias producto de desórdenes alimenticios. Previene infecciones fungosas y bacterianas. El cuerpo fructífero conocido como kombucha está conformado por *Saccharomyces* sp., *Acetobacter xylinum*, y otros microorganismos que prosperan en el agua azucarada de té (*Camellia sinensis* L.) (Gunther 2005).

El ajo (*Allium sativum* L.) es una de las hortalizas más antiguas usadas por el hombre; es importante por sus cualidades culinarias y medicinales. Uno de los problemas fitosanitarios que afecta a este cultivo es el hongo *Sclerotium cepivorum*, agente causal de una de las enfermedades más devastadoras e importantes, la pudrición blanca. Solamente se presenta en especies de *Allium* desarrollando esclerocios que tienen la capacidad de sobrevivir en el suelo por más de 20 años, sin perder su efectividad, razón por la cual su control es difícil (Schwartz y Mohan 2008). Este fitopatógeno afecta el producto comercial (bulbo), causando pérdidas que pueden llegar al 100 % (Crowe *et al.* 1980). La misma se presenta en las zonas productoras de ajo en Cajamarca, principalmente en la localidad de Pariamarca (Roncal 2004).

En la actualidad las investigaciones relacionadas con el tratamiento de fitoenfermedades y plagas de los diferentes cultivos están orientadas a la

utilización ordenada de prácticas agronómicas ancestrales, destacando entre éstas el uso de la materia orgánica como integrante principal del sustrato suelo, seguido por aplicación de metabolitos antagónicos de origen fungoso, bacteriano y vegetal, con la finalidad de consumir productos agrícolas de calidad y sin riesgo de remanentes tóxicos. La kombucha ha sido reportada como antifúngica y antibacteriana (Gunther 2005). Teniendo en cuenta lo mencionado anteriormente realizamos la presente investigación, con el propósito de obtener la dilución antagónica efectiva que limite la germinación de inóculo de *Sclerotium cepivorum* Berk. que produce la pudrición blanca en el sistema radicular del ajo (*Allium sativum*).

1.1. Objetivo

Determinar la efectividad de la dilución antagónica de Kombucha contra el hongo *Sclerotium cepivorum* Berk. que produce la pudrición blanca en el ajo (*Allium sativum* L.).

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades sobre la Kombucha

El nombre Kombucha deriva del vocablo japonés “konbu” que significa “alga” y la terminación “cha” se refiere a “té”; semánticamente corresponde a alga de té. En Japón, kombucha es el nombre de un plato típico denominado “sopa de alga” (Barbancik 1954).

Los microorganismos que integran Kombucha tienen carácter industrial; destacan levaduras de la clase Ascomycetes, género *Sacharomyces* y las bacterias de la clase Schizomycetes, género *Acetobacter* (Gunther 2005).

2.2. Utilidad de la Kombucha

Opiniones que destacan las ventajas del té Kombucha, sobre todo en humanos, como regulador del sistema digestivo, alivia dolencias a consecuencia de artritis, mantiene saludable a la piel. También por ser un fermento tipo sidra, es bebida agradable que se utiliza para aplacar la sed. La principal ventaja radica en que en su consumo se ingieren microorganismos vivos, tanto de hongos como de bacterias, a quienes los científicos atribuyen influencia positiva en el sistema digestivo (Barbancik 1954).

2.3. Géneros de levaduras presentes en Kombucha

2.3.1. *Saccharomyces sp.*, son organismos unicelulares que poseen pared celular definida, constituida por carbohidratos de cadena larga (Roncal 2004), el principal compuesto es la quitina. El núcleo visible, pequeño, rodeado de citoplasma, con una gran vacuola que ocupa la mayor parte de la célula, mitocondrias de 5 µm de largo por 1 µm de ancho que son orgánulos filamentosos que se encuentran flotando en el citoplasma; desplazándose de una parte a otra dentro de la célula (Gunther 2005).

En el interior de estos orgánulos se han localizado porciones que generan enzimas que intervienen en el ciclo de Krebs, en las cadenas de transporte de electrones y la fosforificación oxidativa. Esto ha hecho que se compare a las mitocondrias como calderas en las que los seres vivos queman (oxidan) diferentes componentes para recuperar la energía que contienen y convertirla en ATP (ácido adenosíntrifosfórico). Es probable que la mayoría de las mitocondrias, si no todas, se originen por fragmentación de otras ya existentes, antes de la división celular (Madigan *et al.* 2006).

En el proceso de multiplicación de una célula de levadura, lo primero que se distingue es la blastoconidia en forma de brotes celulares globosos, ligeramente alargados. En medio de cultivo se presenta un filamento (Alexopoulos 1966).

2.3.2. *Zygosaccharomyces sp.*, presenta células elipsoidales, la mayoría con más de 5 µm de largo, puede crecer sobre sustratos azucarados, condición que facilita su actividad, se estima alrededor de 30 especies que se multiplican en un rango de 0.876 % y 0.912 % de desconcentración de azúcar. Taxonómicamente al género *Saccharomyces* se lo incluye en el reino Fungi, filo Ascomycota, clase Hemiascomycetes, orden Saccharomycetales, familia Saccharomycetaceae; por sus características morfológicas y por presentar quitina (Brock *et al.* 1987).

2.3.3. Bacteria *Acetobacter xylinum*, presenta flagelos períticos, esta bacteria es la encargada de llevar a cabo la oxidación de alcoholes de cadena larga y de azúcares, esto ocurre porque cumple con el ciclo del ácido cítrico hasta CO₂,

conduciendo a la acumulación de ácidos orgánicos como productos finales (Gerard y Tortora 1993).

2.4. Proceso de fermentación alcohólica

Es un proceso biológico en plena ausencia de aire (oxígeno – O₂), llamado también proceso anaeróbico originado por la actividad de algunos microorganismos unicelulares (levaduras) que procesan los hidratos de carbono (azúcares), como puede ser glucosa, fructosa, sacarosa y almidón; para obtener como producto final alcohol en forma de etanol (fórmula química: CH₃-CH₂-OH), dióxido de carbono (CO₂) en forma de gas y unas moléculas de ATP que consumen los propios microorganismos en su metabolismo celular energético anaeróbico (Brock *et al.* 1987).

El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, la cerveza, la sidra. La fermentación acética corresponde a la fermentación del etanol para convertirse en ácido acético provocado por bacterias, comúnmente se presenta en vinos, cuando éste se agria (Garritz y Chamuzo 1994).

2.4.1. Fermentación de la glucosa. Según Gerard y Tortora (1993), cuando la glucosa se degrada por vía de la glucólisis en condiciones anaeróbicas no se produce una oxidación o una reducción total del sustrato. Se afirma entonces que la reacción de fermentación está “equilibrada”. La energía libre requerida para la formación de ATP se obtiene a partir de las reacciones de transferencia de electrones favorables, ocurriendo la degradación pasando por tres momentos:

- a) Primero ocurre la reacción de arreglo preparatorio de degradación formando al compuesto intermediario **gliceraldehido-3-fosfato**; sin oxido-reducción.
- b) Se produce la energía para los enlaces de fosfato en forma de ATP y la producción de **piruvato**.
- c) El proceso de la reacción de oxido-reducción, manifestándose la fermentación con la producción de **etanol** y liberación de CO₂. La vía bioquímica del **piruvato** se denomina **glucólisis**.

Hay que recalcar que todavía no se ha efectuado cambios redox, puesto que las tres reacciones se realizan sin ninguna transferencia de electrones, aunque se han empleado dos enlaces fosfato de alta energía proveniente del ATP. La primera reacción de oxidación tiene lugar en la conversión del gliceraldehido-3-fosfato en ácido 1,3-difosfoglicerido. En esta reacción la coenzima NAD acepta dos electrones y se convierte en NADH, mientras que el fosfato inorgánico se convierte en forma orgánica (químicamente se dice que el fosfato ha sido esterilizado) constituyendo de esta manera base de la fosforilación del sustrato y la formación del ATP, como reacción más importante en los organismos vivos.

En la fermentación completa se emplean dos moléculas de ATP para la fosforilación del azúcar, y se sintetiza cuatro moléculas de ATP (dos para cada fragmento de tres carbonos), con que la ganancia neta es de dos moléculas de ATP por moléculas de glucosa fermentada. Puesto que el valor energético de un enlace de alta energía de ATP es de cerca de 7.4 kcal/mol y se libera 57 kcal de energía por molécula de glucosa durante la fermentación alcohólica, cerca del 26 % de la energía liberada durante la oxidación de glucosa se mantiene en enlaces de alta energía de ATP (14.8 kcal en dos mol de ATP) y el resto se pierde en forma de calor (Voet 2006).

Las reacciones que van de glucosa al piruvato que se acaban de describir se presentan en gran variedad de microorganismos, pero el piruvato producido puede procesarse todavía más y de diferentes formas, muchas bacterias, así como animales superiores, efectúan la reducción piruvato+NAD+ácido láctico+NAD, sirviendo el piruvato como el último aceptor de electrones para formar el producto final, el ácido láctico en lugar del alcohol y CO₂ (Gerard y Tortora 1993).

2.5. Obtención de ácido acético

Esta fermentación comprende el proceso de obtención del etanol para convertirse en ácido acético provocado por bacterias, comúnmente se presenta en vinos cuando éste se agría (Voet 2006).

La ruta biológica de producción de ácido acético está en el orden del 10 % de la producción mundial, siendo las bacterias fermentativas las responsables del proceso de obtención de este vinagre de calidad para la industria culinaria. El 75 % del ácido acético procedente de la industria química se obtiene a través de la carbonilación del metanol (Brock *et al.* 1987).

Según Gerard y Tortora (1993), el ácido acético, en la forma de vinagre, ha sido preparado por bacterias del género *Acetobacter*. En presencia de suficiente oxígeno, estas bacterias pueden producir vinagre a partir de una amplia variedad de alimentos alcohólicos. Algunos insumos comunes son la sidra, el vino, cereal fermentado, malta, arroz y papa. Una solución diluida de alcohol, suministrada con inóculo viable de *Acetobacter* sp., y mantenida en un lugar cálido y aireado se hará vinagre. Este principio utiliza la industria para la preparación de vinagre; probablemente la primera producción de vinagre fue consecuencia de errores en la fermentación durante el proceso de elaboración de vino. Si el mosto se fermenta a temperatura demasiado alta, *Acetobacter* sp. dominará a la levadura (*Saccharomyces* sp.) presente naturalmente en las uvas (*Vitis vinifera*).

La mayor parte del vinagre hoy en día es hecho en cultivo de tanque sumergido, descrito por primera vez en 1949 por Otto Hrometka y Heinrick Ebner. En este método el alcohol se fermenta a vinagre en un tanque agitado continuamente y se suministra oxígeno burbujeando aire a través de la solución. Usando aplicaciones modernas de este método, se puede preparar vinagre de 15 % ácido acético en solo 24 horas en un proceso por lotes, incluso de 20 % en 60 horas (Gerard y Tortora 1993).

2.5.1. Carbonilación del metanol: en este proceso el metanol y el monóxido de carbono (CO) reaccionan para producir ácido acético, de acuerdo a la ecuación química siguiente:



El primer proceso comercial de carbonilación del metanol, usando catalizador de cobalto, se desarrolló por la compañía química alemana BASF en 1963. Posteriormente, en 1968, el catalizador estuvo basado en Rodio (Rh) mostrando

eficiencia a menor temperatura y con casi ningún subproducto. La primera planta en usar este método fue construida por la compañía química norteamericana Monsanto en 1970; constituyéndose en el método dominante de producción de ácido acético. En las postrimerías de los años 1990, las compañías químicas de BP comercializaron el catalizador del proceso Cativa que es promovido por el Rutenio (Ru). Este proceso catalizado por Iridio (Ir) es más verde y más eficiente y ha sustituido ampliamente al proceso de Monsanto, frecuentemente en las mismas plantas de producción (Gerard y Tortora 1993).

2.5.2. Acción del ácido acético: en medicina el 1 % es importante para vendajes quirúrgicos, en concentraciones de 2 – 5 % se utiliza para aliviar otitis externas provocadas por *Pseudomonas* sp. y *Aspergillus* sp.. En concentraciones de 5 % sirve para desinfectar y cicatrizar quemaduras externas. Duchas vaginales al 0.25 % y 1 % alivia infecciones por *Trichomonas* sp. y al 0.25 % se utiliza para irrigación de la vejiga (Gerard y Tortora 1993).

Tiene propiedades de “**desintoxicación**”, reduce las propiedades tóxicas de sustancias mediante modificaciones químicas inducidas en el organismo que generan un compuesto que es menos tóxico o que se elimina con mayor facilidad, además “**desinfecta**”, debido a que elimina todo tipo de microorganismos patógenos, con excepción de esporas bacterianas que han experimentado liofilización natural (Roncal 2004). Se utiliza como “**desinfestante**” eliminando microorganismos de material quirúrgico y sustratos de diferente naturaleza (Roncal 1996).

El etanol antes de convertirse en ácido acético por fermentación se utiliza como desinfectante, elimina a microorganismos siempre y cuando se encuentre diluido en agua, para permitir el paso del producto activo dentro de la célula del microorganismo e inducir la intoxicación. Como desinfectante se utiliza para el mantenimiento aséptico de material quirúrgico y equipos de uso médico como estetoscopios, equipos para la asistencia respiratoria o áreas de preparación de medicamentos en centros de salud y laboratorios de droguería, para evitar la corrosión de superficies de tapones de goma y de frascos-ampolla que contengan medicamentos (Gerard y Tortora 1993).

2.6. Generalidades del té (*Camellia sinensis* L.)

Según Muñoz (2002), su origen se remonta a la mitología japonesa, acreditado por el Santo Budista Chino Bodhidharma meditando durante 9 años contra la pared. Tiempo que condujo al Santo a quedar profundamente dormido; luego de despertar se disgustó por haberse quedado dormido, cortándose los párpados para que de esa manera se asegure de no volver a dormirse durante sus meditaciones. De sus párpados caídos al suelo crecieron plantas, cuyas hojas inmersas en agua caliente producen una bebida que combate el sueño.

Bromatológicamente la composición química general de los brotes de Té varían según las condiciones agroclimáticas, fecha de cosecha, prácticas culturales y características genéticas de las plantas. Su popularidad como bebida se atribuye a los polifenoles y xantinas: ambos grupos responsables del sabor único, sumado a los numerosos compuestos asociados con este aroma.

Tanto los brotes como hojas presentan complejos químicos de enzimas, carbohidratos, proteínas y lípidos. Los brotes se distinguen por su marcado contenido de polifenoles (flavonoides, teaflavina y tearubigina) y xantinas (cafeína, teobromina y teofilina); compuestos que integran entre 15 y 30 % de la materia seca de los brotes, aunque estos porcentajes pueden variar por su contenido según el material genético, ambiente, prácticas agronómicas, incidencia de plagas y enfermedades, además de prácticas de industrialización, las hojas frescas de esta planta contiene entre 75 a 78 % de agua. Hacen falta 4 Kg de hojas frescas para hacer 1 Kg de té terminado. Los mayores compuestos oxidables de las hojas son las catequinas, sustancias pertenecientes al grupo de los flavonoides; que se encuentran en las vacuolas, jugando un rol fundamental durante el proceso de fermentación.

En la salud humana las catequinas intervienen en la reducción de los triglicéridos y colesterol de la sangre, previenen la arteroesclerosis, refuerza las paredes de las venas, regula la presión sanguínea y previene la caries, limitando el desarrollo de las bacterias causantes de tal afección. Comúnmente conocido como “Té negro”, es considerado como fuente ideal de los minerales Calcio (Ca),

Fósforo (P), Hierro (Fe), Potasio (K), Sodio (Na) y las vitaminas A, B1, B2, Niacina y C, contiene más de 600 compuestos que actúan sobre el sabor, gusto y color. Destacan las proteínas (20 a 30 %), aminoácidos (1 a 5 %) que son responsables del gusto y sabor, alcaloides (3 a 5 %), fenoles (20 a 35 %), glúcidos (20 a 25 %), ácidos orgánicos (3 a 5 %), lípidos (4 a 5 %), pigmentos (0.6 a 1 %), sustancias aromáticas (0.005 a 0.03 %), vitaminas (0.6 a 1 %), saponarias (0.07 a 0.1 %). Todas estas son sustancias orgánicas.

Como resultado de un análisis científico de la composición química del Té, se ha determinado que contiene 27 elementos minerales, además del Carbono (C), Hidrógeno (H), Oxígeno (O₂), Nitrógeno (N), Fósforo (P), Potasio (K), Magnesio (Mg), Manganeseo (Mn), Flúor (F), Aluminio (Al), Calcio (Ca), Sodio (Na), Azufre (S), Hierro (Fe), Arsénico (Ar), Cobre (Cu), Níquel (Ni), Silicio (Si), Zinc (Zn), Boro (Bo), Molibdeno (Mo), Plomo (Pb), Cadmio (Cd), Cobalto (Co), Selenio (Se), Bromo (Br), Yodo (I), Cromo (Cr), Titanio (Ti), Cesio (Cs) y Vanadio (V). El contenido en Flúor, Potasio, Aluminio, Yodo, Selenio, Níquel, Arsénico y Manganeseo del Té; es superior al nivel medio de otras plantas. Los elementos minerales producen una acción reguladora sobre el organismo. Como el Té es rico en estos elementos, es suficiente con beber algunas tazas por día para responder a las necesidades del cuerpo humano.

2.6.1. Procesamiento del té comercial. Según Muñoz (2002), el Té negro o común se prepara a partir de los brotes secos del arbusto *Camellia sinensis* L., denominado botón y de las dos primeras hojas del terminal. Las hojas se dejan marchitar, luego pasan por la envoltura durante unas horas, luego se calientan y se secan, en este proceso las enzimas del parénquima foliar verde catalizan la oxidación de los constituyentes.

Este producto se oxida hasta en un 100 %; las hojas cortadas se magullan para perturbar las estructuras de las células aprovechando todos los jugos de la hoja (que contiene flavonoides) y enzimas (como la polifenol oxidasa) se mezclan permitiendo una oxidación completa. El proceso de oxidación dura tres horas bajo una alta humedad y una temperatura óptima para la función de las enzimas.

Una vez que el proceso está completo, las hojas se secan y se preparan para su empaque.

Las figuras siguientes son el ejemplo de **oxidación** de las **catequinas** en **theaflavinas** y **thearubiginas** por medio de la enzima polifenol oxidasa. Ahora si se puede observar que las estructuras comienzan a cambiar más. La **Thearubigina** es la que da color y sabor al Té negro.

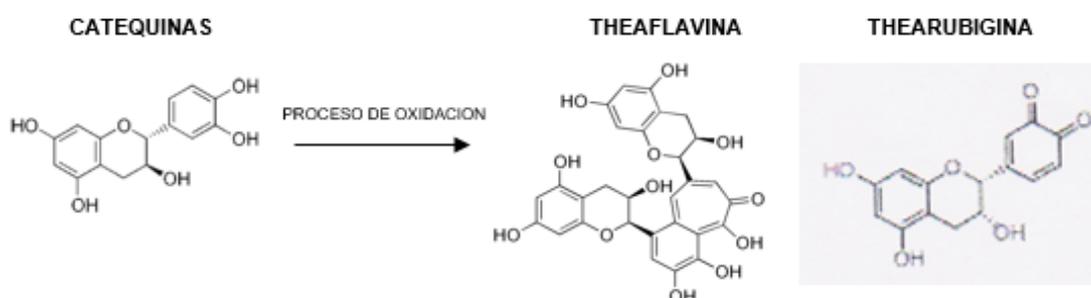


Fig. 1. Oxidación de catequinas.

2.6.2. Descripción de algunas sustancias químicas presentes en el Té negro. Según Muñoz (2002).

Teaflavinas (TF): son sustancias rojas y naranjas que contribuyen la intensidad, el brillo y el color de la infusión del Té. Las teaflavinas del Té negro comprenden varias fracciones.

Thearubiginas (TR): son sustancias altamente polimerizadas, son los productos de la condensación completa de catequinas oxidadas con TF. Juntos con otras sustancias altamente polimerizadas, las TR contribuyen con el color, el sabor y el cuerpo de la infusión.

Cafeína: es una molécula relativamente estable y es un estimulante directo del sistema nervioso central. Junto con TF imparte fuerza a la infusión de Té. Los altos niveles de cafeína indican un buen estándar de hoja. Los niveles de cafeína disminuyen con la madurez de los brotes. Estos componentes bioquímicos dan el gusto único y aroma característico del Té negro. Los componentes de sabor

volátiles incluyen aminoácidos que se degradan para producir linalol, fenil acetaldéhidó, fenil etanol y metil que contribuyen al aroma deseable del Té.

2.7. Generalidades de los hongos fitopatógenos.

Según Roncal (2004), el soma está constituido por filamentos ramificados conformados por células de paredes celulares que contienen quitina, celulosa y otras sustancias orgánicas complejas. Las hifas de la mayoría de los hongos se encuentran interrumpidas por tabiques transversales porosos denominados septos, son divisiones que permiten la diferenciación celular con más de dos núcleos, aploides o diploides según la circunstancia. Las especies menos evolucionadas solo presentan septos en la parte terminal del talo, donde se forma el esporangio o estructura almacén de esporas y zoosporas. El conjunto de hifas, esporangióforos, conidióforos, esporas y conidias respectivamente conforman el micelio. Son quimioheterótrofos, algunas especies viven sobre materia orgánica muerta, otros son parásitos ocasionar daño significativo al hospedero, de esta forma de vida se originan los hongos simbiotes o micorrízicos y los que prosperan como patógenos de otros seres vivos.

Se propagan a través de esporas, conidias, los mismos que se forman en esporangios y conidióforos simples y ramificados; algunos conidióforos se forman dentro de estructuras especiales, como ocurre también con las esporas de los hongos denominados superiores, que se forman en células especiales denominadas basidias y ascas (Roncal 2004).

2.7.1. Pudrición blanca en ajo

2.7.1.1. Agente causal, *Sclerotium cepivorum* Berk., hongo Imperfecto del orden Mycelia Sterilia (Galli *et al.* 1980), descrito en Inglaterra por Berkeley en 1841; aunque en la mayoría de la literatura se reporta que no tiene fase teleomórfica, pero Weber (1973) cita a *Stromatinia cepivorum* como el estado de ascospora (Romero 1993).

Se reproduce a través de pequeños esclerocios que funcionan como propágulos o inóculo (Crowe 1995). En ocasiones produce conidios en esporodocios, los que aparentemente son estériles (Agrios 1996).

Los esclerocios son masas compactas de hifas que pueden o no contener tejido del hospedero, por lo común con una cubierta oscura y capaz de sobrevivir bajo condiciones desfavorables (Agrios 1996), en su mayoría son de forma esférica uniforme, de cubierta negra y lisa que consiste de 2 a 5 células de grosor que rodean una masa compacta y gruesa de micelio refractivo, por lo general tienen un tamaño de 0,3 a 0,6 mm de diámetro; aunque algunas veces se han reportado esclerocios de forma irregular y tamaños que van desde los 5 mm hasta 25 mm (Crowe y Hall 1980; Crowe 1995). En ambos tipos se forman esclerocios secundarios, dentro o adyacentes a los originales, característica importante en la sobrevivencia (Coley Smith *et al.* 1990).

2.7.1.2. Ciclo de vida, los esclerocios representan el inóculo primario para el desarrollo de la enfermedad, éstos pueden permanecer viables de 10 a 20 años en condiciones de campo y sin necesidad del hospedero. De acuerdo a Coley Smith (1979) y Coley Smith *et al.* (1990) el porcentaje de sobrevivencia se mantiene por encima del 92 % y la viabilidad puede llegar hasta un 96 % entre los 5 a 10 años de entierro, si este período es de 15 o 20 años los porcentajes de viabilidad oscilan entre 72 y 96 % dependiendo de la profundidad. Por otro lado, en un estudio sobre el efecto de temperatura del suelo, humedad y profundidad de entierro y la relación de sobrevivencia de esclerocios de *S. cepivorum* y *Sclerotinia minor*, determinó que las estructuras de conservación del primero son más sensibles al calor, que los del segundo; indicando que para matar el 50 % de los propágulos (DL) de este último se requieren exponer durante 624 h a 35° C, mientras que para lograr el mismo efecto en esclerocios de *S. cepivorum* sólo son necesarias 130 h (Adams 1987).

Los esclerocios de *S. cepivorum* tienen una latencia 1 - 3 meses; período de descanso que interrumpe su desarrollo y es mantenida por factores constitutivos que garantizan al organismo persistir en esta condición por un período mínimo necesario en su ciclo de vida (Coley Smith 1990). Una vez que la latencia

constitutiva es superada, los esclerocios pueden estar sujetos a una latencia exógena, la cual puede ser impuesta por una amplia variedad de factores, entre los que se encuentran la micostasis, la temperatura, la luz y la aireación (Coley Smith y Cooke 1971).

El brotamiento de esclerocios es de forma eruptiva o miceliogénica (Somerville y Hall 1987, Coley Smith 1979), el primer signo de evidencia es la aparición de una protuberancia en la superficie del esclerocio, luego la cáscara sufre una ruptura y uno o más tapones grandes y densos de micelio son empujados hacia fuera; las hifas empiezan a crecer y ramificarse a partir de cada tapón, produciéndose anastomosis libremente (Coley Smith y Cooke 1971).

Este proceso es estimulado solamente por exudados de las raíces de las especies del género *Allium*; metabolitos constituidos por sustancias no volátiles de sulfóxidos de alkyl y alkenyl-cisteína, los cuales son metabolizados por la microflora del suelo, especialmente por bacterias presentes en la rizosfera, para producir compuestos volátiles (sulfuros de n-propil y alil cisteína) que activan los esclerocios latentes hasta una distancia de 10 cm de la raíz y 30 cm de profundidad (Coley Smith y King 1969, Crowe y Hall 1980, Esler y Coley Smith 1983, Ikeshoji 1984, citado por Reddy *et al.* 1992, Crowe 1995).

Una vez que el esclerocio ha brotado, el o los filamentos penetran en las raíces por medio de un apresorio, después crece intra e intercelularmente entre las células parenquimáticas, el tejido cortical se desintegra y el vascular es invadido y termina como macerado. La maceración es acompañada por la producción secuencial de enzimas que degradan la pared celular, sobretodo de poligaracturonasas (PG) y pectin transeliminadas. También, se produce la fitotoxina ácido oxálico que actúa de forma sinérgica con las PG, quelatan el Ca^{++} y bajan el pH cerca del óptimo para la acción enzimática, provocando la pudrición suave característica; sin embargo, la relación entre las hifas y la distribución de enzimas extracelulares que degradan la pared celular no ha sido bien investigada (Stone y Armentrout 1985, Metcalf y Wilson 1999).

El micelio se propaga planta a planta por el contacto de las raíces infectadas con las sanas, si se encuentran a una distancia de 1 a 2 cm. Unos pocos esclerocios pueden ser formados en las raíces, sin embargo, la mayoría es formada en la base del bulbo una vez que el hongo ha logrado invadir y desarrollarse en esta parte (Crowe 1995).

De acuerdo con Adams y Papavizas (1971), la temperatura y el pH óptimos para la germinación de esclerocios es 20° C con un rango óptimo de 15 - 25° C y un pH de 4,8; aunque pueden germinar en pH cercanos a 8. Por otro lado, la temperatura y el pH óptimos para el desarrollo de la enfermedad es de 15° C con un rango de 10 - 18° C y el pH es de 6,1 con un rango óptimo de 5,4 - 7,8.

Walker (1969), menciona que a temperaturas mayores de 24° C las plantas permanecen saludables aún en un suelo fuertemente infectado y que la enfermedad se desarrolla más rápidamente en suelos secos (40 % de humedad) que en suelos húmedos (60-80 % de humedad). Galli *et al.* (1980) confirman lo anterior al mencionar que una baja humedad del suelo es un factor de predisposición importante que favorece el desarrollo del patógeno y que la enfermedad es más severa en suelos de zonas altas y bien drenados. Al respecto, Hartman y Datnoff (1997) citan que suelos saturados pueden enmascarar por completo la enfermedad.

El problema se encuentra principalmente en el campo; sin embargo, en caso de que los bulbos sean infectados en las últimas etapas de su desarrollo se produce una pudrición suave durante el almacenamiento, sobre todo si son almacenados húmedos (Romero 1993, Crowe 1995).

2.7.1.3. Hospederos, *S. cepivorum* es patógeno específico del género *Allium*; afecta cebolla (*Allium cepa* L.), ajo (*A. sativum* L.), cebolla de hoja (*A. fistulosum* L. y *A. schoenoprasum* L.), poro (*A. ampeloprasum* L.) y ajo silvestre (*A. canadense* L.) (Chupp y Sherf 1960, Walker 1969, Galli *et al.* 1980).

2.7.1.4. Distribución de la enfermedad, es de distribución mundial, se encuentra en diferentes países de Europa, Oceanía, África y América, ocasionando pérdidas considerables en los cultivos de ajo y cebolla (Villar *et al.* 1990, Romero 1993). La pudrición blanca fue asociada primero con cebolla en el Reino Unido en 1841 y luego con ajo en Italia en el año 1903. Después de esos primeros informes, la enfermedad fue registrada en todo el mundo (Pinto *et al.* 1998). Recientemente Couch y Kohn (2000) en base a estudios de filogenia, han determinado que el centro de origen de esta fitoenfermedad es Europa, de aquí se ha diseminado a todo el mundo.

2.7.1.5. Sintomatología, esta enfermedad afecta plantas en cualquier estado fenológico y se incrementa conforme avanza el desarrollo el sistema radicular. Los síntomas usualmente se notan a los 60 días después de la siembra y difieren de acuerdo al estado de establecimiento de la planta y la duración de las condiciones favorables en el suelo, principalmente la temperatura (Crowe 1995, Pinto *et al.* 1998).

El primer síntoma coincide con el período de bulbificación y se presenta como un amarillamiento general, continuado por muerte descendente de las hojas más externas y retardo del crecimiento. El deterioro gradual se da por varios días o semanas hasta concluir con el colapso final de las hojas y una pudrición basal seca o semiacuosa. Simultáneamente, en las raíces y hojas inferiores hay abundancia de micelio blanco, lanoso y superficial que pronto produce esclerocios negros y esféricos sobre la superficie o dentro de los tejidos enfermos. En este grado de necrosis, las plantas son fácilmente arrancadas (Chupp y Sherf 1960, Walker 1969, Weber 1973, Galli *et al.* 1980, Crowe 1995, Pinto *et al.* 1998) (Figura 2 y 3).

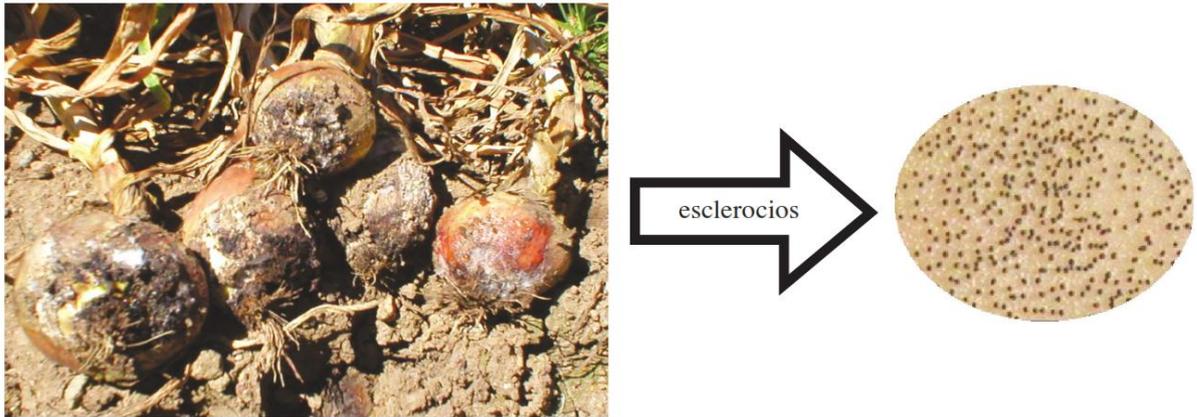


Fig. 2. Sintomatología típica de la pudrición blanca causada por *Sclerotium cepivorum*, nótese la marchitez de las plantas, pobre sistema radicular, pudrición semiacuosa y presencia de micelio algodonoso y alta producción de esclerocios esféricos.

La muerte de plantas en el campo, depende del estado de crecimiento y desarrollo y de la densidad de inóculo. Cuando la infestación es baja la muerte de plantas es de 2 a 40 unidades en un espacio del surco; ocurriendo lo contrario cuando la infestación es alta, se observa plantas afectadas por planchones comprometiendo más de dos surcos (Crowe 1995).



Fig. 3. Daño típico de pudrición blanca.

Si los bulbos son atacados al final del ciclo del cultivo la enfermedad se expresa como una pudrición durante el almacenamiento (Romero 1993, Agrios 1996).

2.7.1.6. Epidemiología, la pudrición blanca es una enfermedad monocíclica y el patrón de diseminación es típicamente a través de semilla infectada y por esclerocios transportado en herramientas en forma de agregado del suelo infestado (Hartman y Datnoff 1997).

Los esclerocios representan el inóculo primario, se diseminan a largas distancias a través de bulbos y plantas de almácigo contaminados. A nivel local los esclerocios son diseminados por vientos fuertes, inundaciones e irrigación por gravedad no controladas, además se transporta en los equipos agrícolas, en la planta de zapatos de los trabajadores y en las patas de animales; que termina en distribución generalizada del terreno (Mordue 1976; Galli *et al.* 1980 y Crowe 1995). Al respecto, Adams (1979) menciona que los esclerocios pueden pasar a través de una bomba de irrigación y ser asperjados en el campo a razón de 0,2 esclerocios por litro de agua. Recientemente citan que el ácaro *Rhizoglyphus robustus* (Astigmata - Acaridae) influye en la epidemiología de la pudrición blanca, ya que se descubrió que transporta fragmentos de micelio y esclerocios a través de sus piezas bucales y excretas (Ramírez *et al.* 2002).

Adams y Papavizas (1971), en sus primeros estudios sobre la relación entre densidad de inóculo y enfermedad, mencionan que cinco esclerocios por gramo de suelo pueden causar una cantidad apreciable de plantas enfermas. Más tarde, Crowe *et al.* (1980), reportaron que el inóculo de *S. cepivorum* es eficiente, debido a que éstos cuando brotan cerca al sistema radicular del hospedero inician infección. La incidencia de la fitoenfermedad de 10 a 100 %, se relaciona con la densidad del inóculo, de 0,001 a 0,1 esclerocios por gramo de suelo. Una densidad baja de esclerocios es necesaria para provocar una elevada incidencia de pudrición blanca (Crowe 1995).

2.7.1.7. Control, los primeros intentos para el control de la pudrición blanca datan aproximadamente del año 1920, en primera instancia se probó con prácticas culturales como rotación de cultivos y exclusión de material contaminado; pero conforme la infestación se hizo más intensa y ampliamente

distribuida, se aperturó el uso de fungicidas químicos (Locke 1968). En la actualidad los intentos de tratamiento químico no han resultado satisfactorios; más bien han perjudicado la economía del agricultor y el daño ecológico del lugar (Pérez *et al.* 2000).

a. Control por resistencia, se realizaron ensayos de evaluación de resistencia de ajo a la infección por *S. cepivorum*. En el primero evaluaron 64 cultivares tanto en el laboratorio como en el campo y en el segundo 294 cultivares analizados en campo. En ambos experimentos la conclusión fue la misma: “ninguno de los cultivares es inmune a la infección por pudrición blanca”, mencionan que los cultivares comerciales difieren significativamente en susceptibilidad y rendimiento en presencia de niveles de inóculo altos y uniformes. Citan que, estas diferencias pueden ser debidas a las condiciones ambientales o variaciones en el patógeno (Utkhede y Rahe 1978 a y b).

Años más tarde, Coley Smith (1990) informó que las investigaciones concernientes a variedades resistentes han producido resultados inconsistentes, causados probablemente por no tomar en cuenta factores geográficos y climáticos durante la ejecución de los experimentos. Menciona, además, que la resistencia no ha sido descubierta y que los progenitores silvestres presentan poco potencial genético para hallarla, por lo que pensar en el combate por resistencia, como alternativa de manejo para esta enfermedad, es una posibilidad remota.

Crowe (1995), reafirma lo expuesto por Coley Smith (1990), al citar que no hay especies de *Allium* resistentes a la infección por *S. cepivorum* y que el mejoramiento ha sido limitado por la falta de fuentes de resistencia. Menciona también que los síntomas pueden ser menos severos en poro que en ajo o cebolla. Además, que las diferencias entre especies parecen estar relacionadas con la producción relativa de estimulantes de la germinación a través de las raíces, por lo que recientemente se han hecho esfuerzos en seleccionar líneas que produzcan pocos estimulantes.

Recientemente, Hunger *et al.* (2002) mencionan que la posible ruta para obtener cultivares resistentes es la ingeniería genética, por medio de ella se podrían producir materiales que no exuden estimulantes de la germinación o cultivares que produzcan compuestos inhibitorios a la pudrición blanca.

b. Control químico, muchos han sido los intentos por hallar un producto químico que brinde un adecuado control para esta enfermedad. El primer fungicida exitoso fue el cloruro de mercurio (Calomel, PS), luego han sido usados el dicloran (Botran 75 PH, 6 Kg/Ha) y el pentacloronitrobenzoceno (PCNB, Luxan 50 SC, 0.2 – 0.3 L/Ha) (Coley Smith 1990).

Locke (1968), evaluó el efecto del dicloran (Botran 75 PH, 6 Kg/Ha), PCNB (Luxan 50 SC, 0.2 – 0.3 L/Ha) y Calomel (PS), sobre la pudrición blanca de ajo, y encontró que los tres combatieron la enfermedad de forma aceptable, el primero presentó entre 80 y 92 % de control, mientras que los restantes controlaron entre el 56 y 72 %; el autor concluye que es posible utilizar estos productos siempre y cuando las aplicaciones se realicen al surco de siembra, ya que la inmersión de las raíces resulta en una fitotoxicidad severa. Fletcher y Knight (1971) reafirman lo expuesto por Locke (1968) al mencionar que el tratamiento con dicloran o Calomel parece ser preventivo o disminuye la infección causada por *S. cepivorum*.

Algunos años después, Utkhede y Rahe (1983a) probaron el vinclozolin (Ronilan 50W PM, 1.5 Kg/Ha) y el iprodione (Rovral 50 PH, 1.25 Kg/ Ha) y concluyeron que proporcionan un control significativo cuando son aplicados como tratamiento presembrado. Luego, Resende y Zambolim (1987) y Resende *et al.* (1987), evaluaron el iprodione (Rovral 50 PH, 1.25 Kg/ Ha), el PCNB (Luxan 50 SC, 0.2 – 0.3 L/Ha) y el formaldehído (3% diluído en agua), solos y en mezcla, en relación con la densidad de esclerocios presentes en un campo de cultivo de ajo. Estos autores encontraron que los químicos no reducen la población del hongo en el suelo y que el número de esclerocios viables era igual al número de esclerocios totales. Además, se pudo determinar que en los tratamientos en los que se aplicó el formaldehído solo, la población de esclerocios aumentó al final del ciclo del cultivo.

Por otro lado, en un estudio sobre tolerancia cruzada llevado a cabo por Littley y Rahe (1984), se demostró que *S. cepivorum* presenta este tipo de tolerancia a los productos dicarboximidas iprodione (Rovral 50 PH, 1.25 Kg/ Ha), al dicloran (Botran 75 PH, 6 Kg/Ha) y PCNB (Luxan 50 SC, 0.2 – 0.3 L/Ha) pero no al Benomil 50 PM (0.6 g/L), Captan 50 PH (2.5 – 3 Kg/Ha) y Thiram 80 PM (1.6 – 3.2 Kg/Ha). Los autores apuntan que esto es de particular importancia debido a que la tolerancia al dicloran ya había sido encontrada para este tiempo. Mencionan también que el benomil parece ser un buen candidato para usar en mezcla o en forma alterna con otros productos para mejorar el control de la enfermedad.

Sin embargo, Coley Smith (1990) cita que aunque se ha probado gran cantidad de productos, ninguno ha dado resultados exitosos y que esto, en parte, es debido a la degradación de los fungicidas en el suelo, por acción de las poblaciones heterogéneas de microorganismos presentes en él. Otro aspecto importante que cita el autor, es que al existir productos que son más resistentes a la degradación microbiana, su persistencia en el suelo puede causar daños por acumulación y contaminación. Este es el caso del cloruro de mercurio o Calomel citado anteriormente. Este producto está prohibido en América Latina desde 1960, ya que presenta una bioacumulación alta y es tóxico para peces y aves; se conoce del caso de muerte de personas en Japón por el consumo de peces contaminados con metilo de mercurio, que es el subproducto del Calomel una vez que entra en contacto con el suelo, el agua o el cuerpo (UNA-IRET 1999).

Más recientemente, Crowe (1995) cita que el iprodione (Rovral 50 PH, 1.25 Kg/ Ha) es efectivo en períodos cortos de cultivo (siembra de bulbillos), en el establecimiento inicial de las plantaciones con bajas poblaciones de esclerocios y en zonas de cultivo que no favorezcan el desarrollo de la enfermedad. Además, confirma lo expuesto por Coley Smith (1990), al mencionar que la baja efectividad de algunos fungicidas se debe a la degradación microbiana y agrega además, que el control es más limitado conforme aumentan las poblaciones de esclerocios en el suelo. Al respecto, Hartman y Datnoff (1997) y Pérez *et al.* (2000) citan que los fungicidas frecuentemente tienen un costo elevado y

proporcionan solamente control parcial de la enfermedad. Un ejemplo de lo anterior es el caso del tebuconazol (Folicur 250 CE, 1 – 2 L/Ha), este producto fue probado en México por Delgadillo *et al.* (2002) para combatir la pudrición blanca en ajo, los autores encontraron que conforme aumentaba la densidad del inóculo, de 0 a 50 esclerocios kg⁻¹ de suelo, la eficacia del producto disminuía en 42,6 % y se requería de más aplicaciones para lograr el mismo porcentaje de control.

c. Control cultural.

Preparación de terreno. El cultivo de ajo requiere de suelos ligeros (suelos) y permeables, para evitar encharcamiento ya que el cultivo es muy susceptible a podredumbre radicular. El trabajo inicial consiste en un cruce de 20 – 30 cm de profundidad, luego de 1 semana se realizan 2 – 3 rastras con un intervalo de 2 – 3 días.

Rotación de cultivos. Este método no puede ser usado debido a la extremada longevidad de los esclerocios y a que son estimulados por compuestos específicos del género *Allium* (Coley Smith 1990).

Inundación. Crowe y Hall (1980) encontraron que el decaimiento de los esclerocios en suelos saturados ocurrió solamente en altas temperaturas. Al respecto, Leggett y Rahe (1985) mencionan la inundación como un posible método para reducir los niveles de inóculo de *S. cepivorum*. Esto debido a que tanto la estructura como la fisiología del esclerocio se ve afectada por períodos prolongados de saturación del suelo, además de afectar la ecología de la microflora asociada, sobretodo en regiones con altas temperaturas.

Sin embargo, Crowe (1995) hace énfasis en que los esclerocios eventualmente mueren bajo condiciones de prolongada saturación de humedad en el suelo, pero esto depende de la temperatura, menciona que en regiones con climas fríos aunque las inundaciones reducen el número de esclerocios no lo hacen lo suficiente como para controlar la enfermedad a nivel comercial.

Estimulantes de la germinación de esclerocios. Se ha encontrado que al incorporar residuos de crucíferas al suelo se obtienen reducciones significativas de pudriciones de raíz, ya que estos residuos poseen un alto contenido de compuestos volátiles que contienen azufre en forma de sulfitos, isotiocianatos, mercaptanos y otros; algunos de estos semejantes a los exudados por plantas del género *Allium* (Clapp *et al.* 1959, Bailey *et al.* 1961, citados por Villar *et al.* 1990).

Villar *et al.* (1990), encontraron que la col (*Brassica oleracea* var. *capitata*) y el brócoli (*Brassica oleracea* var. *italica*) incorporadas en una proporción del 5 % (P/V) en suelo infestado con *S. cepivorum* (4 esclerocios g⁻¹ de suelo) redujeron significativamente el número de plantas muertas y el índice de enfermedad. Al respecto, Smolinska y Dyki (2002) mencionan que la adición de residuos de mostaza (*Sinapis alba*) redujo el número de esclerocios, debido a la alta concentración de isotiocianatos en esos tejidos, mientras que los residuos de nabo (*Brassica napus*) no afectaron la sobrevivencia de los propágulos.

En Canadá, Hovius y McDonald (2002) probaron la eficacia de 2 compuestos estimulantes de la germinación de esclerocios en suelo orgánico. Los compuestos (diallyl disulfuro y di-N-propyl disulfuro), fueron diluidos en agua e inyectados a suelo naturalmente infestado tanto en el campo como en el invernadero. En ambos experimentos se obtuvo una disminución de la sobrevivencia de los esclerocios, luego de 1 - 3 meses de exposición a las sustancias.

Los autores concluyen que, el diallyl disulfuro fue considerablemente más efectivo bajo condiciones de moderada presión de la enfermedad que el di-N-propyl disulfuro. Sin embargo, Papavizas y Lumsden (1980) advierten que el uso de este tipo de compuestos podría acarrear serios problemas, debido a los "ofensivos" olores emanados por los azufres orgánicos, además de los potenciales riesgos a la salud. El aceite artificial de cebolla también ha sido utilizado con éxito para provocar la germinación de esclerocios en momentos en que no está presente el cultivo (Merriman *et al.* 1981, citados por Cook y Baker 1983).

d. Control físico, según Adams (1987) la alta temperatura combinada con baja humedad del suelo reduce la supervivencia y actividad de los esclerocios de *S. cepivorum*. Así, a una temperatura de 35° C es posible dañar completamente el 50 % de los propágulos en 129,6 h, mientras que si la temperatura aumenta a los 50° C se requieren solamente de 0,8 h para lograr el mismo efecto. Este hongo es más sensible al calor que otros que producen esclerocios, por ejemplo *Sclerotinia minor*. El autor indica que la solarización con plástico claro debería aumentar la temperatura del suelo lo suficiente, como para reducir efectivamente la viabilidad de los esclerocios. Sin embargo, se debe tener en cuenta que la localización de los propágulos en el perfil del suelo es un factor determinante para el éxito de esta práctica de control.

En Australia y Egipto se han obtenido reducciones en la población de esclerocios mediante el uso de la solarización (Porter 1983, citado por Coley Smith 1990).

Este método es efectivo para reducir la densidad de inóculo inicial, tanto por el efecto físico del calor sobre los esclerocios, como por el favorecimiento de la microflora parasítica a *S. cepivorum* (Enwistle 1992, citado por Mesén 1997). En un estudio realizado por Lifshitz *et al.* (1983) con esclerocios de *S. rolfsii* se encontró un incremento en la colonización de estas estructuras tanto por bacterias como por actinomicetos (estreptomicetos). El calentamiento aumentó la frecuencia de rupturas superficiales de los esclerocios, así como las concentraciones de bacterias sobre o alrededor de estas grietas y se notó una disminución de 43 % en la incidencia de la enfermedad.

Al respecto, McLean *et al.* (2001) hallaron, en 2 experimentos separados, que la solarización redujo significativamente la viabilidad de esclerocios de *S. cepivorum* y además que los esclerocios recuperados estaban colonizados superficialmente por especies de *Trichoderma*, *Verticillium*, *Fusarium*, *Mucor*, *Aspergillus* y 4 especies de bacterias no identificadas.

Por otro lado, Thaning y Gerhardson (2001) citan que la viabilidad de los esclerocios de *S. cepivorum* no fue afectada, ni se presentó colonización sobre

los mismos, luego de que se cubriera el suelo con láminas de plástico oscuro por un período de 10 a 13 semanas.

Recientemente, Castillo y Albarracín (2003) informan que en parcelas solarizadas se redujo entre 5 y 18 % el número de esclerocios de *S. cepivorum*, así como su viabilidad y la incidencia de la enfermedad.

e. Control biológico, en este tipo de enfermedades está dirigido a disminuir la densidad de inóculo mediante antagonistas que destruyan los esclerocios o en algunos casos que eviten su formación (Cook 1979). Estos antagonistas pueden ser bacterias, hongos o ácaros (Ferguson 1953), al respecto Coley Smith y Cooke (1971) señalan que dentro de los factores que afectan la sobrevivencia de los esclerocios están los parásitos y depredadores, entre ellos cienpies, caracoles y larvas, además de los citados antes.

Existen informes que describen la capacidad antagónica tanto de bacterias como de hongos sobre *S. cepivorum* y otros hongos que forman esclerocios. Rai y Saxena (1975) concluyen que un gran número de hongos fueron encontrados colonizando esclerocios de *Sclerotinia sclerotiorum*, tanto in vitro como en condiciones de campo; los géneros que presentaron mayor actividad antagónica fueron *Penicillium* y *Aspergillus*.

Ayers y Adams (1981a), describen al hongo *Teratosperma oligocladum* como un micoparásito que se encuentra en forma natural en el suelo, que es capaz de invadir y destruir varias especies de hongos que forman esclerocios, entre los que se encuentra *Sclerotinia minor*. Los mismos autores (1981b), informan de la capacidad antagónica de *Sporidesmium sclerotivorum* para destruir los esclerocios de *S. sclerotiorum*, *S. minor* y *S. cepivorum*.

En 1982, Oliveira *et al.* evaluaron la acción antagónica de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* y *Penicillium* sp. sobre *S. cepivorum*. Los resultados mostraron alta eficiencia antagónica de los 3 hongos; así, *T. harzianum* destruyó las hifas del patógeno e inhibió su crecimiento en 65,6 %, mientras que *P. lilacinus* y *Penicillium* sp. redujeron la

colonia de *S. cepivorum* en 60,3 %. Por otro lado, Utkhede y Rahe (1983b) estudiaron 4 aislamientos de la bacteria *Bacillus subtilis* como agente de combate biológico y demostraron que ésta presenta un alto grado de estabilidad en la formación de la zona de inhibición in vitro, lo que indicó que la bacteria es un antagonista potencial.

Posteriormente, Mesén (1997) encontró que los hongos *Penicillium italicum*, una especie de *Trichoderma* y bacterias no identificadas fueron capaces de colonizar esclerocios o restos no viables de ellos, provenientes de suelo enmendado, tanto en el campo como en el laboratorio. Por otro parte, Tsigbey y Nutsugah (1999) informan que *Gliocladium catenulatum* se desarrolló naturalmente sobre el micelio de *S. cepivorum* y suprimió por completo su crecimiento; además, colonizó y deterioró los esclerocios.

Más recientemente, McLean y Stewart (2000) confirmaron el poder antagonista de los hongos *Chaetomium globosum*, *Coniothyrium minitans*, *T. harzianum*, *T. koningii* y *T. virens* contra *S. cepivorum* en ensayos de invernadero. En el mismo año se obtuvo más del 60 % de protección contra el patógeno, con la aplicación al suelo de suspensiones de esporas de aislamientos nativos de *Trichoderma* sp., *Chlonostachys* sp. y *Beauveria* sp. En el 2001, *T. harzianum* es un antagonista potencial en el combate de la pudrición blanca en ajo, ya que presentó capacidad de invasión entre 50 y 75 % sobre el patógeno en ensayos in vitro. Al respecto, Peyghami (2001) cita que el mecanismo por el cual *T. harzianum* y *T. viride* actúan es el enrollamiento de hifas, la deformación y la lisis.

f. Control integrado, Ortiz (1985) probó la utilización conjunta y separada de solarización (utilizando lámina de polietileno de 0.05 mm de espesor por 3 meses durante la temporada de verano), adición de materia orgánica y de extracto de cebolla (310 ml/m²) en México. De acuerdo a los resultados obtenidos, las parcelas que recibieron las 3 tácticas de forma conjunta presentaron disminución de la incidencia y aumento en la producción de cebolla.

Coley Smith (1990) afirma que esta enfermedad no se puede combatir con la utilización de uno de los métodos de forma separada. Se debe trabajar con una estrategia de integración de tácticas de control, para lograr que sea satisfactorio, que involucre en primera instancia el muestreo de suelo para medir la población de esclerocios.

Por otra parte, es alentador saber de algunos agricultores de la zona que están incorporando a su plan de manejo productos biológicos a base de *Trichoderma* spp., sobretodo en la etapa de almácigo. Ellos mencionan que no dejan de usar los productos químicos, pero que iniciaron con los biológicos porque: “hay que probar nuevas alternativas, ya que esta enfermedad es difícil de controlar”, “es bueno usar cosas que contaminen menos” y “dicen que son hongos buenos que matan las enfermedades”. Los productores saben que el manejo de la enfermedad con productos biológicos es gradual y que los resultados se notan a mediano o largo plazo, pero que esto les traerá grandes beneficios. Sin embargo, otros productores piensan que: “es mejor usar el control químico que gastar dinero en algo que no se sabe si va a funcionar”. Lo cierto es que, aunque hay muchos agricultores que no conciben la filosofía del control biológico como una estrategia útil para sus cultivos, sus terrenos o su salud; sí existen algunos que empiezan a extender su visión hacia una alternativa novedosa y eficaz, que pretende mejorar la sanidad de su cultivo, su calidad de vida y la del consumidor. Cada agricultor identificado con nuevas estrategias de combate representa un paso hacia la obtención de una cultura agrícola de calidad (Granados 2004).

2.8. Generalidades del ajo (*Allium sativum*)

Allium sativum, el ajo, es una especie de planta tradicionalmente clasificada dentro de la familia de las liliáceas pero que actualmente se ubica en la de las amarilidáceas, aunque este extremo es muy discutible, y discutido (Stevens 1999).

Según Delgadillo *et al.* (2002) es una planta perenne con hojas planas y delgadas, de hasta 30 cm de longitud. Las raíces alcanzan fácilmente profundidades de 50 cm o más. El bulbo, de piel blanca, forma una cabeza dividida en gajos que comúnmente son llamados **dientes**. Cada cabeza puede contener de 6 a 12 dientes, cada uno de los cuales se encuentra envuelto en una delgada capa de color blanco o rojizo. Cada uno de los dientes puede dar origen a una nueva planta de ajo, ya que poseen en su base una yema terminal que es capaz de germinar incluso sin necesidad de plantarse previamente. Este brote comienza a aparecer luego de los tres meses de cosechado, dependiendo de la variedad y condiciones de conservación.

Las flores son blancas, y en algunas especies el tallo también produce pequeños bulbos o hijuelos. Un par de semanas antes de que el ajo esté dispuesto para ser cosechado, brota un vástago redondo que tiende a enroscarse que le llaman porrino; este porrino es una delicia gastronómica. Una característica particular del bulbo es el fuerte olor que emana al ser cortado. Esto se debe a dos sustancias altamente volátiles, alicina y disulfuro de alilo. Los requisitos ambientales para su cultivo son suelos con buen drenaje, preferentemente francos o algo arcillosos, ricos en materia orgánica y con humedad. Se adaptan con facilidad en suelos cultivados previamente con cereales. Riego permanente hasta el período anterior a la cosecha. Fertilización superior a otras hortalizas. Desmalezamiento del suelo, principalmente durante el primer período de germinación. Temperaturas inferiores a los 17 °C. La plantación se realiza en invierno o principios de primavera, cuando el diente ya ha brotado y el nuevo tallo alcanza un 50 % de la longitud del diente. Es importante seleccionar los dientes destinados a plantar, debiendo escoger los más sanos y representativos de la variedad para conservar sus cualidades (Balch 2000).

Al momento de la recolección se determina el uso posterior que se dará a los bulbos. Si el objetivo es obtener semillas para una siembra posterior, deben cosecharse cuando las hojas comienzan a marchitarse. En cambio, si se destinaran al consumo, no hay que esperar a que las hojas se sequen completamente. El ciclo completo, desde la germinación hasta la recolección de los nuevos bulbos, tarda aproximadamente ocho meses. Una vez finalizada la

cosecha, los bulbos deben mantenerse en un lugar tibio, soleado y con buena ventilación durante dos o tres semanas, para que se sequen o curen. Los cultivos de ajo deben rotarse después de tres años como máximo, para evitar el agotamiento del suelo. Las condiciones más apropiadas de conservación son 0 °C y 65 - 70 % de humedad relativa. En tales condiciones, el almacenamiento puede prolongarse hasta 6 - 7 meses. Durante la conservación, los bulbos son poco sensibles al etileno (Kader 2002).

2.8.1. Uso gastronómico

Según Delgadillo *et al.* (2002), el ajo se emplea en la cocina como un saborizante natural. Posee un aroma y un sabor característico que suele acompañar ciertos platos de la cocina mediterránea. Los brotes tiernos de las hojas se suelen incluir en algunos platos. Estos brotes pueden ser preparados como si fueran espárragos, aunque el consumo del bulbo es mucho más habitual. Generalmente se utilizan secos o semisecos, como ajo deshidratado, verdes y en encurtidos.

2.8.2. Uso medicinal

En la actualidad, el ajo es una medicina naturista y tiene una amplia utilización farmacológica. Es eficaz como antibiótico, combatiendo numerosos hongos, bacterias y virus (se ha usado en al menos un paciente con Síndrome de inmunodeficiencia adquirida SIDA para tratar una toxoplasmosis, una enfermedad protozoaria; en el control de enfermedades cardíacas, ya que reduce el bloqueo de las arterias); reduce la presión arterial y el colesterol; incrementa el nivel de insulina en el cuerpo; controla los daños causados por la arterioesclerosis y el reumatismo. También se relaciona con la prevención de ciertos tipos de cáncer, ciertas complicaciones de la diabetes mellitus, en la reversión del estrés y la depresión. De acuerdo a los efectos medicinales buscados, varía la forma en que deben ser ingeridos, ya que el ajo posee diferentes propiedades crudo o cocido. Cuando el ajo crudo es cortado o machacado, se produce la combinación de la aliina con la alinasa, lo que produce

una sustancia denominada alicina. Ésta tiene varios efectos benéficos, en cambio si el ajo es cocinado, este compuesto se destruye. En el proceso de cocción se liberan compuestos diferentes, como la adenosina y el ajoeno, que poseen cualidades anticoagulantes y reducen el nivel de colesterol. La virtud antihipertensiva y por ende favorable a la actividad cardíaca y disminuidora de riesgos de accidentes cerebro vasculares o ictus cerebral está perfectamente demostrada: la alicina tiene como principal compuesto el sulfuro de hidrógeno el cual facilita la distensión de las membranas celulares vasculares disminuyendo de este modo la presión sanguínea y favoreciendo la circulación y el transporte de oxígeno mediante la hemoglobina de los glóbulos rojos a los órganos y, por consecuencia, implicando una menor fatiga (estrés) para el corazón; lo que ha sido puesto en dudas es la capacidad del ajo para reducir el LDL colesterol (lipoproteína de baja densidad o "colesterol malo") en la sangre y la formación de ateromas; aunque sí posee una acción sobre las plaquetas, por lo que se desaconseja el consumo de suplementos de ajo si no es bajo responsabilidad médica ya que los suplementos artificiales de ajos o su ingesta excesiva puede afectar la correcta actividad de la coagulación e hiperlipidemia (Sovova y Sova 2004).

No se ha demostrado científicamente que las personas que ingieren ajo no son picadas por los mosquitos. Es importante destacar que es un repelente natural no tóxico para el control y erradicación del Caracol Africano (*Achatina fulica*), así también como el Cedro (*Cedrus deodara*). También se usa el ajo en vía tópica para combatir las verrugas, además de ser también un eficaz vermífugo por vía oral (perlas de ajo). Hay una larga tradición de uso en la medicina herbaria, que ha utilizado el ajo para la ronquera y la tos (Rahman 2007).

2.8.3. Composición química

El ajo contiene sulfóxido (2.3 %). Derivados del alquilcisteína como allínes (alilalliína, propenilalliína y metilalliína), aceites esenciales (0.2 - 0.3 %) como la garlicina o el sulfóxido de alilcisteína del bulbo intacto. Cuando el bulbo es triturado o partido, la alliína (inodora) hidroliza por la allinasa produciendo alicina

(responsable del olor característico del ajo), que se transforma rápidamente en disulfuro de alilo. Polisacáridos homogéneos. Fructosanes (hasta un 75 %). Saponinas triterpénicas (0.07 %). Sales minerales (2 %): hierro, sílice, azufre y yodo. Pequeñas cantidades de vitaminas (A, B1, B3, B6, C) y adenosina. En general las características del ajo dependen de la riqueza del suelo donde crece. La planta da por destilación 0,25 % de aceite esencial (Rahman 2007).

2.9. Generalidades de manejo integrado

El manejo integrado se inició a fines de la década de 1950 como una reacción a las deficiencias y complicaciones que se detectaron en el uso de plaguicidas en la protección de los cultivos. Las deficiencias se hicieron evidentes: a) cuando las plagas mostraron capacidad para desarrollar resistencia a las aplicaciones de insecticidas; b) cuando aparecieron nuevas plagas como consecuencia de la destrucción de sus enemigos naturales por el uso extensivo de insecticidas; y c) cuando los costos de protección de los cultivos llegaron a niveles insostenibles para los agricultores. Esto sucedió debido al incremento en el número de aplicaciones requeridas, la necesidad de aumentar las dosis, y el aumento en el precio de los productos (Cisneros 1995).

La FAO, en 1967, lo definió como un sistema de regulación de las poblaciones de los diferentes agentes nocivos que, teniendo en cuenta su medio ambiente particular y su dinámica de sus poblaciones, utiliza todas las técnicas y métodos apropiados de forma compatible, a fin de mantenerlos en niveles que no causen daños económicos. Según la Organización Internacional de Lucha Biológica, es el procedimiento de lucha contra los organismos nocivos que utiliza un conjunto de métodos que satisfagan a la vez las exigencias económicas, ecológicas y toxicológicas, dando prioridad a la utilización de factores y elementos naturales de limitación, respetando los umbrales de tolerancia (Pérez 2000).

El manejo integrado es un enfoque ecológico que toma en cuenta las relaciones que existen entre todos los componentes de agroecosistema, en particular las relaciones de la plaga con la planta cultivada (susceptibilidad, resistencia), con

sus enemigos naturales, con las condiciones físicas, mecánicas y agronómicas del medio (prácticas culturales), y maneja los estímulos que determinan el comportamiento de los insectos o patógenos. En el caso de recurrir al uso de agroquímicos, éstos deben ser lo más selectivos posible para reducir su efecto negativo sobre los otros componentes del agroecosistema, que puede provocar aparición de resistencia, residuos, contaminación, intoxicaciones y destrucción de los controladores biológicos (Vela y Quispe 2013).

Los microorganismos entomopatógenos de importancia universal corresponde a *Bacillus thuringiensis*, esta bacteria tiene la particularidad de producir toxinas nominadas *Delta endotoxina*, *Phospholipasa C* y *Beta exotoxina*, los que actúan contra los insectos. *Beauveria bassiana*, hongo entomopatógeno de importancia para controlar diferentes insectos de los cultivos (Valenzuela 1987), *Aegerita webberi*, *Cordyceps* sp., de singular importancia para utilizarlo como controlador biológico (René 1990), *Paccylomyces lilacynus* es un hongo saprofito que parasita larvas de insectos y nematodos (Roncal 1995), *Trichoderma viride* es antagónico contra diferentes fitopatógenos fungosos de suelo, incluso contra los entomopatógenos *Beauveria bassiana*, *Metarhiziumanisopliae* y *Pochonia chlamydosporia*. *Pseudomonas* sp. en condiciones in vitro muestra antagonismo contra *Lasiodiplodia theobromae*, patógeno del mango (*Manguiфера indica*) en Piura (Romero 1988).

Stemphylium vesicarium, agente causal de la mancha púrpura y tizón en espárrago, fue tratado convenientemente con diferentes especies de bacterias obtenidos de la filosfera de este hospedero, estas bacterias fueron identificadas como *Pseudomonas putida* Biotipo B (ENA-12) y *Bacillus cereus* GC sub grupo A (ENA-24) (Gastón 1999).

En condiciones in vitro, mediante el enfrentamiento dual de *Trichoderma harzianum*, *Trichoderma lignorum* y *Bacillus subtilis* contra el patógeno de la vid *Phaeoacremonium parasiticum* se determinó que las cepas de hongos antagónicos se desarrollan sobre el micelio del hongo patógeno; de igual manera ocurre con *B. subtilis* (Romero 1988).

2.10. Referencias de antagonicos

2.10.1. Microorganismos antagonicos a fitopatogenos

Pseudomona putida, bacteria antagonica a *Rhizopus* sp.. La bacteria metaboliza productos de comportamiento antagonico al hongo, no permitiendo el proceso de patogénesis en frutos recién cuajados de granadilla (*Passiflora ligularis*) (Gastón 1999).

Reportes de antagonismos en condiciones in vitro, utilizando cepas de *Pseudomona putida* y de *Bacillus* sp., contra *Colletotrichum gloesporioides*, causante de antracnosis en frutos post cosecha de mango (*Mangifera indica*), con resultados satisfactorios y que actualmente se requieren para fruta de exportación con el membrete de mango orgánico (Neira et al. 2006).

Trichoderma sp., hongo de suelo de fácil crecimiento en medio de cultivo sintético PDA, tiene comportamiento antagonico contra *Monillaphothoraro reri*, que induce la moniliasis en cacao (*Teobrabroma cacao*), actualmente forma parte del programa de manejo integrado del cultivo de caca en la selva peruana (Soberanis et al. 2009). *Microbacterium* sp., es un microorganismo con potencial biocontrolador contra la pudrición negra del café, causada por *Rosellina* sp., que ataca a las raíces y la base de las plantas, induciendo síntomas de amarillamiento y defoliación (Castañeda y Roncal 2011).

2.10.2. Efecto antagonico de aceites y extractos vegetales a fitopatogenos

El aceite de la piperácea *Piper aduncum* (matico) en condiciones in vitro a concentraciones: 1, 2, 5 y 10 ug/ml inhiben el crecimiento del micelio de *Monillophora raroreri* en un 100%, los mismos resultados se encontraron con *Collerostrichum* sp., a concentraciones de 5 a 10 ul/ml inhibiendo el crecimiento de *Marasmius perniciosus*; mientras que con *Lasiodiplodia* sp. el efecto fue menor, llegando a inhibir solo un 12 % con la dosis alta (Arévalo 2009). En medios de cultivo elaborados a base de *Sinapis alba* (mostaza), *Raphanus raphanistrum* (rábano silvestre) y *Brassica oleracea* (brócoli), el crecimiento de *Sclerotium cepivorum* no prosperó, indicando que estas especies poseen sustancias antagonicas al hongo (Hernández 2012).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y MÉTODOS

3.1. Ubicación del experimento

Se realizó en campo y laboratorio.

El material vegetal con el fitopatógeno se obtuvo de campos agrícolas del Centro Poblado Pariamarca, ubicado en los meridianos 78° 29' 13" de longitud oeste y entre los paralelos 07° 12' 43" de latitud sur.

La identificación del patógeno se realizó en el Laboratorio de Fitopatología, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, ubicada entre los meridianos 78° 30' y 78° 32' de longitud oeste y entre los paralelos 07° 08' y 07° y 10' de latitud sur, Km. 3 de la carretera Cajamarca – Baños del Inca, a una altitud de 2 750 msnm.

3.2. Materiales

3.2.1. Material biológico

Raíces y bulbos de ajo, infectado con el hongo *Sclerotium cepivorum*.

3.2.2. Material de laboratorio

a. Equipos: cámara de flujo laminar, incubadora, estufa, autoclave, mecheros, aspersores, cocina.

b. Equipo óptico: lupa, estereoscopio, microscopio compuesto y cámara fotográfica.

c. Material de vidrio: placas Petri, tubos de ensayo, matraz de Erlenmeyer, láminas porta y cubre objetos.

d. Desinfectantes: hipoclorito de sodio al 5 %, alcohol etílico 70°, detergente, jabón.

e. Otros materiales: bata de protección, papel, cuaderno de apuntes, bolsas de polietileno, depósitos de plástico con cierre hermético, cinta masking, tapers, tijeras, pinzas.

3.3. Metodología

3.3.1. Trabajo en campo

Plantas con síntomas de pudrición blanca, se recolectaron y se dispusieron en depósitos asépticos de plástico de 250 g de capacidad, de esta manera se condujo al laboratorio.

3.3.2. Trabajo en laboratorio

a. Colección de esclerocios

Con ayuda de un estereoscopio se detectaron estructuras de *S. cepivorum* que causa la “pudrición blanca” en los bulbos de ajo. La separación se realizó haciendo uso de una aguja hipodérmica y se almacenó en un tubo de ensayo, manteniéndose en refrigeración por el tiempo que duró el experimento.

b. Crecimiento y desarrollo de *Sclerotium cepivorum* en PDA

La evaluación de crecimiento y desarrollo del *S. cepivorum* en PDA, se realizó con la finalidad de determinar el comportamiento de formación de las estructuras de conservación.

La siembra de esclerocios se realizó en ocho placas Petri con medio PDA; disponiéndose tres esclerocios en el centro de cada placa, se incubaron a 22° C; registrándose en horas el tiempo que demoró el brotamiento, manifestación de micelio, llenado de la placa y días de formación de esclerocios.

c. Preparación de Kombucha

En un litro de agua corriente se hizo hervir por tres minutos 5 g de té negro comercial; después de dejar enfriar al ambiente, esta infusión se pasó a un recipiente de cristal de dos litros de capacidad, cuidando no dejar pasar los restos sólidos del té a través de un tamiz de 1.8 mm.

Después de 24 horas, se agregó 100 g de azúcar, diluyéndolo por agitación; inmediatamente se dispuso el cuerpo fructífero del complejo hongo – bacteria.

Transcurridas 48 horas, el sabor común del té en infusión, cambia; éste nuevo líquido tiene sabor agradable único en su género; después de 72 horas el sabor y olor corresponden a fermento aún agradable al paladar: transcurrido 96 horas se concentra el alcohol, no recomendable su consumo como refresco; a partir de 120 horas el sabor y olor es penetrante y corresponde a un producto acidificado consecuencia de la degradación del alcohol a ácido acético.

Parte del cuerpo fructífero de Kombucha, a partir del octavo día de fermentación, cuando la concentración de hidrogeniones se encuentra en el rango de 2.7 a 3.2 de pH, como consecuencia de fermentación, se transfiere a una nueva solución de té azucarado.

Transcurrido ocho días de fermentación, la solución se deja madurar por cinco días más, para obtener una mayor cantidad de ácido acético a base de fermentación y los metabolitos de las bacterias.



Fig. 4. Kombucha concentrada lista para preparar diluciones.

d. Preparación de las diluciones de Kombucha

Para preparar las diluciones se usaron cinco tubos de ensayo de 15 ml de capacidad. A tres tubos de ensayo se vertieron 9 ml de agua destilada estéril. Del tubo patrón que contiene 10 ml de Kombucha concentrada.

Del concentrado “C” de Kombucha se pipetea 1 ml al tubo “a”, obteniendo la concentración de 1/10; de ésta se pipetea 1 ml al tubo “b” obteniendo la concentración de 1/100; de ésta se pipetea 1 ml al tubo “c”, obteniendo la concentración de 1/1000.

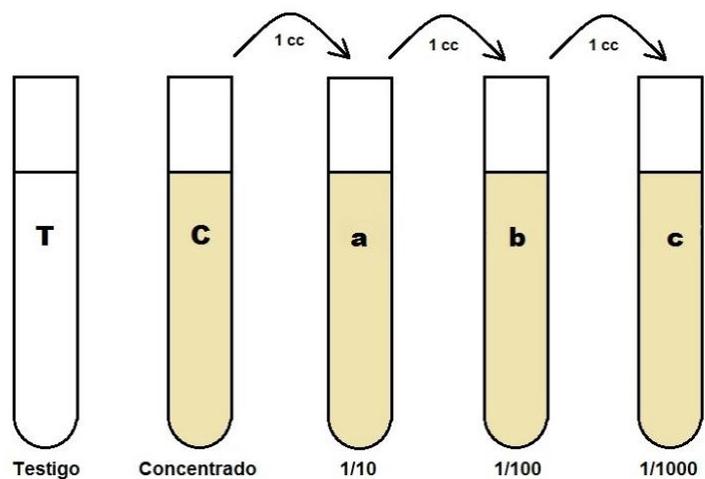


Fig. 5. Gráfica de la obtención de las diluciones. (T) testigo, (C) concentrado, (1/10) dilución uno en 10, (1/100) dilución uno en 100 y (1/1000) dilución uno en 1000.

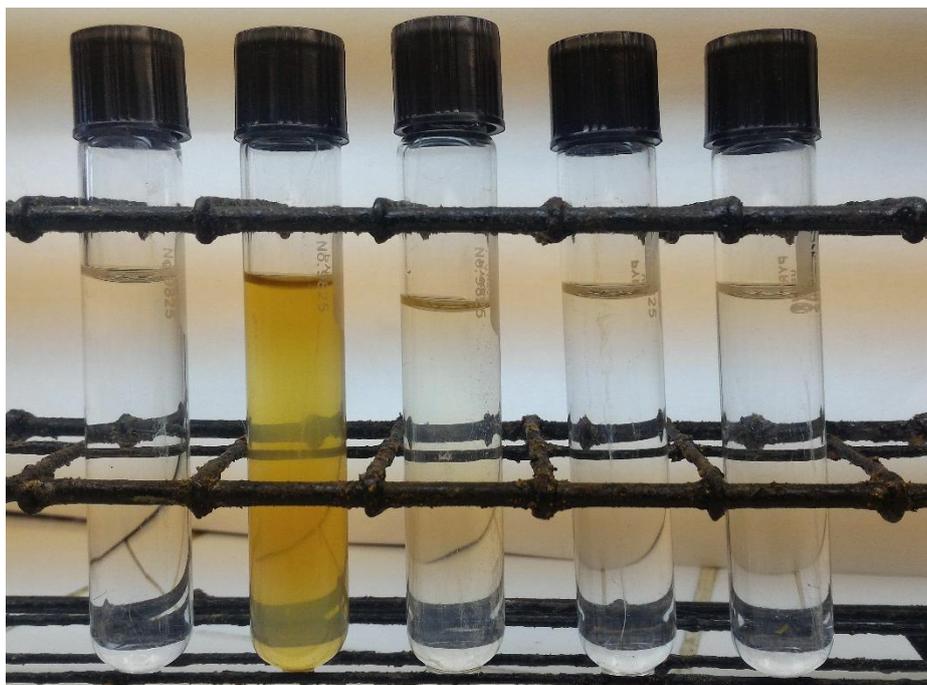


Fig. 6. Diluciones de Kombucha.

3.3.3. Ensayos de antagonismo de Kombucha contra *Sclerotium cepivorum* en condiciones “in vitro”

a. **Efecto de diluciones de Kombucha frente a esclerocios de *S. cepivorum***, este experimento se instaló en diez placas Petri con medio de cultivo PDA. En el centro de cada placa Petri se sembró esclerocios de *S. cepivorum*, inmediatamente sobre los esclerocios se dejó caer dos gotas de Kombucha concentrada y diluida según el modelo de la Tabla 1.

Cada 24 horas se realizaron las evaluaciones de crecimiento del micelio, durante 21 días.

Tabla 1. Forma de aplicación de diluciones de Kombucha, en el brotamiento de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*.

Tratamientos		Descripción
Nº	Clave	
1	E. Sc + K. c.	Esclerocios de <i>S. cepivorum</i> más Kombucha concentrada
2	E. Sc + K. c 1/10	Esclerocios de <i>S. cepivorum</i> más Kombucha diluida 1/10
3	E. Sc + K. c 1/100	Esclerocios de <i>S. cepivorum</i> más Kombucha diluida 1/100
4	E. Sc + K. c 1/1000	Esclerocios de <i>S. cepivorum</i> más Kombucha diluida 1/1000
5	E. Sc + Agua Testigo	Esclerocios de <i>S. cepivorum</i> más Agua destilada esteril

b. **Efecto de diluciones de Kombucha sobre micelio de *Sclerotium cepivorum***, se instaló en diez placas Petri con medio de cultivo PDA y cuando el micelio del hongo había cubierto la totalidad del medio.

El ensayo consistió en dejar caer dos gotas de Kombucha concentrada y las diluciones respectivas, como se explica en la Tabla 2.

Las evaluaciones cada 24 horas, durante 21 días consistieron en determinar cómo es afectado el micelio:

Se funde, aumentando el área cada 24 horas.

Se incentiva o inhibe la formación de esclerocios, ante la adversidad.

Tabla 2. Forma de aplicación de diluciones de Kombucha, en el micelio de *Sclerotium cepivorum*.

Tratamientos		Descripción
Nº	Clave	
1	M. Sc + K. c.	Micelio de <i>S. cepivorum</i> más Kombucha concentrada
2	M. Sc + K. c 1/10	Micelio de <i>S. cepivorum</i> más Kombucha diluida 1/10
3	M. Sc + K. c 1/100	Micelio de <i>S. cepivorum</i> más Kombucha diluida 1/100
4	M. Sc + K. c 1/1000	Micelio de <i>S. cepivorum</i> más Kombucha diluida 1/1000
5	M. Sc + Agua Testigo	Micelio de <i>S. cepivorum</i> más Agua destilada esteril

c. Efecto de difusión de metabolitos de las diluciones de Kombucha sobre esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, se instaló 15 placas Petri, con medio de cultivo PDA.

Con el propósito de facilitar la difusión de los metabolitos antagónicos de los microorganismos que conforman Kombucha; en el centro de cada placa se dejaron caer 0.08 ml de Kombucha concentrada y de las diluciones respectivas. Después de 24 horas se sembraron filamentos y esclerocios del hongo, realizando observaciones cada 24 horas durante 288 horas (12 días). Ver Tabla 3.

Tabla 3. Forma de aplicación de la difusión de las diluciones de Kombucha en esclerocios de *Sclerotium cepivorum*.

Tratamientos		Descripción
Nº	Clave	
1	K. c. + M. Sc	Kombucha concentrada difundida durante 24 horas más micelio de <i>S. cepivorum</i>
2	K. c 1/10 + M. Sc	Kombucha diluida 1/10, difundida durante 24 horas más micelio de <i>S. cepivorum</i>
3	K. c 1/100+M. Sc	Kombucha diluida 1/100, difundida durante 24 horas más micelio de <i>S. cepivorum</i>
4	K.c 1/1000+ M.Sc	Kombucha diluida 1/1000, difundida durante 24 horas más micelio de <i>S. cepivorum</i>
5	Agua + M. Sc Testigo	Agua difundida durante 24 horas más micelio de <i>S. cepivorum</i>

3.3.4. Ensayos de antagonismo de microorganismos que conforman Kombucha contra *Sclerotium cepivorum* en condiciones “in vitro”

Para determinar el efecto antagónico de dos diferentes microorganismos que conforman Kombucha, se procedió a realizar los ensayos de antagonismo utilizando *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp.

La experimentación se realizó haciendo uso del método de “cultivos duales”; que consiste en enfrentar al microorganismo antagónico frente al patógeno, como se muestra en la Tabla 4 y Fig. 7.

En placas Petri con medio PDA, y en forma individual se sembraron equidistantemente *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp. frente a esclerocios de *S. cepivorum* (Fig. 8). La distancia entre el fitopatógeno y los antagónicos fue de tres centímetros. Para cada antagónico se realizaron tres repeticiones, se incubaron a 22 °C durante 12 días.

Tabla 4. Tratamientos de antagonismo de *Saccharomyces* sp y *Zygosaccharomyces* sp. frente a *S. cepivorum* por el método de cultivos duales.

Tratamientos	Clave	Descripción
T1	Sa.Sc	<i>Saccharomyces</i> sp frente a <i>S. cepivorum</i>
T2	Zy.Sc	<i>Zygosaccharomyces</i> sp. frente a <i>S. cepivorum</i>
T3	Sa	<i>Saccharomyces</i> sp
T4	Zy	<i>Zygosaccharomyces</i> sp.
T5	Sc	<i>Sclerotium cepivorum</i>

Las evaluaciones se realizaron cada 24 horas, midiendo el crecimiento del micelio del patógeno y el incremento en población de los antagonicos.

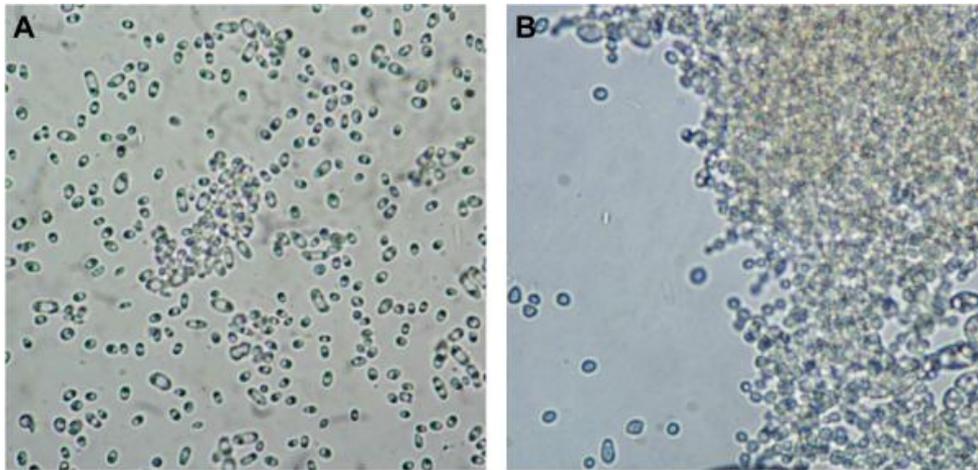


Fig. 7. *Saccharomyces* sp. (A); *Zygosaccharomyces* sp. (B).

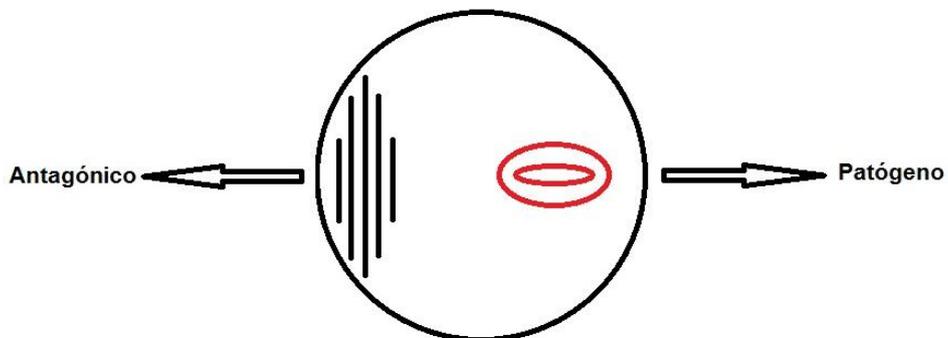


Fig. 8. Esquema del método de **cultivos duales** en placa Petri.

Después de 24 a 72 horas de incubación a 22° C, se evaluó el efecto antagónico mediante el porcentaje de inhibición (% I) del crecimiento radial del patógeno, aplicando la ecuación de Royse and Ries:

$$\%I = 100 \times [(r1 - r2)/r1]$$

Dónde: **r1** = Crecimiento radial del patógeno.
r2 = Crecimiento radial del patógeno, en orientación directa al crecimiento del antagonista.

3.3.5. Viabilidad de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* por tiempo de inmersión en diluciones de Kombucha

Se sumergieron esclerocios en líquido Kombucha de 12 días de fermentación, para comprobar la viabilidad se sembraron en medio de cultivo PDA, considerando el tiempo de sumersión en minutos, como se indica en la Tabla 5.

Tabla 5. Viabilidad de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* sumergidos en Kombucha.

Tratamientos		Descripción
Nº	Clave	
1	E. Sc. K (1')	Esclerocios sumergidos en Kombucha 1'
2	E. Sc. K (5')	Esclerocios sumergidos en Kombucha 5'
3	E. Sc. K (15')	Esclerocios sumergidos en Kombucha 15'
4	E. Sc. K (30')	Esclerocios sumergidos en Kombucha 30'
5	E. Sc. K (60')	Esclerocios sumergidos en Kombucha 60'
6	E. Sc. Agua	Esclerocios sumergidos en agua

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Crecimiento y desarrollo de *Sclerotium cepivorum* en PDA

Los esclerocios se sembraron en medio de cultivo PDA dispuesto en placas Petri de 5 cm de diámetro e incubados a 22° C.

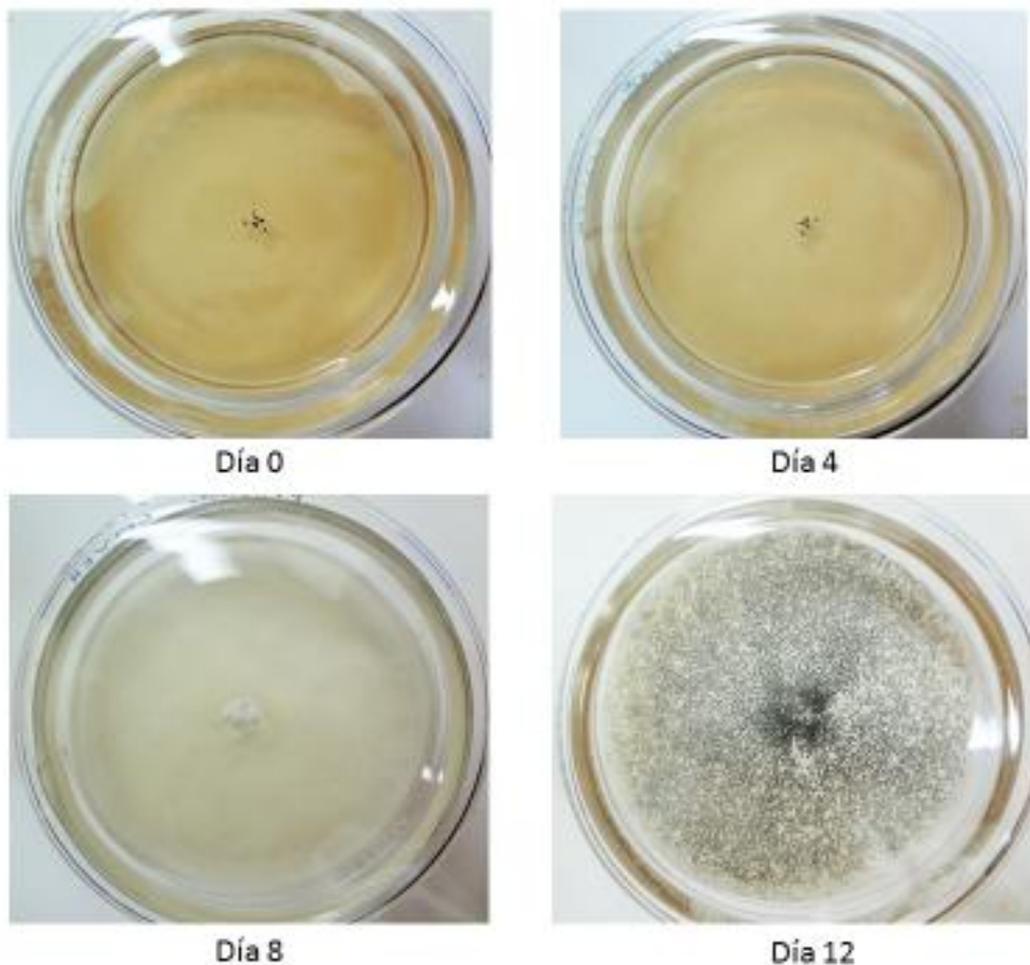


Fig. 9. Crecimiento y desarrollo de *Sclerotium cepivorum* en PDA. **Día 0:** siembra de inóculo. **Día 4:** esclerocios en brotamiento. **Día 8:** presencia de micelio. **Día 12:** formación de esclerocios en la superficie de PDA.

Los esclerocios brotan a partir de las 12 horas de siembra, el micelio cubre la placa a los ocho días; la formación de esclerocios se muestra dos días después; esta formación continúa, hasta el agotamiento del sustrato PDA que ocurre a los 45 días. El fondo de la placa Petri se cubre de esclerocios; indicando que el hongo adquiere la denominada latencia constitutiva como lo menciona Agrios (1996), la fisiología de los organelos celulares se limitan al máximo, hasta encontrar condiciones adecuadas de humedad, temperatura, aireación, luz y el hospedero susceptible para iniciar el brotamiento y la infección respectiva como lo menciona Roncal (2004).

4.2. Efecto antagónico de diluciones de Kombucha frente a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk.

De la Tabla 6 y Fig. 29 (ver Anexo 2), se deduce que **Kombucha concentrada** aplicada sobre esclerocios, no permitieron la formación del micelio del hongo; indicando que los metabolitos de *Saccharomyces* sp y *Zygosaccharomyces* sp., inhibieron el brotamiento de éstos. Como se observa en la Fig. 10. Este resultado coincide con los reportes de Miranda y Roncal (2014), contra el crecimiento y desarrollo del micelio de los hongos *Rhizoctonia solani*, *Verticillium* sp. y *Fusarium* sp.

Tabla 6. Inhibición del brotamiento de *S. cepivorum* tratados con Kombucha.

Concentración de Kombucha	Crecimiento y desarrollo de microorganismos					
	5 días	INH	10 días	INH	15 días	INH
K. c	<i>Sacch.</i> sp. <i>Zygo.</i> sp.	+	<i>Sacch.</i> sp. <i>Zygo.</i> sp.	+	<i>Sacch.</i> sp. <i>Zygo.</i> sp.	+
K. 1/10	<i>Sacch.</i> sp. <i>Zygo.</i> sp.	+	<i>Sacch.</i> sp. <i>Zygo.</i> sp. <i>S. cepivorum</i>	-	<i>Sacch.</i> sp. <i>Zygo.</i> sp. <i>S. cepivorum</i>	-
K. 1/100	<i>Sacch.</i> sp. <i>Zygo.</i> sp. <i>S. cepivorum</i>	-	<i>Sacch.</i> sp. <i>Zygo.</i> sp. <i>S. cepivorum</i>	-	<i>Sacch.</i> sp. <i>Zygo.</i> sp. <i>S. cepivorum</i>	-
K. 1/1000	<i>Sacch.</i> sp. <i>Zygo.</i> sp. <i>S. cepivorum</i>	-	<i>Sacch.</i> sp. <i>Zygo.</i> sp. <i>S. cepivorum</i>	-	<i>Sacch.</i> sp. <i>Zygo.</i> sp. <i>S. cepivorum</i>	-
Testigo	<i>S. cepivorum</i>	-	<i>S. cepivorum</i>	-	<i>S. cepivorum</i>	-

* (+) Inhibición activa y, (-) Inhibición limitada o nula.

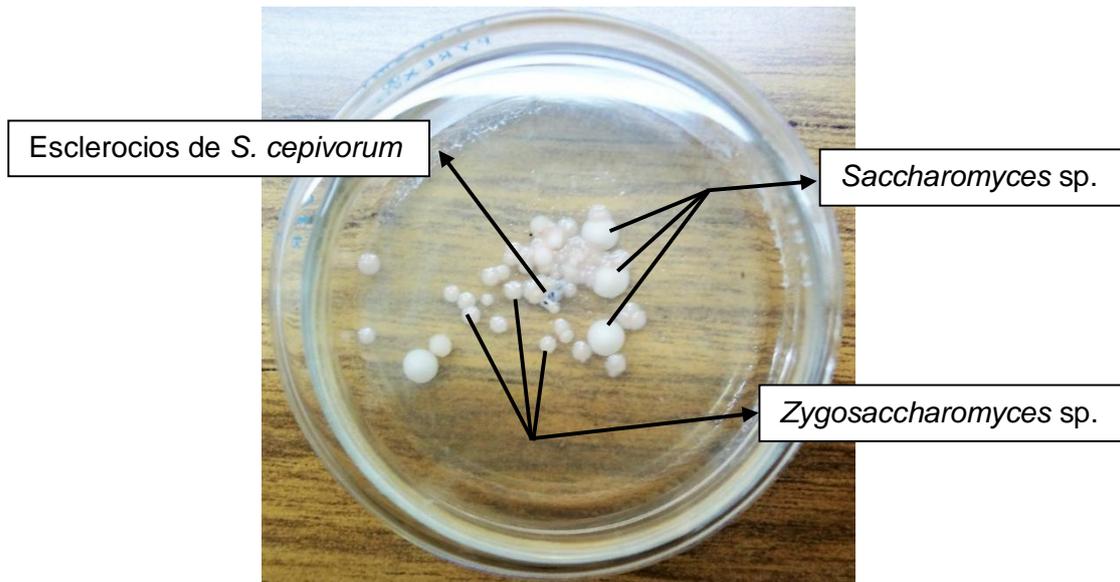


Fig. 10. Inhibición del brotamiento de esclerocios de *S. cepivorum*, tratado con el **concentrado** de Kombucha; presencia de colonias de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp.

A partir de las diluciones 1/10, seguido de 1/100 y 1/1000; en forma secuencial se observó que existe formación del micelio de *S. cepivorum*, en forma limitada y con pérdida del color blanco cremoso característico en medio PDA; además no se formaron esclerocios; sucediendo lo contrario con el crecimiento y desarrollo del hongo sin tratamiento como se muestra en la Fig. 11.



Fig. 11. Filamentos y esclerocios de *Sclerotium cepivorum* en PDA.

La **dilución 1/10** de Kombucha, permitió la formación de micelio del hongo a partir del **décimo** día de incubación, pero en forma reducida (Fig. 12). Debido a que el producto antagónico ha inhabilitado a casi la totalidad de las células del esclerocio. Deduciendo que las células responsables del brotamiento son las centrales, las que no han tenido contacto directo con los metabolitos antagónicos de Kombucha. Este resultado coincide con lo reportado por Miranda y Roncal (2014) frente a esclerocios de *Rhizoctonia solani*, que dice que la Kombucha tiene comportamiento antagónico selectivo, ya que solo algunas células del pseudo parénquima son afectadas y otras no.



Fig. 12. Colonias de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp. en la dilución 1/10.

La **dilución 1/100** de Kombucha, permitió el brotamiento de los esclerocios entre **ocho** y **nueve** días y la **dilución 1/1000** entre **siete** y **ocho** días de incubación. En ambos casos el micelio del hongo tuvo desarrollo limitado por lo que dejaron ver a las colonias de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp., como se observa en la Fig. 13; además en este micelio no se formaron esclerocios, esto nos indica que los metabolitos antagónicos limitan la formación de componentes de la cubierta de la estructura de conservación que le da la coloración negra característica. Este resultado coincide con lo reportado por Miranda y Roncal (2014), frente a esclerocios de *Rhizoctonia solani*, donde no hubo efecto antagónico y el desarrollo fue normal, utilizando las mismas diluciones de Kombucha.

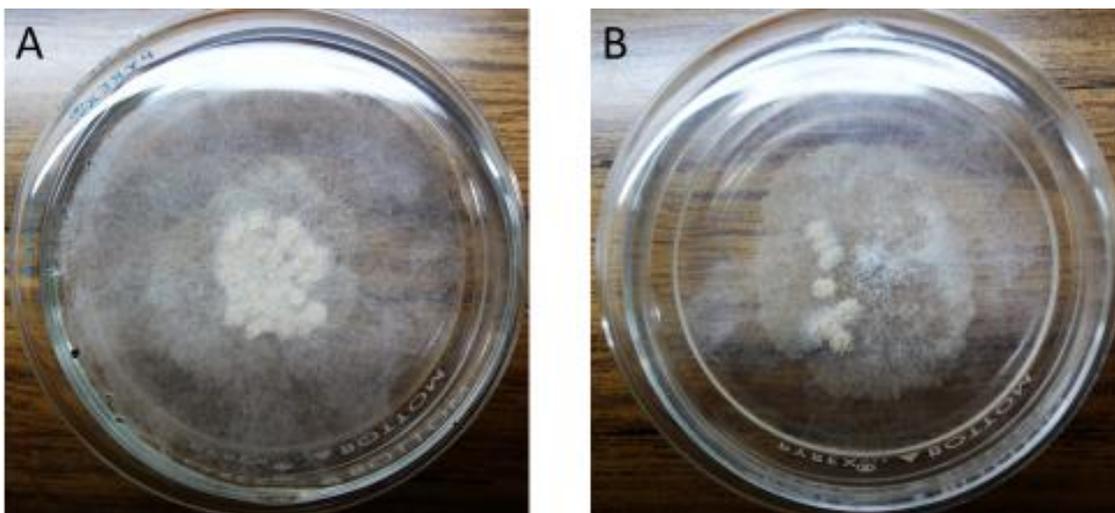


Fig. 13. Limitada formación de hifas y ausencia de esclerocios de *S. cepivorum*, causado por el efecto antagónico que ejercen *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp. en la dilución 1/100 y 1/1000 de Kombucha (A) y (B).

4.3. Efecto de diluciones de Kombucha sobre micelio de *Sclerotium cepivorum* Berk.

Con el propósito de evaluar el efecto de Kombucha sobre los filamentos de *S. cepivorum*, se dejó caer 0.08 ml de concentrado y de las diluciones de Kombucha en el centro del micelio de cada placa Petri. Las observaciones del efecto antagónico se dejaron notar a **partir de los 16 días** de haber dejado caer el concentrado y las diluciones. Ver Tabla 7 y Fig. 30 (Anexo 3).

Tabla 7. Efecto de diluciones de Kombucha sobre micelio de *S. cepivorum*.

Concentración de Kombucha	Crecimiento y desarrollo de microorganismos				
	08 días	16 días	INH	22 días	INH
K. c	Inicio de formación esclerocios	Esclerocios <i>S. cepivorum</i>	-	Esclerocios <i>S. cepivorum</i>	-
K. 1/10	Inicio de formación esclerocios	Esclerocios <i>S. cepivorum</i>	-	Esclerocios <i>S. cepivorum</i>	-
K. 1/100	Inicio de formación esclerocios	Esclerocios <i>S. cepivorum</i>	-	Esclerocios <i>S. cepivorum</i>	-
K. 1/1000	Inicio de formación esclerocios	Esclerocios <i>S. cepivorum</i>	-	Esclerocios <i>S. cepivorum</i>	-
Testigo	Inicio de formación esclerocios	Esclerocios <i>S. cepivorum</i>	-	Esclerocios <i>S. cepivorum</i>	-

(-) Inhibición limitada o nula.

Los 0.08 ml de **Kombucha concentrada** afectaron 0.9 cm de diámetro del micelio del hongo; los filamentos que recibieron este tratamiento en forma paulatina perdieron el color blanco cremoso natural, seguido de la desaparición que ocurrió entre 16 a 22 días; los esclerocios que se formaron hasta antes de la aplicación de Kombucha en esta área, perdieron viabilidad, porque al ser sembrados en medio PDA, no brotaron (Fig. 14).

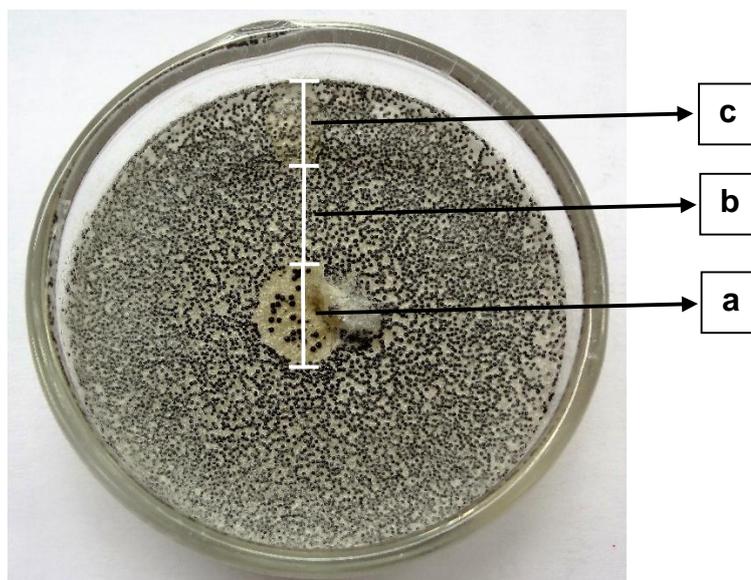


Fig. 14. Efecto de 0.08 ml de concentrado de Kombucha sobre el micelio de *S. cepivorum*; apreciar el área central libre de filamentos con esclerocios inactivos y presencia de colonias de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp. (a) y el área libre de filamentos que dejan ver población de esclerocios de menor densidad (b), que el área exterior (c).

El espacio libre de filamentos, es de 1.8 cm de diámetro; en este espacio la desaparición total de filamentos se evidenció a los 22 días; indicando que los metabolitos del Kombucha, ocasionaron lisis celular de los filamentos del patógeno; además en este espacio desarrollaron las cepas de los microorganismos que conforman Kombucha.

Entre el margen del área libre de filamentos hasta el límite de la placa Petri se distinguen dos áreas donde se aprecia la densidad de formación de esclerocios del hongo; en la inmediata superior ésta densidad es menor en comparación con el área exterior; esto indica a que los metabolitos de Kombucha, pierden su principio letal a medida que se alejan del lugar donde ocurrió la aplicación del concentrado.

El efecto de la dilución de **Kombucha 1/10**, aplicado al micelio de *S. cepivorum*, mostró la destrucción de filamentos en un área de 0.7 cm de diámetro, este efecto se evidencia porque deja ver el medio de cultivo PDA de color amarillo pálido; los esclerocios que aquí se han formado han perdido viabilidad debido a que han recibido en forma directa la dilución letal de los metabolitos de Kombucha.

Del límite del área central, en un espacio de 1.2 cm de espesor, se muestra la formación de esclerocios cuya densidad es menor que el área superior donde se muestra mayor cantidad de estructuras de conservación del hongo, ocupando 1.0 cm de espesor.

El área libre de esclerocios y las áreas subsiguientes que muestra en forma secuencial el incremento poblacional de esclerocios se debe a que los metabolitos letales de Kombucha en el proceso de difusión en el medio, sólo alcanzan un área limitada, como se muestra en la Fig. 15.



Fig. 15. Efecto de 0.08 ml de dilución 1/10 de Kombucha sobre el micelio de *S. cepivorum*; apreciar la formación de esclerocios diferenciados en 1.2 cm, debido a la destrucción de filamentos (a) y la formación de esclerocios menos densos en un área de 1.1 cm de espesor y población densa de esclerocios en los extremos (b).

La **dilución 1/100** de Kombucha, aplicado sobre el micelio de *S. cepivorum*, mostró destrucción de filamentos del hongo, en un área de 0.7 cm, en el espacio libre de filamentos sobre el medio PDA sólo se aprecia esclerocios inactivos.

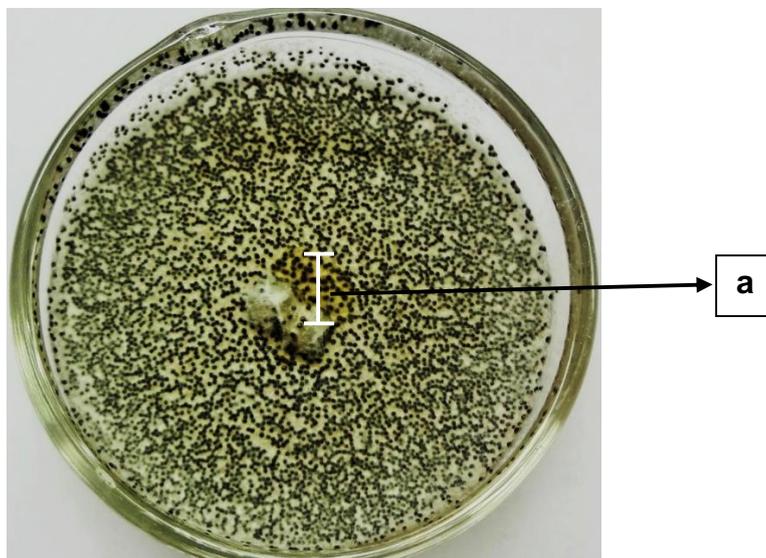


Fig. 16. Efecto de 0.08 ml de dilución 1/100 de Kombucha sobre el micelio de *S. cepivorum*; apreciar un área de 0.5 cm libre de filamentos (a); formación de esclerocios de densidad uniforme en toda la placa.

En un área de 2.5 cm de espesor se aprecia la formación de esclerocios menos denso que el área exterior, como se aprecia en la Fig. 16; el efecto de esta concentración es menos efectiva que las anteriores.

La **dilución 1/1000** de Kombucha, según la formación de esclerocios indica que los filamentos han sido afectados en forma limitada en un área de 0.4 cm de diámetro, no se determinó destrucción total de hifas en el lugar donde se hizo caer la dilución, en este espacio no se dejó ver la superficie del medio de cultivo por estar cubierto por filamentos parcialmente destruidos.

Existe formación de esclerocios limitados en un área de 1 cm de espesor, indicado que la totalidad de filamentos no ha sido afectado por la dilución 1/1000 de Kombucha. La mayor concentración de formación de esclerocios está en el área exterior y es de 1.3 cm de espesor, esto indica que los metabolitos de Kombucha a esta dilución no tienen efecto letal contra las células de filamentos del hongo (Fig. 17).



Fig. 17. Efecto de 0.08 ml de dilución 1/1000 de Kombucha sobre el micelio de *S. cepivorum*; apreciar un área de 0.4 cm de diámetro libre de filamentos (**a**) y la formación de mayor concentración de esclerocios en toda la placa.

4.4. Efecto de difusión de metabolitos de las diluciones de Kombucha sobre esclerocios de *Sclerotium cepivorum*.

De la Tabla 8, y Fig. 31 (ver Anexo 4) se deduce que 0.08 ml de **concentrado de Kombucha** y las diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000, difundidas durante 24 horas en medio PDA, no permitieron la multiplicación de filamentos del hongo y menos el brotamiento de esclerocios de *S. cepivorum*; durante los 12 días de evaluación.

Tabla 8. Efecto de difusión de las diluciones de Kombucha en esclerocios de *S. cepivorum*.

Tratamientos		Descripción
Nº	Clave	
1	K. c. + M. Sc	NO hay crecimiento de <i>S. cepivorum</i> .
2	K. c 1/10 + M. Sc	NO hay crecimiento de <i>S. cepivorum</i> .
3	K. c 1/100+M. Sc	NO hay crecimiento de <i>S. cepivorum</i> .
4	K.c 1/1000+ M.Sc	NO hay crecimiento de <i>S. cepivorum</i> .
5	Agua + M. Sc	<i>Sclerotium cepivorum</i>

El metabolismo de los microorganismos que conforman Kombucha generan compuestos que desencadenan un efecto represivo en filamentos y esclerocios del patógeno; los ácidos generados son responsables de la represión. Este proceso es conocido como **amensalismo**, que es cuando una población microbiana produce una sustancia que es inhibidora para las otras poblaciones (Cano y Valverde 2005).

La presencia de colonias de los microorganismos que conforman Kombucha aparece en las primeras 24 horas de evaluación. *Saccharomyces* sp. se muestra como puntitos de color blanco cremoso de 0.5 – 0.6 mm de diámetro y *Zygosaccharomyces* sp., como puntitos blancos de 0.2 – 0.3 mm de diámetro; estas colonias crecen entreverados en espacios dispersos.

El **concentrado de Kombucha**, en el medio de cultivo PDA, después de 12 días de incubación a 22 °C, deja crecer en forma entreverada a *Saccharomyces* sp.

y *Zygosaccharomyces* sp.; después de 12 días *Saccharomyces* sp., prevalece en el medio.

En este concentrado, existe mayor población de microorganismos, generando mayor cantidad de metabolitos antagónicos al fitopatógeno.

La difusión de metabolitos antagónicos a *S. cepivorum* de las concentraciones **1/10, 1/100 y 1/1000 de Kombucha** fue letal. Este efecto aún se vio favorecido por la producción de metabolitos antagónicos durante el crecimiento y desarrollo de las colonias de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp., a partir de las primeras 24 horas de incubación, hasta 12 días después, tiempo que duró la investigación.

En todas las diluciones de Kombucha prevalece *Saccharomyces* sp., como se observa en las Figuras 18, 19, 20 y 21.

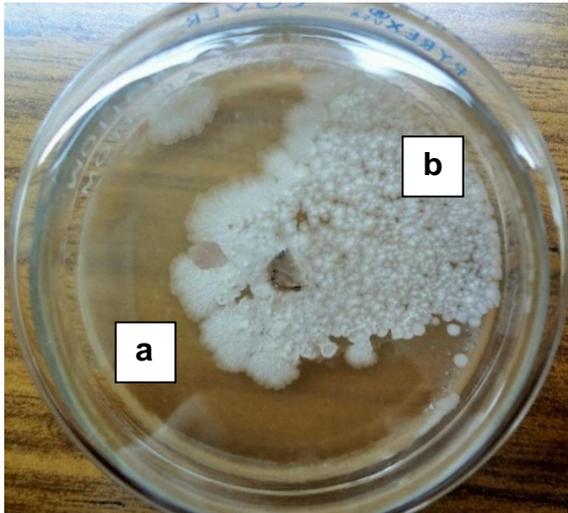


Fig. 20. Inhibición total de crecimiento y desarrollo de *S. cepivorum*; utilizando la **dilución concentrada** de Kombucha. Apreciar mayor proliferación de *Saccharomyces* sp. (a), que *Zygosaccharomyces* sp. (b).

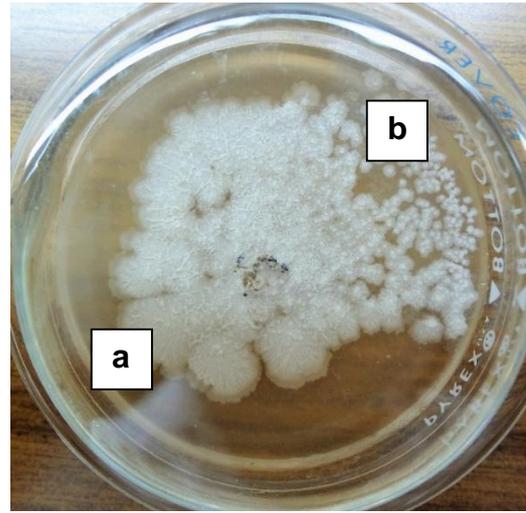


Fig. 21. Inhibición total de crecimiento y desarrollo de *S. cepivorum*; utilizando la **dilución 1/10** de Kombucha. Apreciar mayor proliferación de *Saccharomyces* sp. (a), que *Zygosaccharomyces* sp. (b).

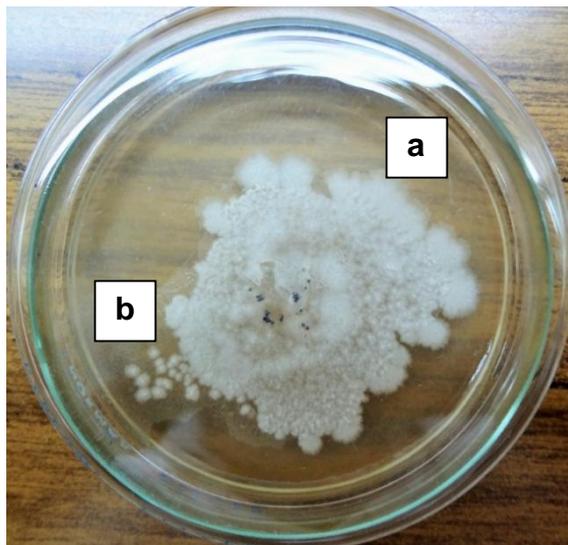


Fig. 19. Inhibición total de crecimiento y desarrollo de *S. cepivorum*; utilizando la **dilución 1/100** de Kombucha. Apreciar la proliferación de *Saccharomyces* sp. (a), que *Zygosaccharomyces* sp. (b).

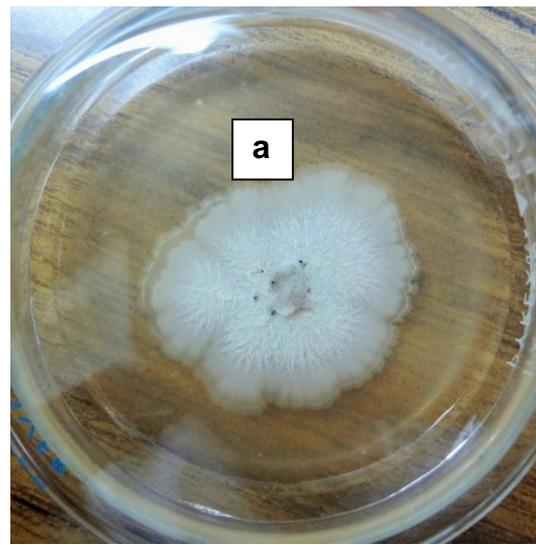


Fig. 18. Inhibición total de crecimiento y desarrollo de *S. cepivorum*; utilizando la **dilución 1/1000** de Kombucha. Apreciar mayor proliferación de *Saccharomyces* sp. (a).

4.5. Efecto antagónico de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp. frente a esclerocios de *Sclerotium cepivorum*

El porcentaje de inhibición que ejercen *Saccharomyces* sp., y *Zygosaccharomyces* sp., frente al micelio proveniente del brotamiento de esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, se realizó al **quinto día** de incubación, tiempo en que ambas levaduras dejan de crecer en el medio PDA.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición de micelio *S. cepivorum* durante el periodo de crecimiento y desarrollo de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp.

Microorganismo antagónico	Fitopatógeno	Porcentaje de inhibición
<i>Saccharomyces</i> sp.	<i>Sclerotium cepivorum</i>	15 %
<i>Zygosaccharomyces</i> sp.	<i>Sclerotium cepivorum</i>	20 %

Los datos de las Tablas 12 y 13, (ver Anexo 5) corresponden al radio de inhibición del micelio de *S. cepivorum* por los metabolitos de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp.; en ensayo de cultivo dual durante cinco días de incubación a 22 °C.

Según la Tabla 9, el promedio de inhibición es de *Saccharomyces* sp. es 15 % y de *Zygosaccharomyces* sp. de 20 %, estos porcentajes sólo se hicieron efectivos en cinco días de incubación; observándose inhibición de crecimiento de los filamentos de *S. cepivorum*, en forma cóncava frente a las colonias de los microorganismos antagónicos.



Fig. 22. Evidencia de inhibición de crecimiento de *Saccharomyces* sp. frente a *S. cepivorum*.

A partir del sexto día, las hifas del fitopatógeno iniciaron su crecimiento en la superficie del medio PDA, en las placas Petri respectivas; transcurrido 12 días de incubación (Figuras 32 y 33, ver Anexo 5), los filamentos del hongo invaden toda la placa; distinguiéndose dos áreas a través de una línea recta; el área que corresponde a la siembra de *S. cepivorum*, deja ver filamentos y esclerocios en forma densa; en cambio, en el área que corresponde a la siembra de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp. el micelio del hongo presenta formación de hifas menos densa, con la consecuente formación limitada de esclerocios que para este experimento son de menor tamaño, como se aprecia en la Fig. 22.



Fig. 23. Evidencia de inhibición de crecimiento de *Zygosaccharomyces* sp. frente a *S. cepivorum*.

La limitada inhibición del micelio *S. cepivorum* por los microorganismos antagónicos de Kombucha, se debe a que los metabolitos de estas levaduras no se han difundido en cantidad suficiente en el área del medio PDA, debido a que estos microorganismos tienen una forma peculiar de crecimiento y desarrollo en medios de cultivo artificial; inmediatamente después de la siembra pasan un tiempo de aclimatación o establecimiento; periodo en el cual no existe producción de metabolitos antagónicos. Posteriormente se diferencia el periodo de crecimiento y desarrollo acelerado, tiempo en que cada célula metaboliza convenientemente productos antagónicos.

Posteriormente se diferencia el periodo de multiplicación celular en equilibrio, aquí las células de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp., metabolizan antibióticos, que para nuestro experimento la difusión en el medio ha tenido comportamiento parcial de inhibición contra el fitopatógeno en estudio (Fig. 23).

Finalmente ocurre la diferenciación del periodo de la muerte celular, por falta de alimento, que conduce a la nula síntesis de metabolitos antagónicos.

Los resultados de los diferentes ensayos, realizados para cumplir con el objetivo del presente trabajo, nos permiten reportar que el principio antagónico que ejercen los microorganismos que conforman Kombucha dependen de la acción conjunta de éstos; categorizándolos a los microorganismos *Saccharomyces* sp, *Zygosaccharomyces* sp., tener **comportamiento sinérgico** (Cano y Valverde 2005); contra *S. cepivorum*; que es una forma de interacción que da como resultado efectos combinados con la administración de dos o más sustancias o microorganismos, que resultan ser mayores que aquellos que podrían haberse alcanzado si alguno de los aditivos se hubiera administrado solo (Ver Figuras 18, 19, 20 y 21).

4.6. Tiempo de inactivación de esclerocios de *Sclerotium cepivorum* por sumersión en Kombucha

Esclerocios de *Sclerotium cepivorum*, sumergidos en el concentrado de Kombucha se inactivan a partir de 15 minutos de exposición. En la Fig. 24 se observa que existe formación de micelio del hongo en los extremos de la placa Petri; indicando que los metabolitos de los microorganismos que conforman Kombucha no han llegado a inactivar a la totalidad de las células del hongo.

Tabla 10. Tiempo de inactivación de *S. cepivorum*, sumergidos en el concentrado de Kombucha.

Tiempo de sumersión de esclerocios de <i>S. cepivorum</i> en concentrado de Kombucha	Descripción
Un minuto	100 % de brotamiento de esclerocios
Cinco minutos	100 % de brotamiento de esclerocios
Quince minutos	50 % de brotamiento de esclerocios
Treinta minutos	0 % de brotamiento de esclerocios
Sesenta minutos	0 % de brotamiento de esclerocios

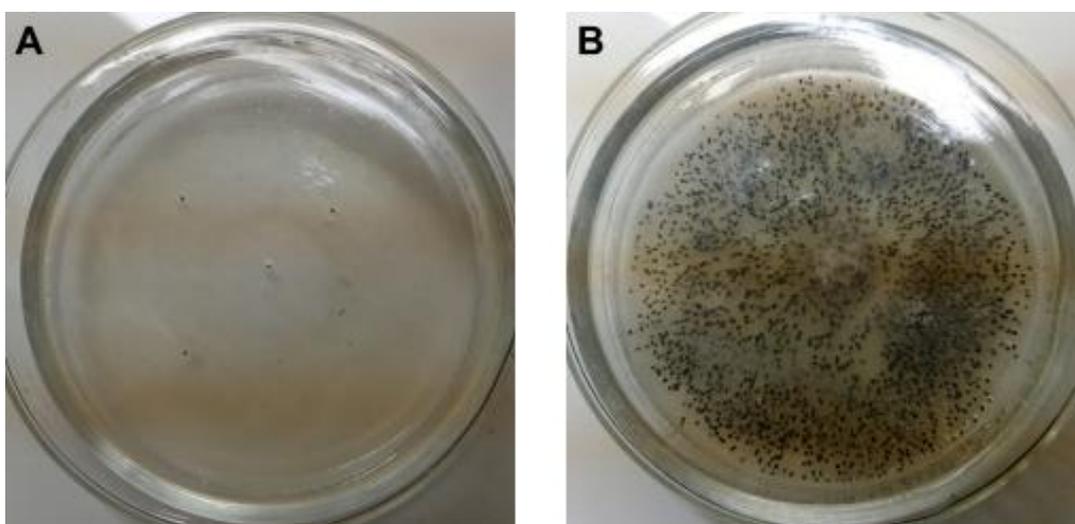


Fig. 24. Esclerocios de *S. cepivorum* sumergidos en Kombucha durante 1 minuto. **A:** Día 1 de observación. **B:** Día 12 de observación.

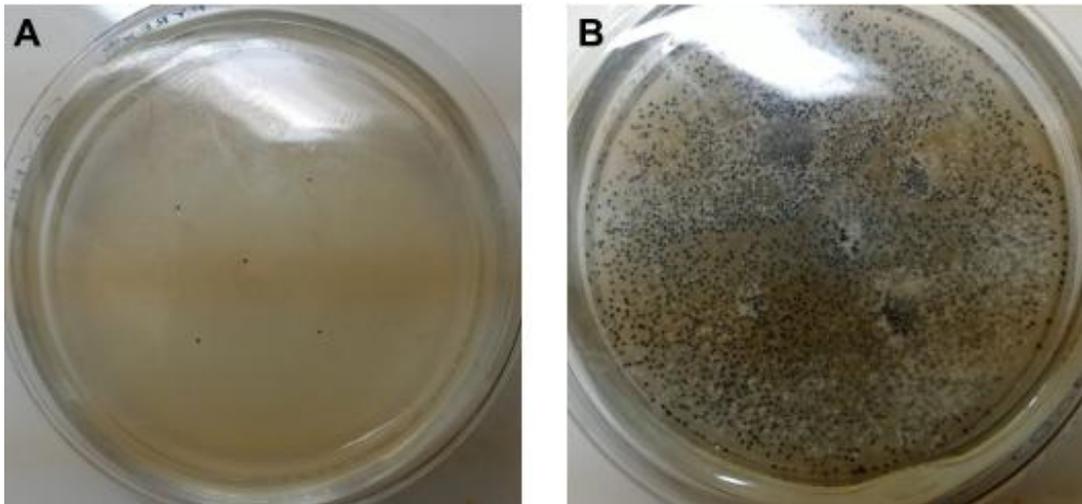


Fig. 25. Esclerocios de *S. cepivorum* sumergidos en Kombucha durante 5 minutos. **A:** Día 1 de observación. **B:** Día 12 de observación.

Cuando los esclerocios se sumergen por 30 minutos en el concentrado de Kombucha existe inactivación total de las células que conforman esta estructura de conservación y más todavía si se sumergen durante una hora.

No existe evidencia de inactivación de esclerocios sumergidos desde un minuto a 15 minutos en el concentrado de Kombucha; este intervalo de tiempo no es suficiente para que los metabolitos antagónicos de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp., inactiven la totalidad de células que conforman los esclerocios.

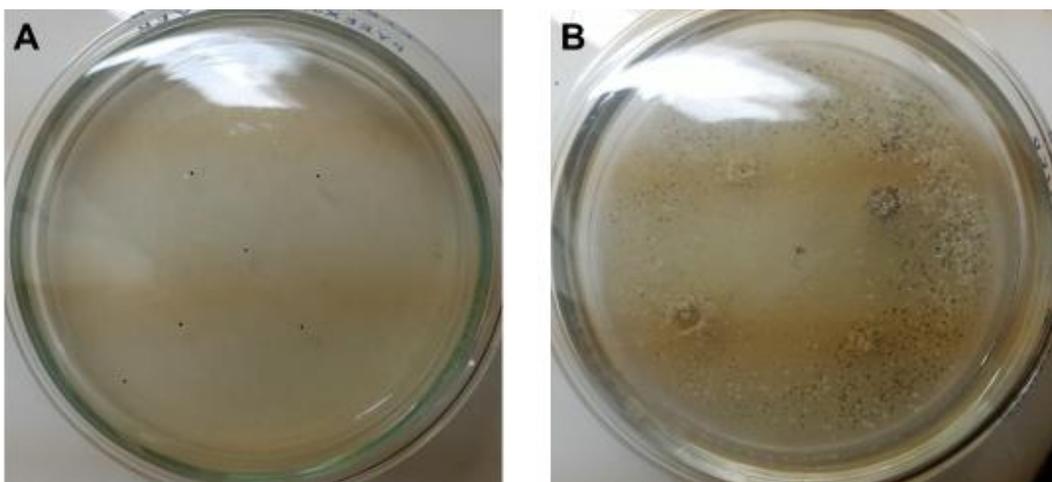


Fig. 26. Esclerocios de *S. cepivorum* sumergidos en Kombucha durante 15 minutos **A:** Día 1 de observación. **B:** Día 12 de observación.

Existe efecto letal parcial de células del esclerocio cuando éste se sumerge 15 minutos. Ocurriendo comportamiento letal total de células del esclerocio a partir de 30 minutos; tiempo suficiente para que los metabolitos antagónicos lleguen a atravesar paredes y membranas de las células que conforman el esclerocio.

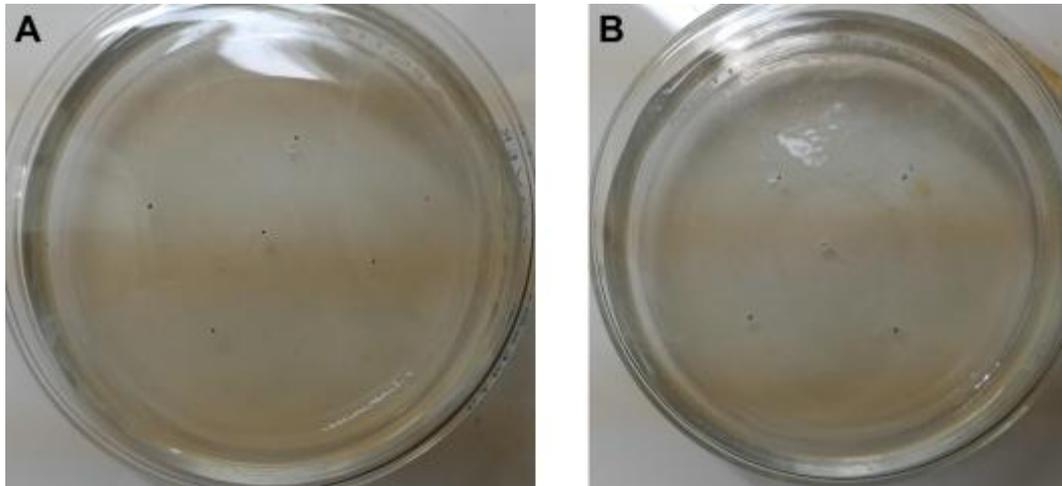


Fig. 27. Esclerocios de *S. cepivorum* sumergidos en Kombucha durante 30 minutos. Inhibición del crecimiento del patógeno. **A:** Día 1 de observación. **B:** Día 12 de observación.

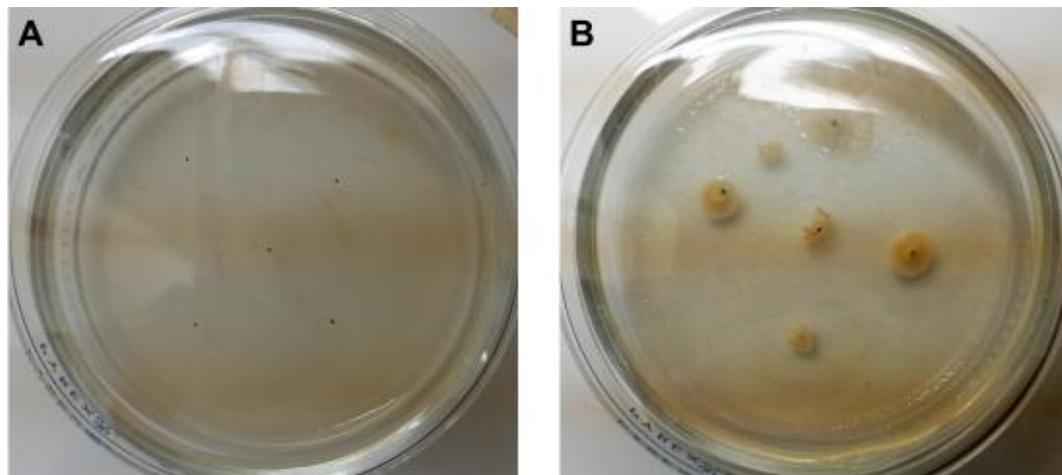


Fig. 28. Esclerocios de *S. cepivorum* sumergidos en Kombucha durante 60 minutos. Inhibición del crecimiento del patógeno y presencia de colonias de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp. **A:** Día 1 de observación. **B:** Día 12 de observación.

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

- a. En condiciones “in vitro”, el concentrado de Kombucha tiene comportamiento fungicida.
- b. Kombucha destruye filamentos e inactiva esclerocios en forma proporcional. Siendo las diluciones **concentrada** y **1/10** las más efectivas.
- c. Esclerocios de *S. cepivorum* en condiciones “in vitro” se inactivan cuando se siembra en PDA previamente tratado con el concentrado y las diluciones de 1/10, 1/100 y 1/1000 de Kombucha.
- d. Esclerocios de *S. cepivorum* se inactivan en contacto con el concentrado de Kombucha en un intervalo de 15 a 30 minutos.
- e. Recomendamos realizar trabajos de investigación en campo utilizando las diferentes diluciones.

CAPÍTULO VI

REFERENCIA BIBLIOGRÁFICA

Adams PB. 1979. A rapid method for quantitative isolation of sclerotia of *Sclerotinia minor* and *Sclerotium cepivorum* from soil. Plant Dis. Repr. 63: 349 – 351 p.

Adams PB. 1987. Effects of soil temperature, moisture and depth on survival and activity of *Sclerotinia minor*, *Sclerotium cepivorum* and *Sporidesmium sclerotivorum*. Plant Dis. 71: 170 – 174 p.

Adams PB, Papavizas GC. 1971. Effect of inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and some soil environmental factors on disease severity. Phytopathology 61: 1253 – 1256 p.

Agrios G. 1996. Fitopatología. Guzmán, M. Grupo Noriega Editores, 2da ed. México. D.F. Editorial Limusa. S.A. 838 p.

Alexopoulos C. Jhon. 1996. Introducción a la Micología. 3ra ed. Editorial New York. 108 – 256 p.

Álvarez SE, Sivila N. 2013. Produccion artesanal de *Trichoderma sp.* 1ª ed. San Salvador de Jujuy: Universidad Nacional de Jujuy. Universitaria de Jujuy. Facultad de Ciencias Agrarias. E-Book. ISBN 978-950-721-443-1.

Arévalo J. 2009. Inhibición del micelio de *Moniliophthora roreri* por efecto de cinco extractos vegetales obtenidos con cuatro extractantes químicos. Instituto de Cultivos Tropicales, San Martín. Resumen Científico del XLX Congreso Peruano de Fitopatología. 14 – 19 p.

Ayers WA, Adams PB. 1981a. Mycoparasitism of sclerotial fungi by *Teratosperma oligocladum*. Can. J. Microbiol. 27: 886 – 892 p.

Ayers WA, Adams PB. 1981b. *Sporidesmium sclerotivorum*: distribution and function in natural biological control of sclerotial fungi. Phytopathology 71: 90 – 93 p.

- Balch PA. 2000. Prescription for Nutritional Healing, 3rd ed. New York: Avery. 97 p.
- Barbancik GF. 1954. El hongo de Té. 1ra ed. Rusia. 186 – 243 p.
- Brock N., Smith A. y Madigan E. 1987. Microbiología. 4ta ed. Copyrigh España. 197 – 208 p.
- Cano Z., Valverde T. 2005. Ecología y medio ambiente. 1ra. Ed. Pearson Educación. 66 p.
- Castañeda EC, y Roncal M. 2011. Lechuga (*Lactuca sativa* L.) semihidroponía y su susceptibilidad a microorganismos fungosos. Tesis en Agronomía. Fitopatología. 21 – 37 p.
- Castillo MA, Albarracin M. 2003. Evaluación de la técnica de solarización en el control de *Sclerotium cepivorum* Berk. causante de la podredumbre blanca del ajo (*Allium sativum* L.) In: Congreso alianza tecnológica para la agricultura con calidad. San José, CR. Ed. Meléndez, G. 271 p.
- Chupp C., Sherf AF. 1960. Vegetables diseases and their control. New York. Ronald Press. 393 – 394 p.
- Cisneros F. 1995. Control de Plagas Agrícolas. 1ra Edición. Universidad Agraria La Molina.
- Coley JR, Mitchel CM y Sansford EC. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. Plant Pathology 39: 58-69 p.
- Coley Smith JR. 1979. Survival of plant pathogenic fungi in soil in the absence of host plant. In: soilborne plant pathogens. Schippers, B y Gams, W (eds.). New York, Academic. 39 – 57 p.
- Coley Smith JR. 1990. White rot disease of Allium: problems of soil-borne diseases in microcosm. Plant Pathology 39: 214 – 222 p.
- Coley Smith JR. 1990. White rot disease of *Allium*: problems of soil-borne diseases in microcosm. Plant Pathology 39: 214 – 222 p. Fuente original: Porter, I. J. 1983. Soil solarization in Victoria for control of white rot in onions caused by *Sclerotium cepivorum*. In: Proceedings of the second international workshop on allium white rot. Beltsville, USA. 118 – 125 p.

- Coley Smith JR, Cooke RC. 1971. Survival and germination of fungal sclerotia. *Ann. Rev. Phytopathol.* 9:65 – 92 p.
- Coley Smith JR, King JE. 1969. The production by species of *Allium* of alkyl sulphides and their effect on germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* Berk. *Ann. Appl. Biol.* 64: 289 – 301 p.
- Coley Smith JR, Mitchell CM, Sansford CE. 1990. Long-term survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* and *Stromatinia gladioli*. *Plant Pathology* 39: 58 – 69 p.
- Cook RJ. 1979. Antagonism and biological control: concluding remarks. In: *Soilborne plant pathogens*. Schippers, B y Gams, W (eds.). New York, Academic. 653 – 657 p.
- Cook RJ, Baker KF. 1983. The nature and practice of biological control of plant pathogens. Minnesota. APS Press. 539 p. Fuente original: Merriman P. R., Samson M., Schippers B. 1981. Stimulation of germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* at different depths in soil by artificial onion oil. *Neth. Jour. Plant Pathol.* 87: 45 – 53 p.
- Couch BC, Kohn LM. 2000. Clonal spread of *Sclerotium cepivorum* in onion production with evidence of past recombination events. *Phytopathology* 90: 514 – 521 p.
- Crowe FJ. 1995. White rot. In: *Compendium of onion and garlic diseases*. H.F. Schwartz y S.K. Mohan (eds.). Minnesota. APS Press. 14 – 16 p.
- Crowe FJ, Hall DH. 1980. Soil temperature and moisture effects on *Sclerotium* germination and infection of onion seedlings by *Sclerotium cepivorum*. *Phytopathology* 70:74 – 78 p.
- Crowe FJ, Hall DH, Greathead AS y Baghott KG. 1980. Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. *Phytopathology* 70: 64 – 69 p.
- Crowe FJ, Hall DH, Greathead AS y Baghott. 1980. Inoculum density of *Sclerotium cepivorum* and the incidence of white rot of onion and garlic. *Phytopathology* 70: 64 – 69 p.
- Delgadillo F., Zavaleta E., Osada S., Arévalo A., González V., Nieto D. y Torres I. 2002. Densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y su control mediante

Tebuconazole en ajo (*Allium sativum*). Revista Fitotecnia Mexicana 25: 349 – 354 p.

Esler G., Coley Smith JR. 1983. Flavour and odour characteristics of species of *Allium* in relation to their capacity to stimulate germination of sclerotia of *Sclerotium cepivorum*. Plant Pathology 33: 13 – 22 p.

Ferguson J. 1953. Factors in colonization of sclerotia by soil organisms. Phytopathology 43: 471 p.

Fletcher JT, Knight BC. 1971. The control of White rot (*Sclerotium cepivorum* Berk.) in salad onions with dicloran. Plant Pathology 20: 88 – 92 p.

Galli F., Torres de Carvalho PC, Tokeshi H., Balmer E., Kimati H., Nogueira CO, Lima-Salgado C., Krugner T., Nogueira E., Filho AB. 1980. Manual de fitopatología: doenças das plantas cultivadas. São Paulo, Editora Agronômica Ceres. Vol II. 57 – 58 p.

Garriz A., Chamizo J. 1994. Química. Editorial Addison-Wesley. 2da ed. Argentina. 84 – 114 p.

Gastón A. 1999. Patología de cultivos, Epidemiología y Control Holístico. Universidad Católica de Chile. Chile. 346 p.

Gerard J., Tortora N. 1993. Introducción a la Microbiología. 3ra ed. España. Editorial Acribia. 765 p.

Granados M. 2004. Pudrición blanca de la cebolla: una enfermedad difícil de combatir. Costa Rica. Agronomía Costarricense 29(2): 143-156. Resumen.

Gunther W. Frank. 2005. Kombucha. 1ra ed. Ennsthaler Gesellschaft m.b.H. & Co KG. Austria.

Hartman G., Datnoff L. 1997. Vegetable Crops. In: Soilborne diseases of tropical crops. R. J. Hillocks y J. M. Waller (eds.). CAB INT. Cambridge, University. 161 – 162 p.

Hernández N. 2012. Crucíferas antagónicas a *Sclerotium cepivorum* en el cultivo de Ajo (*Allium sativum*). Tesis en Agronomía. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cajamarca. 25 – 34 p.

- Hovius M., McDonald M. 2002. Management of allium white rot (*Sclerotium cepivorum*) in onions on organic soil with soil applied diallyl disulfide and N-propyl disulfide. *Can. J. Pl. Pathol.* 24(3): 281 – 286 p. Resumen.
- Hunger SA, McLean KL, Eady CC, Stewart A. 2002. Seedling infection assay for resistance to *Sclerotium cepivorum* in allium species. *New Zealand Plant Protection* 55:193 – 196 p.
- Kader A. 2002. *Postharvest Technology of Horticultural Crops* (3ª edición). Oakland, California: University of California, Agriculture and Natural Resources, Publication 3311. 514 p.
- Leggett ME, Rahe JE. 1985. Factors affecting the survival of sclerotia of *Sclerotium cepivorum* in the Fraser Valley of British Columbia. *Ann. Appl. Biol.* 106: 255 – 263 p.
- Lifshitz R., Tabachnik M., Katan J., Chet I. 1983. The effect of sublethal heating on sclerotia of *Sclerotium rolfsii*. *Can. J. Microbiol.* 29: 1607 – 1610 p.
- Littley ER, Rahe JE. 1984. Specific tolerance of *Sclerotium cepivorum* to dicarboximide fungicides. *Plant Dis.* 68: 371 – 374 p.
- Locke SB. 1968. Experimental control of onion white rot by means of soil chemicals. *Plant Dis. Repr.* 272 – 276 p.
- Madigan E., Martinko N., Parker S. 2006. *Biología de los microorganismos*. 10ma ed. Pearson. España. 687 p.
- McLean KL, Stewart A. 2000. Application strategies for control of onion White rot by fungal antagonists. *New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science* 28: 115-122. Resumen.
- McLean KL, Swaminathan J., Stewart A. 2001. Increasing soil temperature to reduce sclerotial viability of *Sclerotium cepivorum* in New Zealand soils. *Soil Biol. Bioch.* 33(2): 137 – 143 p.
- Mesén R. 1997. Efecto de tres sistemas de labranza y una enmienda sobre la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y el manejo de la pudrición blanca de cebolla en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 115 p. Fuente original: Enwistle A. 1992. Controlling allium white rot

(*Sclerotium cepivorum*) without chemical. *Phytoparasitica España*. 20: 120 – 125 p.

Mesén R. 1997. Efecto de tres sistemas de labranza y una enmienda sobre la densidad de inóculo de *Sclerotium cepivorum* y el manejo de la pudrición blanca cebolla en Costa Rica. Tesis Mag. Sc. San José, Costa Rica, Universidad de Costa Rica. 115 p.

Metcalf DA, Wilson CR. 1999. Histology of *Sclerotium cepivorum* infection of onion roots and the spatial relationships of pectinases in the infection process. *Plant Pathology* 48: 445 – 452 p.

Miranda T. Livia. 2013. Propiedades antagónicas de Kombucha a fitopatógenos fúngicos en condiciones “In Vitro”. Tesis en Agronomía. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cajamarca.

Mordue JE. 1976. *Sclerotium cepivorum*. In: CMI Descriptions of pathogenic fungi and bacteria. Surrey, England. Commonwealth Mycological Institute. Set 42, No 512.

Muñoz F. 2002. Plantas medicinales y aromáticas. Estudio, cultivo y procesado. 1ra ed. Editorial Mundo Prensa. 365 p.

Neira M., Maldonado E. y Rodríguez E. 2006. Antagonismo de cepas bacterianas frente a *Colletotrichum gloeosporioides*, agente causal de la antracnosis del mango. Departamento de Sanidad Vegetal. Facultad de Agronomía. Universidad Nacional de Piura. Campus Universitario s/n Urb. Miraflores. Castilla. Piura. 14 – 17 p.

Oliveira VL, Bellei MM, Menezes-Sobrinho J., Ferreira FA. 1982. Ação antagônica de *Trichoderma harzianum*, *Paecilomyces lilacinus* e *Penicillium* sp. sobre *Sclerotium cepivorum*, causador da podridão branca do alho. *Fitop. Bras.* 7(3): 531.

Ortiz R. 1985. Solarización, materia orgánica y extracto de cebolla para el control *Sclerotium cepivorum* en cebolla. In: XII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Resúmenes. Guanajuato, México. 135 p.

Papavizas GC, Lumsden RD. 1980. Biological control of soilborne fungal propagules. *Ann. Rev. Phytopathol.* 18: 389 – 413 p.

Pereira JC, Chávez GM, Zambolim L., Matsuoka K., Acuña RS y Do Vale FX. 1996. Control of *Sclerotium cepivorum* by the use of Vermicompost, solarization, *Trichoderma harzianum* and *Bacillus subtilis*. Summa-Phytopologica 22: 228 – 234 p.

Pérez I. 2000. Entomología Aplicada. 1ra Edición. Departamento de Agricultura y Alimentación. Universidad de La Rioja.

Peréz ML, Hernández VO, Cantú GF, Romero RA. 2000. Alternativas para el manejo integral de la pudrición blanca *Sclerotium cepivorum* Berk. en ajo *Allium sativum* L. en la zona del Bajío, México. In: XXVII Congreso Nacional de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. Puerto Vallarta, Jalisco, México. L67.

Peyghami E. 2001. Antagonic effects of several isolates of *Trichoderma* on fungi causing onion root rot, East Azarbaijan Province. Iranian Journal of Agricultural Sciences 32(4): 747 – 755 p. Resumen.

Pinto MF, Maffia LA, Berger RD, Mizubuti ES y Casali WD. 1998. Progress of white rot on garlic cultivars planted at different times. Plant Diseases 82: 1142 – 1146 p.

Rahman K. 2007. Effects of garlic on platelet biochemistry and physiology. Mol Nutr Food Res. Nov. 13 – 44 p.

Rai JN, Saxena VC. 1975. Sclerotial mycoflora and its role in natural biological control of “white rot” disease. Plant and Soil 43: 509 – 513 p.

Ramírez A. y Zavaleta E. 2002. A posible role for *Rhizoglyphus robustus* (Astigmata: Acaridae) in transmission of *Sclerotium cepivorum* (Deuteromycetes: Mycelia Sterilia). App. Entomol. Zool. 37(4). Resumen. 663 – 669 p.

Ramírez A., Zavaleta E., Kawasoe SO, Sanchez M., Valdez J. 2002. A possible role for *Rhizoglyphus robustus* Nesbitt (Astigmata: Acaridae) in transmission of *Sclerotium cepivorum* Berk. (Deuteromycetes: Mycelia Sterilia). Appl. Entomol. Zool. 37(4): 663 – 669 p. Resumen.

Reddy MS, Rahe JE, Levesque CA. 1992. Influence of onion seed bacterization on germination and mycosphere microflora of *Sclerotium cepivorum* sclerotia. Can. J. Microbiol. 38: 1135 – 1143 p. Fuente original: Ikeshoji, T. 1984. S-propenylcysteine sulfoxide in exudates of onion roots and its posible

- decompartmentalization in root cells by bacteria into attractant of onion maggot, *Hylemya antiqua* (Diptera: Anthomyiidae). Appl. Entomol. Zool. 19: 159 – 169 p.
- René Vigiani A. 1990. Control Integrado de plagas. 2da ed. Editorial Hemisferio Sur. 124 p.
- Resende ML, Zambolin L. 1987. Flutuação populacional de escleródios de *Sclerotium cepivorum* no solo, em função do tratamento com diferentes fungicidas no plantio do alho. Fitopatol. Bras. 12: 65 – 70 p.
- Resende ML, Zambolin L., Da Cruz J. 1987. Eficiência de fungicidas no controle da podridão branca do alho (*Allium sativum*), de acordo com o nível de escleródios de *Sclerotium cepivorum* no solo. Fitopatol. Bras. 12: 71 – 78 p.
- Rojas V., Ulacio D., Sanabria M. y Jiménez MA. 2009. Efecto del calcio, *Trichoderma* sp. y brócoli en la pared y área celular del ajo para el control de la pudrición blanca. Boletín del Centro de Investigaciones Biológicas 43: 183 – 195 p.
- Romero CS. 1988. Hongos fitopatógenos. 1ra ed. Universidad Autónoma de Chapingo. Dirección del Patronato Universitario A. C. México. 356 p.
- Romero CS. 1993. Hongos fitopatógenos. L. Tress (ed.). México, Universidad Autónoma de Chapingo. 342 p.
- Roncal M. 1996. Mohos post cosecha en frutos suculentos. Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales. Universidad Nacional de Cajamarca. 26 – 29 p.
- Roncal M. 2004. Principios de Fitopatología Andina. 1ra ed. Cajamarca – Perú. Oficina General de Investigación de la Universidad Nacional de Cajamarca.
- Schwartz HF y Mohan S. 2008. Compendium of onion and garlic disease. American Phytopathological Society (APS). St Paul, Minnesota. 127 p.
- Smolinska U., Dyki B. 2002. Viability and micromorphology of *Sclerotium cepivorum* sclerotia in field soil after addition of *Brassica juncea* and *Brassica napus* plant residues. Phytopathologia Polonica. 23: 39 – 51 p. Resumen.
- Soberanis W., Gomez H., Marín JE, Quintana A., Paz J., Rodríguez C., Tirado J., García L. 2009. Control de enfermedades del cacao con hongos antagonistas.

Servicio Nacional de Sanidad Agraria. Av. La Molina, La Molina – Lima. Resumen Científico del XLX Congreso Peruano de Fitopatología. 18 p.

Somerville PA, Hall DH. 1987. Factors affecting sclerotial germination of *Sclerotium cepivorum*, secondary sclerotia formation and germination stimulants to reduce inoculum density. Plant Dis. 71: 229 – 233 p.

Sovova M., Sova P. 2004. Pharmaceutical importance of *Allium sativum* L. 5. Hypolipemic effects in vitro and in vivo. Ceska Slov Farm. 2004. 117 – 123 p.

Stevens E. 1999. Alternativas de manejo de enfermedades de las plantas. Terra 17: 202 – 220 p.

Stone HE, Armentrout VN. 1985. Production of oxalic acid by *Sclerotium cepivorum* during infection of onion. Mycologia 77(4): 526 – 530 p.

Thaning C., Gerhardson B. 2001. Reduced sclerotial soil longevity by whole crop amendment and plastic covering. Zeitschrift fur Pflanzenkrankheiten und Pflanzenschutz. 108(2): 143 – 151 p. Resumen.

Tsigbey FK, Nutsugah SK. 1999. *Gliocladium catenulatum* in association with *Sclerotium cepivorum* on onion leaves in Ghana. Plant Dis. 83: 198 p.

Ulacio D., Zavaleta E., García R., Delgadillo F., Pedroza A. y Martínez A. 2002. Materia orgánica y microorganismos antagonistas como estrategias de manejo de *Sclerotium cepivorum* Berk. y su impacto en el progreso de la pudrición blanca en ajo (*Allium sativum* L.). Revista Mexicana de Fitopatología 21: 346 – 354 p.

UNA-IRET (Universidad Nacional–Instituto regional de estudios en sustancias tóxicas, CR). 1999. Manual de plaguicidas: guía para América Central. 2 ed. Heredia, CR. 97 p.

Utkhede RS, Rahe JE. 1978a. Screening comercial onion cultivars for resistance to white rot. Phytopathology 68: 1080 – 1083 p.

Utkhede RS, Rahe JE. 1978b. Screening world onion germplasm collection for resistance to white rot. Can. J. Plant. Sci. 58: 819 – 822 p.

Utkhede RS., Rahe JE. 1983a. Chemical and biological control of onion White rot in muck and mineral soils. Plant Dis. 67: 153 – 155 p.

Utkhede RS, Rahe JE. 1983b. Interactions of antagonist and pathogen in biological control of onion white rot. *Phytopathology* 73: 890 – 893 p.

Vela A., Quispe A. 2013. Manejo Integrado de Plagas. X Curso de titulación. Escuela Académico Profesional de Agronomía. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cajamarca.

Villar AC., Zavaleta E., García R. 1990. Efecto de la incorporación de residuos de crucíferas (Brassicaceae) sobre fitopatógenos de suelo. II Efecto de la incorporación de col y brócoli sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla, bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología* 8: 160 – 165 p.

Villar AC., Zavaleta E., García R. 1990. Efecto de la incorporación de residuos de crucíferas (Brassicaceae) sobre fitopatógenos de suelo. II Efecto de la incorporación de col y brócoli sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla, bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 8: 160 – 165 p. Fuente original: Bailey DM, Bazinet M., Driscoll J., McCarthy A. 1961. The volatile sulfur components of cabbage. *J. Fd. Sci.* 26: 163 – 170 p.

Villar AC., Zavaleta E., García R. 1990. Efecto de la incorporación de residuos de crucíferas (Brassicaceae) sobre fitopatógenos de suelo. II Efecto de la incorporación de col y brócoli sobre la pudrición blanca (*Sclerotium cepivorum* Berk.) de la cebolla, bajo condiciones de invernadero. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 8: 160-165. Fuente original: Clapp RC, Long J., Dateo G., Bissett FH, Hasselstrom. 1959. The volatile isothiocyanates in fresh cabbage. *J. Amer. Chem. Soc.* 81: 6278 – 6281 p.

Voet D. 2006. *Bioquímica*. 3ra ed. Buenos Aires. Argentina. Panamericana Ediciones. 604 – 625 p.

Walker JC. 1969. *Plant pathology*. 3 ed. New York, Mc Graw-Hill. 345 – 347 p.

Weber GF. 1973. *Bacterial and fungal diseases of plants in the tropics*. Gainesville, University of Florida Press. 369 p.

Wilson GF. 1999. *Bacterial and fungal diseases of plants in the tropics*. Gainesville. University of Florida. 369 p.

Zirena J. y Peña, E. 1977. Manejo de suelos. Departamento de ciencias agropecuarias. Universidad Nacional de Cajamarca – Perú. 236 p.

ANEXO

1. Preparación de medio de cultivo PDA

El medio de cultivo PDA, está constituido por:

Tabla 11. Cantidades requeridas para la preparación de PDA.

Material	Cantidad
Papa	250 g
Agar	15 g
Dextrosa	18 g

Detallamos la preparación de **MEDIO LITRO (1/2 L)** de PDA:

- a. Se desinfecta la papa en Hipoclorito de Sodio al 4 % durante cuatro minutos y se procede a lavarla y pelarla, se pesan 125 g y se hierbe en 300 ml de agua destilada durante 10 a 12 minutos, aunque el tiempo está sujeto a cambios.
- b. Se pesan el Agar y la Dextrosa y se disuelven en 250 ml de agua destilada. Se homogeniza la mezcla exponiendo el recipiente contenedor a calor, para disolver todos los grumos.
- c. Se miden 250 ml de caldo de papa y se lo mezcla con los 250 ml de Agar y Dextrosa (que en suma serían 500 ml). Se tapan los recipientes con algodón estéril y se los sella con papel aluminio y cinta masking tape.
- d. Luego se la dispone en la autoclave y se deja hervir hasta las 15 atm y se espera de 10 a 15 minutos. Tener cuidado con el sellado de los recipientes, la alta temperatura del autoclave hace que la ebullición del agua sea violenta y tienda a salpicar al algodón, en algunos casos rompe el sellado y se escapa el preparado de PDA, desperdiciando los materiales preparados y contaminando lo que queda.

e. Se deja enfriar durante 10 a 12 minutos y está lista para la disposición en placas Petri, esto se hará en la cámara de flujo laminar, con un mechero y con todas las condiciones óptimas para trabajar asépticamente, para evitar contaminación. Cuidado con esperar mucho tiempo, ya que el proceso de gelatinización hace difícil la disposición en las placas.

2. Efecto antagónico de diluciones de Kombucha frente a esclerocios de *Sclerotium cepivorum* Berk.



Fig. 29. Estado de placas a los 15 días de evaluación.

3. Efecto de diluciones de Kombucha sobre micelio de *Sclerotium cepivorum* Berk.

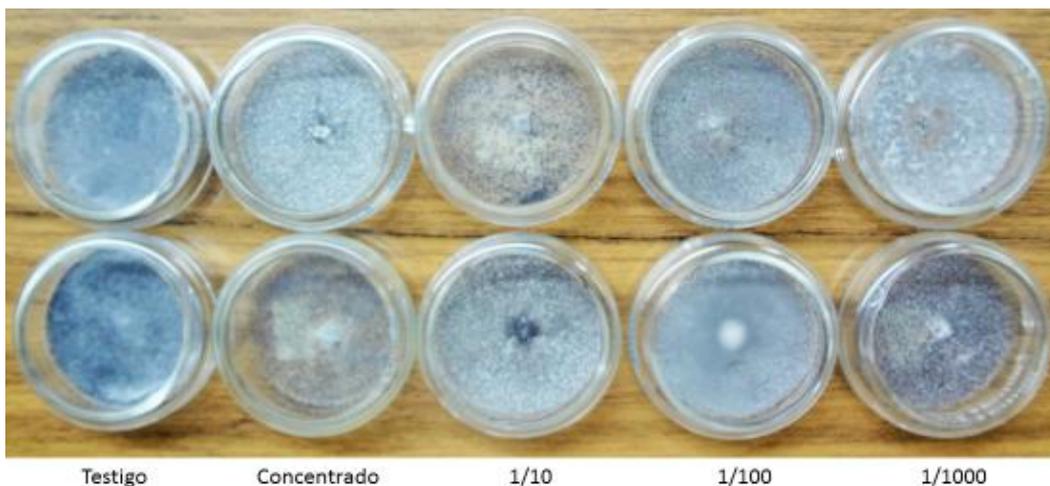


Fig. 30. Estado de placas a los nueve días de observación, antes de aplicar las diluciones de Kombucha.

4. Efecto de difusión de metabolitos de *Saccharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp. de las diluciones de Kombucha sobre esclerocios de *Sclerotium cepivorum*.



Testigo Concentrado 1/10 1/100 1/1000

Fig. 31. Estado de placas a los 12 días de observación.

5. Efecto antagónico de *Sacharomyces* sp. y *Zygosaccharomyces* sp. frente a esclerocios de *Sclerotium cepivorum*



Fig. 32. Estado de las placas del cultivo dual *Saccharomyces* sp. frente a *S. cepivorum* a los 12 días de evaluación.



Fig. 33. Evidencia de inhibición de crecimiento de *Zygosaccharomyces* sp. frente a *S. cepivorum*.

Tabla 12. Porcentaje de inhibición de micelio *S. cepivorum* causado por *Saccharomyces* sp.

Placas	Medidas (cm)		Inhibición %
	S. c. r1	S. c. r2	
1	0.4	0.3	25
2	0.5	0.5	0
3	0.5	0.4	20
Promedio general			15

Tabla 13. Porcentaje de inhibición de micelio *S. cepivorum* causado por *Zygosaccharomyces* sp.

Placas	Medidas (cm)		Inhibición %
	S. c. r1	S. c. r2	
1	0.6	0.5	17
2	0.6	0.5	17
3	0.5	0.4	20
Promedio general			20