

UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA



**PROPIEDADES ANTAGÓNICAS DE KOMBUCHA A
FITOPATÓGENOS FUNGOSOS EN CONDICIONES "IN VITRO"**

TESIS

PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE:

INGENIERO AGRÓNOMO

PRESENTADA POR LA BACHILLER:

LIVIA DEL PILAR MIRANDA TORIBIO

Asesor:

Dr. Manuel Salomón Roncal Ordoñez

CAJAMARCA - PERÚ



UNIVERSIDAD NACIONAL DE CAJAMARCA

Fundada por Ley 14015 del 13 de febrero de 1962

FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS

ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE AGRONOMÍA

ACTA DE SUSTENTACIÓN DE TESIS

En Cajamarca a los 18 días del mes de setiembre del año 2014 se reunieron en el Auditorium de la Facultad de Ciencias Agrarias los integrantes del jurado designado por Consejo de Facultad de Ciencias Agrarias según la Resolución N° 278-2014, con el objeto de evaluar la sustentación de la Tesis Titulada: "PROPIEDADES ANTAGONICAS DE KOMBUCHA A FITOPATÓGENOS FUNGOSOS EN CONDICIONES IN VITRO", a cargo de la bachiller en Agronomía: LIVIA DEL PILAR MIRANDA TORIBIO.


Para optar el Título Profesional de INGENIERO AGRÓNOMO.


A las 17 horas y 20 minutos y de acuerdo a lo estipulado en el Reglamento respectivo, el Presidente del Jurado dio por iniciado el acto.

Después de la exposición de la Tesis, formulación de las preguntas y la deliberación del Jurado, el Presidente del Jurado anunció la APROBACIÓN POR UNANIMIDAD con el calificativo de QUINCE (15). Por tanto, la graduada queda exenta para que se le expida el título Profesional correspondiente.

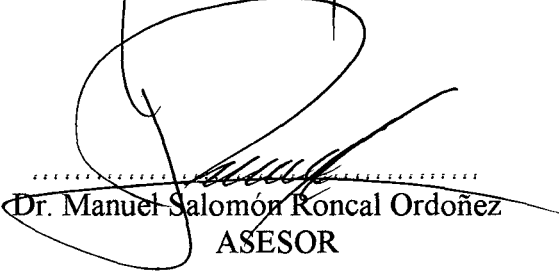
A las 18 horas y 30 minutos, el Presidente del Jurado dio por concluido el acto.

Cajamarca, 18 de setiembre del 2014


.....
Microblg. M. Sc. Jhon López Orbegoso
PRESIDENTE


.....
Ing. Oscar Sáenz Narro
VOCAL


.....
M. Sc. Salomón Murrugarra Abanto.
SECRETARIO


.....
Dr. Manuel Salomón Roncal Ordoñez
ASESOR

DEDICATORIA

A Dios porque siempre está iluminando mi camino del sendero y de los demás.

A mis padres, a mis hermanos: Quienes en todo momento estuvieron conmigo brindándome su apoyo incondicional, porque sin ello mi esfuerzo no se hubiese concretizado.

A mi esposo por su paciencia, comprensión, a mis hijas por brindar su tiempo y dedicar ese tiempo para lograr mis objetivos.

AGRADECIMIENTO

A mi maestro y asesor Dr. Manuel Salomón Roncal Ordóñez por su dedicación incondicional y desmedida a favor de la ciencia e investigación para la conducción y culminación del presente trabajo de investigación, al ingeniero Teresita del Niño Jesús Moreno Huamán por su incondicional apoyo en la culminación de mi investigación.

A mis docentes que, a través del tiempo, orientaron mi formación profesional.

ÍNDICE

CONTENIDO	PÁGINA
Resumen	i
Abstract	ii
CAPÍTULO	
I. INTRODUCCIÓN	1
II. REVISIÓN DE LITERATURA	3
2.1.- Generalidades de Kombucha	3
2.2. Utilidad de kombucha	3
2.3. Géneros de levaduras presentes en Kombucha	4
2.4. Proceso de fermentación	5
2.5. Obtención de ácido acético	6
2.6. Generalidades del té (<i>Thea arabica</i> L.)	9
2.7. Generalidades de los hongos fitopatógenos	9
2.8. Generalidades de los hongos fitopatógenos: cuyo inóculo se ha Expuestos al efecto antagónico de kombucha	12
2.9. Generalidades de Manejo Integrado	13
2.10. Referencias de antagónicos	23
2.11. Efecto antagónico de aceites y extractos vegetales a fitopatógenos	25
III. MATERIALES Y MÉTODOS	27
3.1. Ubicación del experimento	27
3.2. Materiales	27
3.3. Otros materiales	28
3.4. Tratamientos	28
3.5. Diseño Experimental	29

3.6. Metodología	29
3.7. Evaluaciones	32
IV. RESULTADOS Y DISCUCIONES	33
4.1. Efecto de kombucha en inóculo de cuatro especies de fitopatógenos fungosos	33
4.1. Tabla resumen, e ilustración del efecto de Kombucha, en inoculo de cuatro especies de fitopatógenos fungosos.	49
4.3. Prueba de Duncan en el efecto de Kombucha, a inóculos de cuatro especies de fitopatógenos fungosos	50
V. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	52
VI. LITERATURA CITADA	53
GLOSARIO	56
ANEXOS	59

RESUMEN

El conocimiento de productos exóticos comestibles, con principios medicinales, de origen oriental, aún, se encuentran rezagados en la cultura occidental. Es el caso de “Kombucha”, conocido en Cajamarca, como “Té de hongo”, consumido por algunas familias en forma de refresco. Esta bebida, según el investigador Gunther W. Frank, tiene propiedades curativas, principalmente, contra enfermedades del hombre de difícil curación con medicamentos convencionales. Teniendo este conocimiento, realizamos la presente investigación; sometiendo por cinco minutos el inóculo de fitopatógenos radiculares y foliares, al efecto del concentrado y diluciones 1/10, 1/100 y 1/1000. Determinando que el concentrado de Kombucha, tiene comportamiento antagónico al inóculo de *Rhizoctonia solani*, *Verticillium* sp y *Alternaria* sp.; las diluciones 1/10, 1/100, son antagónicas al inóculo de *Verticillium* sp., y *Alternaria* sp., debido a que en este líquido, se concentra metabolitos de los microorganismos que conforman “Kombucha”, como el ácido glucorónico, ácido acético y otros antagónicos a estos microorganismos patógenos. En cambio el inóculo de *Fusarium* sp., en el concentrado y las diluciones respectivas permitió la germinación de esporas con la consecuente formación de micelio; con limitación para el concentrado y la dilución 1/10.

ABSTRACT

The knowledge of products exotic groceries, with medicinal principles, of oriental origin, still, they are stragglers in the culture occidental. It is the case of "Kombucha", well-known in Cajamarca, as mushroom "Tea, consumed by some families in soda form. This drink, according to investigating Gunther W. Frank, has healing properties, mainly, against the man's of difficult cure illnesses with conventional medications. Taking this knowledge, we undertook this research; by submitting for five minutes the inoculum of phytopathogenic root and foliar, the effect of the concentrated and dilutions 1/10, 1/100 and 1/1000. Determining that the concentrated Kombucha tea, is adversarial behavior to the inoculum of *Rhizoctonia solani*, *Verticillium* sp and *Alternaria* sp.; the dilutions 1/10, 1/100, they are antagonistic to the inoculum of *Verticillium* sp., and *Alternaria* sp., due to the fact that this liquid, concentrated metabolites of the microorganisms that make up "Kombucha", as the glucoronico acid, acetic acid and other antagonistic to these pathogens. In contrast the inoculum of *Fusarium* sp., in the concentrate and the dilutions respective allowed the germination of spores with the consequent formation of mycelium; with the restriction to the concentrate and a dilution of 1/10.

CAPITULO I

INTRODUCCIÓN

La kombucha, conocida en nuestro medio como agua de hongo es bebida de tradición milenaria en diferentes países del oriente asiático como bebida destaca por su refrescante y agradable sabor en las primeras 72 horas de su preparación debido al proceso de fermentación de la sacarosa. Los consumidores aducen que tiene propiedades medicinales alivia malestares digestivos y otras dolencias producto de desórdenes alimenticios, previene infecciones fungosas y bacterianas, estas evidencias lo reportan los orientales debido a que su consumo alivia escoriaciones de la piel inducida por hongos dermatógenos.

El líquido refrescante se obtiene por fermentación de la sacarosa por acción de diferentes microorganismos que conforman el cuerpo fructífero conocido como kombucha; de éstos destacan *Saccharomyces* sp., *Acetobacter xylinum*, y otros hongos que prosperan en el agua azucarada de té. (*Thea arabica* L.).

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 estas 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. Teniendo en cuenta todo lo mencionado organizamos la presente investigación con el propósito de obtener un producto alternativo que limite la germinación de inóculo de cuatro fitopatógenos comunes.

Objetivo

Determinar la dilución antagónica efectiva de Kombucha contra fitopatógenos fungosos en condiciones "in vitro".

CAPÍTULO II

REVISIÓN DE LITERATURA

2.1. Generalidades de Kombucha

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

Las exploraciones científicas de kombucha comenzaron en los años 1950. En el Instituto Científico “Moscow Bacteriologica Institute”, como parte de un proyecto nacional de investigación sobre el cáncer. Los investigadores descubrieron que la masa blanquecina suave está constituida por una simbiosis de microorganismos, que prosperan en agua azucarada de té formando un cuerpo fructífero de consistencia gelatinosa de color blanco cremoso en la superficie y de color marrón claro en el envés (Barbancik, 1954).

Los microorganismos que integran kombucha tienen carácter industrial, destacan levaduras de la clase Ascomycetes género de *Sacharomyces* y las bacterias de la clase Schizomicetes género *Acetobacter* (Günther, W. Frank. 1991).

2.2. Utilidad de 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. Kombucha por ser un fermento tipo sidra es bebida agradable que se utiliza como bebida anti sed, su consumo tiene la ventaja porque se ingiere los

microorganismos integrantes vivos tanto de hongos como 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. Género *Saccharomyces* sp., son organismos unicelulares posee 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 son orgánulos filamentosos que se encuentran flotando en el citoplasma; desplazándose de una parte a otra dentro la célula (Gunther, & Frank, 1991).

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 adenosíntrifosfótico) 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, Martinko y Parker, 2006).

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

2.3.2. *Zygosaccharomyces rouxii*, son células elipsoidales la mayoría con más de 5 μm de largo puede crecer sobre substratos azucarados, condición que facilita su actividad, se estima alrededor de treinta especies que se multiplican en un rango de 0,876% y 0,912%, de concentración de azúcar (Brock, Smith, Madigan, 1987).

Taxonómicamente el género *Saccharomyces* por presentar quitina en la pared celular y sus características morfológicas se incluye en el reino Fungi filo Ascomycota clase Hemiascomycetes orden Saccharomycetales familia Saccharomycetaceae (Brock, Smith, Madigan, 1987).

2.3.3. Bacteria *Acetobacter xylinum*, presenta flagelos periticos, encargada de llevar a cabo la oxidación incompleta de alcoholes de cadena larga y de azúcares, esto ocurre porque cumplen con el ciclo del ácido cítrico hasta CO₂ conduciendo a la acumulación de ácidos orgánicos, como productos finales (Gerard, Tortora, 1993).

2.4. Proceso de la 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, (cuya fórmula química es: 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, Smith, Madigan, 1987).

El etanol resultante se emplea en la elaboración de algunas bebidas alcohólicas, tales como el vino, cerveza y 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, Chamuzo, 1994).

2.4.1. Fermentación de la glucosa, cuando la glucosa se degrada, por vía de la glucolisis 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 óxido-reducción manifestándose la fermentación con la producción de **etanol** y liberación de CO₂. La vía bioquímica del **piruvato** se denomina

glucolisis y algunas veces recibe el nombre de Embden Meyerhof en honor a sus descubridores (Gerard, Tortora, 1993).

Hay que recalcar que todavía no se han efectuado cambios redox, puesto que las tres reacciones se realizan sin ninguna transferencia de electrones, aunque se han empleado dos enlaces fosfato de altas energías provenientes del ATP. La primera reacción de oxidación tiene lugar en la conversión del gliceraldehído-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 esterificado) constituyendo de esta manera base de la fosforilación del sustrato y la formación del ATP, como reacción más importante en los organismos vivos (Voet, Voet, 2006).

En la fermentación completa se emplea dos moléculas de ATP para fosforilación del azúcar y se sintetiza cuatro moléculas de ATP (dos por cada fragmento de tres carbonos), con que la ganancia neta es 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 (14.8kcal en dos mol de ATP) y el resto se pierde en forma de calor (Voet, 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, 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 agria. (Voet, Voet, 2006).

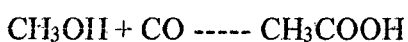
La ruta biológica de producción de Ácido Acético está en el orden del 10%, de la producción mundial, siendo las bacterias fermentativas las responsables del proceso de obtención de este vinagre de calidad para la industria culinaria. El 75% del ácido acético procedente de la industria química se obtiene a través de la carbonilación del metanol; existiendo otros métodos alternativos de producción de este producto (Brock, Smith, Madigan 1987).

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 (Gerard, Tortora, 1993).

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*) (Gerard, Tortora, 1993)

La mayor parte del vinagre hoy en día es hecho en cultivo de tanque sumergido, descrito por primera vez en 1949 por Otto Hromatka y Heinrich Ebner. En este método el alcohol se fermenta a vinagr, en un tanque agitado continuamente 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 sólo 24 horas en un proceso por lotes, incluso de 20% en 60 horas (Gerard, 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 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. Este proceso catalizado por iridio es más verde y más eficiente y ha sustituido ampliamente al proceso Monsanto, frecuentemente en las mismas plantas de producción (Gerard, Tortora, 1993).

2.5.2. Acción del ácido acético, en medicina al 1% es importante para vendajes quirúrgicos en concentraciones de 2-5%, se utiliza para aliviar otitis externas provocados por *Pseudónimas* 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 *Tricótomos* sp., y al 0,25% se utiliza para irrigación de la vejiga (Gerard, 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, 1993).

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 (Gerard. Tortora. 1993). Como desinfestante, 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. En laboratorios de biología y especialmente de diagnóstico microbiológica y otros

ambientes donde se realizan trabajos de investigación que requieran de asepsia, se utiliza alcohol etílico de 96 grados (Gerard, Tortora, 1993).

2.6. Sustancias bioquímicas de kombucha, producto compuesto por levaduras y bacterias que después del proceso de fermentación y oxidación, el hongo lleva a cabo diferentes reacciones complicadas en la sedimentación del té, el hongo de té se alimenta de azúcar a cambio produce otras sustancias valiosas que cambian dentro de la bebida: vitaminas aminoácidos, sustancias antibióticas, ácido glucurónico, ácido acético y otros no determinados por lo tanto el té de hongo es una fábrica bioquímica real (Gunther, W. Frank. 1991).

2.6.1. El ácido Glucurónico, es altamente hidrosoluble conocido también como ácido del azúcar que se encuentra en la orina, este ácido reúne toxinas, como las drogas y las hormonas que se encuentran en el hígado y ayuda a eliminarlas del cuerpo, el ácido glucurónico es usualmente utilizado como desintoxicante junta a las toxinas y las hace más hidrosolubles para que se eliminen más fácilmente por la orina. También se une a las hormonas y las libera en todo el cuerpo (Gunther, W. Frank. 1991).

2.6.2. Aminoácidos, los aminoácidos son compuestos orgánicos que se combinan para formar proteínas. Los aminoácidos y las proteínas son los pilares fundamentales de la vida, un aminoácido es una molécula orgánica con un grupo amino (-NH₂); y un grupo carboxilo (-COOH) (Gunther, W. Frank. 1991).

2.7. Generalidades del té (*Thea arabica* L.)

Su origen se remonta a la mitología japonesa, acreditado por el Santo Budista Chino Bodhidharma, meditando durante nueve años frente a una pared. Tiempo que condujo al Santo a quedar profundamente dormido luego de despertar se disgustó por haberse quedado dormido este disgusto hizo que se corte sus párpados, para de esta manera asegurarse, a no quedarse dormido nuevamente durante sus meditaciones. De sus párpados caídos al suelo crecieron plantas cuyas hojas inmersas en agua caliente producen una bebida que combaté el sueño (Muñoz, F. 2002).

Bromatológicamente la composición química general de los brotes de té varían según las condiciones agroclimáticas, fecha de cosecha prácticas culturales y características genéticas de la planta cuya popularidad como bebida se atribuye a los polifenoles y xantinas ambos grupos responsables del sabor único, sumado a los numerosos compuestos asociados a este aroma (Muñoz, F. 2002).

Tanto los brotes como hojas presentan complejos químicos de enzimas, carbohidratos, proteínas y lípidos. Los brotes se distinguen por su marcado contenido en polifenoles (flavonoides, teaflavina, tearubigina) y xantinas (cafeína, teobromina y teofilina); compuestos que integran entre 15 a 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 un 75 a 78% de agua. Hacen falta 4kg de hojas frescas para hacer 1kg de té terminado. Los mayores compuestos oxidables de las hojas son las catequinas sustancias pertenecientes al grupo de los flavonoides; destacan el epigalato de catequina éstas se encuentran en las vacuolas jugando un rol fundamental durante el proceso de la fermentación (Muñoz, F. 2002).

En la salud humana las catequinas, intervienen en la reducción de los triglicéridos y colesterol de la sangre previenen la arteriosclerosis refuerza las paredes de las venas regula la presión sanguínea y previene las 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 son los siguientes:

Destacan las proteínas (20 a 30%), aminoácidos (1 a 5%), 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%), Substancias aromáticas (0,005 a 0,03%), vitaminas (0,6 a 1%), saponarias (0,07 a 0,1%), esteroides (0,04 a 0,1%). Estas son las sustancias orgánicas (Muñoz, F. 2002).

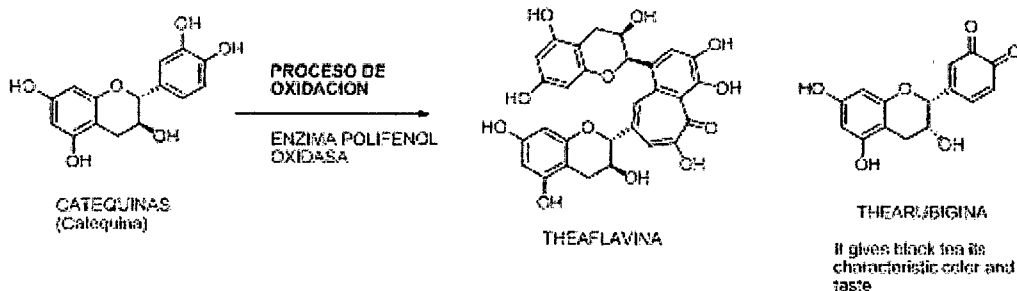
Como resultado de un análisis científico de la composición química del té, se ha determinado que contiene 27 elementos minerales, además del carbono (C), hidrógeno (H), oxígeno (O₂) y nitrógeno (N); se encuentra fósforo (P), potasio (K), magnesio

(Mg), manganeso (Mn), flúor (F), aluminio (Al), calcio (Ca), sodio (Na), azufre (S), hierro (Fe), arsénico (Ar), cobre (Cu), níquel (Ni), silicio (Si), cinc (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 fluor, potasio, aluminio, yodo, selenio, níquel, arsénico y manganeso 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 (Muñoz, F. 2002).

2.7.1. Procesamiento del Té comercial, el té negro o común se prepara a partir de los brotes secos del arbusto *Thea arabica* denominado botón y de las dos primeras hojitas 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 (Muñoz, F. 2002).

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 la enzima. Una vez que el proceso está completo, las hojas rotas se secan y se preparan para su empaque (Muñoz, F. 2002).

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. **Thearubigina** es la que da el color y sabor característico al té negro.



2.7.2. Descripción de algunas sustancia química presentes en el té negro.

2.7.2.1. Teaflavinas (TF), son sustancias rojas o naranjas que contribuyen la intensidad, el brillo y el color de la infusión de té. Las teaflavinas del té negro comprenden varias fracciones (Muñoz, F. 2002).

2.7.2.2. Tearubiginas (TR), son sustancias altamente polimerizadas: son los productos de 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 (Muñoz, F. 2002).

2.7.2.3. Cafeína, es una molécula relativamente estable y es un estimulante directo del sistema nervioso central. Junto con TF imparte fuerza al licor o 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 al té negro. Los componentes de sabor volátiles incluyen aminoácidos que se degradan para producir linalol, fenil acetaldehído, fenil etanol y metil que contribuyen al aroma deseable del té (Muñoz, F. 2002).

2.8. Generalidades de los hongos fitopatógenos

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 sólo presentan septos en la parte terminal del talo, donde se forma el esporangio o estructura almacén de esporas y zoosporas (Roncal, 2004).

El conjunto de hifas, esporangióforos, conidióforos, esporas y conidias respectivamente conforman el micelio (Roncal, 2004).

Son quimioheterótrofos algunas especies viven sobre materia orgánica muerta, otros son parásitos sin 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 (Roncal, 2004).

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).

2.9. Generalidades de los hongos fitopatógenos: cuyo inóculo se ha expuesto al efecto antagónico de kombucha

2.9.1. *Fusarium* sp.

Este género fue descrito por primera vez por Martius en 1842 y patentado por Saccardo en 1881. En su fase perfecta forma ascocarpo en peritecio que corresponde al género *Nectria*, que sobre el sustrato natural forma peritecios globosos de color naranja pálido ocre y termina de color marrón claro. Las ascas son cilíndricas con terminación coniforme de 60-80 x 8-12 μm ; contienen ocho ascosporas elipsoides a ovoides hialinas o marrón claro con un septo central de 11-18 x 4-7 μm . Tanto en su estado homotálico como heterotálico presentan macroconidias delgadas y/o abultadas (Ames, 1974).

El micelio en medio de cultivo con agar, primero es de crecimiento lento posteriormente se diferencia el micelio de colores distintos según la especie unos son blanquecinos, crema pálido, rosado, rojo claro, ocasionalmente de color marrón claro. Generalmente el desarrollo micelial responde a la luz formando diferentes formas de microconidias y abundante formación de macroconidias (Ames, 1974).

El conidióforo, se forman en la parte lateral de la hifa somática algunos son pequeños denominados microconidióforos otros son relativamente grandes y corresponde a la

nominación macroconidióforos ambos terminan en ramificaciones en forma de botella denominados fiálides, tamaños diferentes según la especie desde 2- 4 μm x 8 – 16 μm (Ames, 1974).

Los fiálides denominadas células conidiogénicas, debido a que en su interior los núcleos se recubren de protoplasma protegidos por una membrana hasta la diferenciación del conidio el que emerge a través de la apertura apical. (Roncal, 1993), algunas ramificaciones individuales de la hifa son fiálides conocido como monofiálide en cuya parte apical se agrupan los conidios (Alexopoulos, 1996).

En el sustrato natural y a veces en medio de cultivo se forman esporodoquios, estructura en forma de cojín, del cual emergen los conidióforos pequeños y ramificados en fiálide (Roncal, 1993).

El micelio en sus inicios origina la formación de fiálides; y sobre este es fácil distinguir la proliferación de microconidios fisiología que ocurre mayormente entre dos y tres días de incubación (Booth, 1971), son ovoides, alargados de tamaño que oscila entre 8-16 x 2-4,5 μm los monofiálides alargados y finas suelen medir de 40-80 x 2,5-3 μm (Alexopoulos, 1996).

Los macroconidios en las diferentes especies se forman después de tres, cuatro, a siete días de incubación, el tamaño varía de 4-5 μm x 28- 32 μm . Las diferentes especies forman estructuras de resistencia nominados clamidosporas, se caracterizan por presentar pared lisa o rugosa se forman en parejas o individuales. (Ames, 1974) éstas se forman en células terminales intercalares o en forma lateral de la hifa somática como también en las células centrales de la macroconidias (Roncal, 1993).

La estructura de la pared celular de las macroconidias de las diferentes especies de *Fusarium* sp., se caracteriza por tener mayor concentración de quitina sustancia impermeable a soluciones dañinas como los fungicidas. Este compuesto químico es sintetizado por la membrana citoplasmática exterior en condiciones adversas. (Alexopoulos, 1988); ocurrida la impermeabilidad de las paredes celulares de las

macroconidios ésta se constituyen en conidios de conservación bajo estas condiciones se limita al máximo la actividad fisiológica de los diferentes orgánulos inmersos en el citoplasma (Roncal, 2012).

Las diferentes especies del género *Fusarium* desde 1935 a la actualidad han tenido controversias de clasificación taxonómica es importante recalcar los trabajos de Wollen weber (1934), Reinkin (1935) y otros quienes aportaron conocimientos básicos para que Nelson, Tousson y Marasas (1983), establecieran la categoría taxonómica conocida como “sección”. Cada sección representada por una o más especies y sus respectivas formas especiales a la fecha se encuentra reportadas las secciones:

- a) Martiellaventricosum, con la especie *F. solani*,
- b) Elegans, *F. oxysporun*,
- c) Spicarioides, *F. rigidiuscula* = *F. decemcellulare*,
- d) Liseola, *F. moniliforme*,
- e) Discolor, *F. graminearum*, *F. culmorum*,
- f) sección Lateritium, *F. lateritium*,
- g) Sporotrichiella, *F. tricinctum*,
- h) Roseum, *F. roseum*,
- i) Eupionnotes, *F. episphaeria*,
- j) Gibbosum, *F. equiseti*.

Todas las secciones se incluyen en la clase forma Deuteromycetes orden forma Moniliales familia forma Tuberculariaceae (Roncal, 1993).

La mayoría de especies de *Fusarium* no tienen capacidad de penetrar directamente el tejido de hospedero requieren de aperturas naturales o artificiales inducidas por insectos y otros fitopatógenos (Hooker, 1980).

El inoculo infectivo en el sistema radicular son los conidios éstas bajo condiciones de temperatura entre 22 - 28°C, del suelo y humedad relativa que supera la capacidad de campo germinan un tubo de germinación, que por quimiotaxismo, se dirigen a las heridas de los pelos radiculares, logrando establecerse en el xilema y floemas; en ambos

de desarrollan en forma intra e intercelular, procurando toxinas que diluidos en la solución suelo se desplazan al follaje ocasionando intoxicación de las células del ápice y borde hasta inducirles la necrosis en forma de necrosis regresiva de color pajizo a marrón oscuro (Roncal, 2004).

Las hifas al inicio de la infección desarrollan intercelularmente; penetran dentro de las células cuando están en proceso de intoxicación o muertas. En los tejidos necrosados los filamentos desarrollan en forma lenta, mostrándose visibles en los espacios intercelulares bajo estas condiciones no existe reacción celular del hospedero al desarrollo y crecimiento del hongo. Las porciones del tubérculo afectado muestran menor cantidad de almidón el micelio es abundante, puede estar confinado a los espacios intercelulares en los cuales además se deposita suberina al igual que en las paredes celulares de otros tejidos del hospedero (Hooker, 1980).

En tejidos susceptibles no se realiza hidrólisis de almidón ni acumulación de suberina. Las lesiones pequeñas cercanas a la infección están tapizadas de una capa continua de células de meristemo de cicatrización con deposición de suberina. En otro caso las hifas matan las células y penetran dentro de dos células de apariencia normal. Los detalles de la infección dependen de la virulencia del patógeno y de la resistencia de la lesión examinada determinada por la variedad (Hooker, 1980).

Los *Fusarium* pueden vivir muchos años en el suelo; pero el inóculo primario de *F. solani*, siempre se encuentra en la superficie de los tubérculos a partir de los cuales los propágulos contaminan los envases, los equipos usados para la recolección y almacenamiento inoculando las heridas ocasionadas durante el transporte de la semilla, especialmente cuando se trata semilla cortada, la misma que se pudre infectando el suelo adherido a los tubérculos cosechados (Hooker, 1980).

2.9.2. *Rhizoctonia solani* Kuhn.

Esta especie fue reportada por primera vez por Kuhn en Alemania en 1858 afectando papa y en nuestra patria por Abboot en 1931, la mayoría de fitoenfermedades inducidas por este patógeno en los diferentes cultivos son inducidos por *R. solani* (Torres, H. 2002).

El género *Rhizoctonia* presenta diferentes especies, unas con micelio hialino y otras, como *Rh. solani* de color marrón las células de los filamentos son alargadas, la septa de la ramificación se encuentra distante de la hifa principal; este modelo de ramificación tiene la forma de una "T", figura fácilmente distinguible bajo el microscopio (Roncal, 1993), formando auténticos ángulos rectos la base de la ramificación que forma la "T"; presenta una constricción esta peculiaridad corresponde a la fase imperfecta (FI) (Torres, H. 2002).

En la fase perfecta está representada por el *Basidiomycetes Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (Barron 1968) y por *Corticium vagum* Berk., *Pellicularia filamentosa* Pat., *Hipochnus solani* Prill y Delacr de la clase Ascomycetes (Roncal, 2004).

En algunas especies los filamentos forman clamidosporas en cadena y otros una masa fungal semejante a esporodoquio (Torres, H. 2002).

Los esclerocios en los inicios de su formación se muestran brillantemente coloreados, cubiertos de una pared de color marrón a negro (Barnett & Hunter, 1999), las razas de *Rh. solani* que tienden a producir esclerocios sobre los tubérculos no tienen la capacidad de infectar tallos estolones y raíces en cambio las razas que afectan tallos tienen menor tendencia a producir esclerocios sobre los tubérculos estos últimos afectan fuertemente al algodón y frijol no así al tomate y maíz (Torres, H. 2002).

Taxonómicamente *Rh. solani* se ubica en la clase forma Deuteromycetes orden forma Agonomycetales o Mycelia Sterilla, familia forma Agonomycetaceae (Alexopoulos & Mims, 1979).

El nombre de la fitoenfermedad provocada por *Rhizoctonia solani* en América del Sur tiene distintas nominaciones en el Perú se conoce como “rizoconiasis”, en Chile como “costra” o “sarna negra (Torres, H. 2002).

El inoculo constituido por esclerocios y porciones vegetativas de los filamentos brotan entre 1 a 22°C; y humedad relativa que supere el 65%, y cuando existe nubosidad permanente (Roncal, 2004), causando ahogamiento en la mayoría de las plantas afectando raíces, tallos, tubérculos, cormos y otros órganos en brotes de tubérculos la infección se aprecia como brotes muertos a medida que sigue la diferenciación de los tejidos a nivel de cuello de plántulas, plantones y planta franca las lesiones en el tejido cortical se muestra de color de café antes de su muerte (Agrios, G. 1996).

Semillas en proceso de germinación y en plántulas de diferentes especies, tanto en campo definitivo como en invernadero ocasiona la “chupadera fungosa”, pre y post emergente (Roncal, 2004), estos síntomas se han reportado en chalarina (*Casimiro aedulis*), (Chuquimango Alvarez, Delicia Dolores y M. Roncal, 2012) membrillero (*Cydonea oblonga*) (Chuquimango Alvarez, Julia Teodelinda y M. Roncal, 2012) frutales de Cajamarca.

En plantas jóvenes y adultas, las infecciones mayormente se muestra a nivel de cuello, destruyendo el tejido cortical bloqueando los haces conductores no permitiendo la traslocación de los fotosintatos a los tubérculos que son los órganos de reserva por el contrario se acumulan en las yemas axilares formando los comúnmente llamados tubérculos aéreos pigmentados de verde y púrpura violáceo. A medida que ocurre la infección afecta al xilema la planta se marchita y muere (Roncal, 2004).

2.9.3. *Verticillium* sp.

El género *Verticillium* corresponde a estados de *Gliocladium roseum*, *Stilbum* sp., *Sepedonium* sp., *Mycogone* sp., *Stephanoma* sp., y de otros hongos más que morfológicamente se parecen (Romero, 1988).

El nombre de la fitoenfermedad “verticiliosis” deriva del género del patógeno el síntoma característico corresponde a marchites generalizada de la planta. El Centro Internacional de la Papa (CIP), reporta que *Verticillium dahliae* Kleb, es el causante de esta enfermedad; aunque en el pasado se le atribuyó a *Verticillium albo atrum* Reinke y Berthold (Roncal, 2004).

En medio de cultivo PDA el hongo presenta inicialmente hifas hialinas septadas y ramificadas (Roncal, 1993), entre 24 y 48 horas es algodonoso de color blanco (Roncal, 2004). En campo es común encontrarlo parasitando a otros hongos, los conidióforos individuales, se ramifican formando fialides en verticilos a este tipo de ramificación también se lo conoce como esterigmas, estructura que termina en punta roma los núcleos en su interior se cubren de protoplasma, membrana y pared celular; en estado aún joven emerge acumulándose paulatinamente en una sustancia gelatinosa pegajosa que vista al microscopio se aprecia un conglomerado de esporas unicelulares (Roncal, 1993).

Las esporas o conidios por la disposición en el fialide se denominadas fialosporas son unicelulares ovoides a elipsoides hialinas (Romero, 1988), en el conglomerado cumplen su madurez fisiológica, soltándose paulatinamente bajo la forma de inóculo potencialmente infectivo (Roncal, 2004).

En medio de cultivo sintético y natural, forman estructuras de conservación nominadas clamidosporas que cuando se aglutinan forman microesclerocios de color negro la temperatura favorable para formar esclerocios es de 10 a 20°C, (Roncal, 1993), en este estado el patógeno inverna en el suelo hasta por 50 años. Estos microesclerocios como inóculo se diseminan a través del agua movimiento de suelo cuando éste tiene 100

microesclerocios por gramo destacando que entre seis a 50 microesclerocios es suficiente para producir infecciones de consideración (Agrios, 1996).

Taxonómicamente de *Verticillium* sp., integra la clase forma Deuteromicetes, orden forma Moniliales y familia forma Moniliaceae (Roncal, 2004).

Como todas las especies del género *Verticillium* éstos son considerados como patógeno vascular induciendo marchites generalizada (Romero, 1988), ingresa al hospedero a través de las heridas naturales y artificiales de las raíces, proliferándose en los vasos leñosos en forma ascendente (Roncal, 1993); tanto las infecciones de tallos, raíces y estolones; impiden el pasaje del agua y nutrientes así como también de los fotosintatos a los diferentes tejidos causando de esta manera la muerte de las células debido a la producción de toxinas. El marchitamiento foliar se inicia en las hojas inferiores y abarca toda la planta. Algunas veces se presenta unilateralmente afectando solo a los folíolos de uno de los lados de la hoja en tanto que los de otro sector se mantienen con apariencia sana. En ocasiones este marchitamiento se presenta solo en un sector del folíolo (Romero, 1988).

La velocidad de colonización depende de la susceptibilidad de la variedad estado nutricional, temperatura ambiente entre 22 a 25°C, la mayor oportunidad de infección ocurre a través de raíces jóvenes y heridas (Agrios, 1996).

2.9.4. *Alternaria* sp.

Las diferentes especies de alternaria, son fitopatógenos de hojas y frutos; destacan *Alternaria solani* Sorauer = *Macrosporium solani* Ellis and Martín, causa alternariosis o tizón temprano en papa (*Solanum tuberosum*); esta fitoenfermedad se desarrolla en hojas seniles; de preferencia en cultivos de la sierra peruana. En las regiones costeras los daños no son de consideración (Romero, 1988).

En hortalizas de acuerdo a la especie destacan *A. brassicae* en col (*Brassica oleraceae*), *A. dauci* en zanahoria (*Daucus carota*), *A. tenuis*, *A. tenuissima* (Romero, 1988)

Morfológicamente, *Alternaria* sp., en medio de cultivo PDA y medio natural presentan micelio algodonoso color gris oscuro a negro. Las hifas vistas al microscopio son de color marrón brillante. (Roncal 2012), otras se muestran con pigmentación marrón claro a oscuro, dependiendo de la especie (Agrios, 1996), los filamentos presentan células multinucleadas (Rotem, 1994).

Los conidióforos tanto en medio natural como en PDA, se muestran como ramificaciones de las hifas tienen distribución individual o solitarios raras veces forman grupos son erectos y flexuosos la pigmentación que caracteriza a los Dematiaceos; en esta estructura se concentra más por eso se observa más oscuros que la hifa somática. El diámetro de los conidióforos de las diferentes especies es variable, habiendo determinado que en *A. solani* es de 6 a 10 μm de diámetro, y hasta 110 μm de largo (Torres 2002), la temperatura óptima de producción de conidióforos es de 5 a 35°C. La glucosa en medio de cultivo favorece la proliferación de conidióforos pero sin conidios (Rotem, 1994).

Los conidios constituye el inóculo se forma en el ápice del conidióforo primero se observa como una estructura abultada incolora posteriormente aumenta de tamaño se divide en dos terminando multicelular, multiforme con septas longitudinales y transversales; según la especie (Roncal 2012).

Los conidios de *A. solani* en la plenitud de su desarrollo alcanzan de 15 a 19 μm x 150 a 300 μm con, 9 a 11 septas transversales esporádicamente encontramos con pocas septas perpendiculares (Hooker, 1980), también se reporta que el espesor varía de 12 - 20 μm , de 12 - 30 μm ; por 67 - 178 y de 139 - 441 μm de largo; cada célula es multinucleada. La temperatura óptima de proliferación de conidios es de 22,5°C; aunque estas se forman desde 10 a 30°C (Rotem, 1994).

Los conidios siempre se presentan solitarios, raras veces catenuladas, derechas a ligeramente curvadas con el cuerpo más o menos elipsoide u oblongo que va angostándose gradualmente en forma cónica para formar una especie de pico largo. Este es flexuoso a veces ramificado mide entre 2,5 a 5 μm de diámetro (Hooker, 1980).

Taxonómicamente se categoriza en, la clase forma Deuteromicetes orden forma Moniliales familia forma Dematiaceae (Roncal, 1993).

La patogénesis inicia con la germinación individual o generalizada de las células de los conidios (Roncal, 2012), requieren de 4 a 28°C, hasta temperatura menor a los 40°C; también se reporta que lo hacen desde -5°C a + de 35°C, siendo el rango óptimo es de 8 a 32°C (Rotem, 1994).

Alternaria sp., es un hongo extremadamente común en abonos, plantas (fresas, crisantemos, tomates, zanahorias y espárragos), pulpa de madera y madera podrida pero también se encuentra en alimentos y tejidos, así como en diferentes tipos de suelo. En los invernaderos con cultivos de crisantemos y tomates se aísla de las plantas enfermas o muertas por su tendencia a habitar sustratos orgánicos en descomposición. Produce con frecuencia manchas negras en las hojas de las plantas (Agrios, 1996).

Las esporas expuestas a humedad de saturación seguidos del rango óptimo de temperatura germinan en dos horas el 100%. Los tubos de germinación penetran en forma directa o a través de estomas a la epidermis (Rotem, 1994); el micelio septado dentro del mesófilo foliar invade células, produciendo toxinas que ocasionan la muerte de estas a un en áreas lejanas del contacto con el hongo (Romero, 1988), debido a la rápida movilización de la toxina de este patógeno (Roncal 2004), durante la patogénesis limitan considerablemente la fotosíntesis y la respiración (Rotem, 1994).

Cuando la infecciones ocurren en las hojas los primeros síntomas aparecen como puntos cloróticos al aumentar de tamaño conducen a la necrosis de la parte central, distinguiéndose de esta manera el área honecrótica (área muerta); de la plesionecrótica (halo clorótico). El área necrosada es de color marrón oscuro a negro quedándose adherida a la planta (Roncal, 2004). En la mayoría de especies el tejido muerto muestra anillos concéntricos (Hooker, 1980).

Durante la patogénesis, se inhibe la fotosíntesis; la esporulación se incrementa (Rotem, 1994). La infección en tubérculos, frutos post cosecha ocurre a través de heridas, cuando la temperatura oscila entre 12 a 16°C. (Torres, 2002; Hooker, 1980); es frecuente la presencia de diferentes especies de *Alternaria* en frutos de tomate y rocoto; el micelio prospera mayormente en la placenta; ocasionando necrosis deshidratada de color oscuro (Roncal, 1995).

2.10. Generalidades de Manejo Integrado

En 1972, expertos de la FAO se ocuparon de los términos “Control Integrado” definiéndolo como un sistema de manejo de plagas que en el contexto del ambiente y la dinámica de poblaciones de las plagas se debe tener cuidado en utilizar técnicas diversas de tal manera mantener estas poblaciones de plagas sin causar daño económico (INIA – FAO, 1979).

En la década de los años 1980 los términos “Control Integrado” se cambió por “Manejo Integrado” palabras que universalmente involucra no al exterminio de un insecto plaga sino más bien a la oportunidad de vida en convivencia (Roncal, 2000).

Control aplicado de la plaga que combina e integra medidas biológicas y químicas en un solo programa unificado de control de plagas. El control químico se usa sólo donde y cuando es necesario, y en la forma que sea menos destructora para los benéficos factores reguladores del medio ambiente. Se puede hacer uso de los parásitos, depredadores y patógenos de los insectos que se presentan en forma natural, así como de los agentes biológicos introducidos por medios artificiales (Zirena, 1977).

Utilización de todas las técnicas adecuadas para reducir y mantener la población de las plagas por debajo del nivel en que causan daño de importancia económica a la agricultura y a los bosques, o reuniendo dos o más métodos de control en un sistema adecuado para mantener las plagas a niveles por debajo de los que causan daño, un sistema que se debe basar en principios y métodos ecológicos firmes, el objetivo principal del “Manejo Integrado” es mantener las condiciones favorables para el

crecimiento y desarrollo del vegetal cultivado, siempre tomando en cuenta el ambiente, los principios ecológicos y socio ecológicos (René, 1990).

Los técnicos del control biológico están tratando con complejos problemas biológicos, con las interacciones de poblaciones de uno o varios parásitos, y con cada uno, con hiperparásitos, y todos con poblaciones de predadores, y además con los factores climáticos y ambientales. Así mismo los problemas de taxonomía en el control biológico pueden ser complejos, involucrando la identificación y clasificación de especies de todas esas categorías. Todos en conjunto, los problemas poseen un reto al taxónomo como al técnico en control biológico un reto que puede resolverse en forma más adecuada mediante el mayor trabajo conjunto posible (Zirena, 1977).

Los microorganismos entomopatógenos de importancia universal corresponde a *Bacillus thuringiensis* (Berliner), 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 entopatógeno de importancia para controlar diferentes insectos de los cultivos. (Valenzuela, 1987), *Agerita webberi*, *Cordyceps* sp, de singular importancia para utilizarlo como controlador biológico. (Rene, 1990), *Paccylomyces lilacynus*, hongo saprofito parasita larvas de insectos y nematodos (Roncal, 1993), *Trichoderma viride* es antagónico contra diferentes fitopatógenos fungosos de suelo incluso contra los entomopatógenos *Beauveria bassiana* (Bals) Vuill., *Metarhiziumani sopliae* (Metsch) Sorok y *Pochonia chlamydosporia* (Goddard). *Pseudomonas* sp., en condiciones in vitro muestra antagonismo contra *Lasiodiplodia theobromae*, patógeno de mango (*Manguifera indica*), en Piura (Romero, 1993).

Plodia theobromae, hongo causante de la pudrición del pedúnculo en mango, en Chulucanas – Piura; tiene a la bacteria *Pseudomonas* ssp., como agente antagónico; primero se experimentó bajo condiciones “in vitro”, obteniendo resultados satisfactorios en campo (Gastón, A.1999).

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; éstas bacterias fueron identificadas como *Pseudomonas putida* Biotipo B (ENA-12) y *Bacillus cereus* GC sub grupo A (ENA 24). (Gastón, A.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 antagonicos desarrollan sobre el micelio del hongo patógeno de igual manera ocurre con *B. subtilis* (Romero, 1993).

2.11. Referencias de antagonicos

2.11.1. Microorganismos antagonicos a fitopatogenos

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

Reportes de antagonismos en condiciones “in vitro”, utilizando cepas de *Pseudomonas putida*, y de *Bacillus* sp.; contra *Colletotrichum gloesporioides* Penz. Causante de antracnosis en frutos post cosecha de mango (*Mangifera indica*); con resultados satisfactorios 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 moniliacis en cacao (*Teobroma cacao*); actualmente forma parte del programa de manejo integrado del cultivo de cacao en la selva peruana (Soberani *set 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 (XIX Congreso Peruano de Fitopatología. 2006).

2.12. 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 encontró con *Colletotrichum* 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 en un 12% con la dosis alta (Arévalo *et al.*, 2006).

En medios de cultivo elaborados a base de *Brasica campestris* (mostaza), *Raphanus raphanistrum* (rábano silvestre) y *Brasica oleracea* (brócoli), el crecimiento de *Sclerotium cepivorum* no prospero, indicando que estas especies poseen sustancias antagónicas al hongo (Neiser. E. H. Nimboma 2012).

CAPÍTULO III

MATERIALES Y METODOS

3.1. Ubicación del experimento

El presente trabajo se desarrolló en el Laboratorio de Fitopatología, de la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Cajamarca, ubicada a 2 752 m de altitud entre los parámetros 78° 27' 33'' y 78° 30' 50'' de longitud oeste y desde los 07° 07' 09'' hasta los 07° 10' 04'' de longitud sur.

3.2. Materiales

3.2.1. Material experimental

100 g de té comercial

Hongo de té.

Inóculo de Cepas de fitopatógenos comunes, *Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Verticillium* sp., *Alternaria* sp.

3.2.2. Material de vidrio

Láminas porta y cubre objetos, frasquitos de cristal, placa Petry, tubos de ensayo, pipeta, probetas y vasos de diferente capacidad.

3.2.3. Equipo de esterilización y asepsia

Estufa, autoclave, cámara de flujo laminar, incubadora.

3.2.4. Equipo óptico

Microscopio compuesto, microscopio estereoscopio, cámara fotográfica digital.

3.2.5. Medio de cultivo

Papa, dextrosa, agar (PDA)

3.2.6. Desinfectantes

Alcohol de 96°, hipoclorito de sodio al 10%.

3.3. Otros materiales

Cámaras húmedas (botellas de plástico), tijera podadora, navajas, agua destilada, estiletes, algodón, papel higiénico, papel, arena, regla, plumón, agua destilada estéril.

3.4. Tratamientos

Tabla 1. Distribución de tratamientos

Tratamientos	Diluciones de Kombucha	Repeticiones
1	Concentrado	3
2	1/10	3
3	1/100	3
4	1/1000	3
5	Testigo	3

El comportamiento antagónico de Kombucha, se comprobó, luego de exponer el inóculo (esporas), de cuatro hongos fitopatógenos comunes en diferentes diluciones del fermento.

Proceso que consiste en exponer el inóculo de los fitopatógenos en la dilución respectiva por cinco minutos a partir de este tiempo las esporas se siembran en medio de

cultivo PDA, luego se somete a la cámara de incubación entre 18 - 22°C; para ser observados durante 96 horas anotando los resultados de germinación de esporas y ramificación de los filamentos el mismo procedimiento se realizó tres veces para realizar la comparación más exacta.

3.5. Diseño Experimental

En el presente trabajo de investigación se utilizó la Estadística Descriptiva y Estadística experimental.

3.6. Metodología

3.6.1. Obtención de Kombucha

En 500cc de agua corriente se hierve 100 gr de té (*Tea arábica*), por cinco minutos, obteniendo el líquido de color marrón amarillento como consecuencia del desprendimiento de pigmentos y aceites esenciales de las hojas procesadas del té; este substrato se deja enfriar al ambiente durante 60 minutos inmediatamente se agrega 300g de sacarosa (azúcar comercial). La solución de té azucarado se dispone en un depósito de cristal asépticamente tratado sobre él se coloca el cuerpo fructífero constituido por la simbiosis de *Saccharomyces* sp., y la bacteria *Acetobacter* sp.

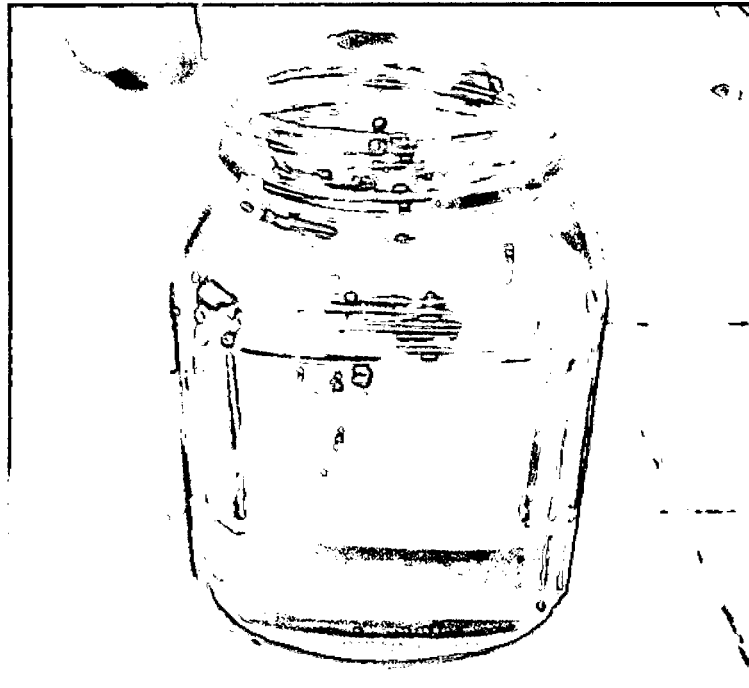
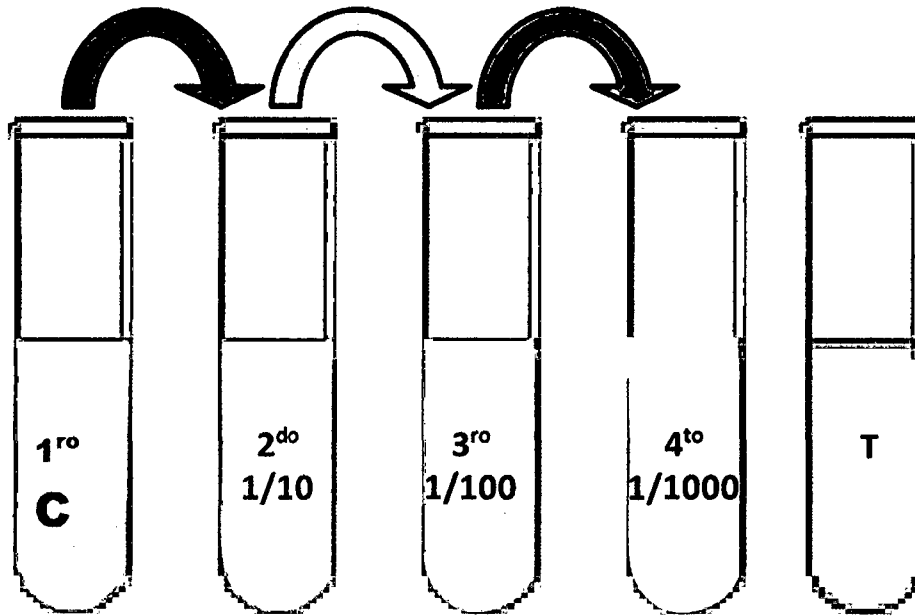


Fig. 1. Frasco aséptico, mostrando el fermentando de agua de té y el cuerpo fructífero de Kombucha.

3.6.2. Preparación de las diluciones de Kombucha

En un matraz de 250cc de capacidad se vierte el Kombucha.

Con una pipeta de 10cc de capacidad se extrae el Kombucha y se dispone en un el primer tubo de ensayo, constituyendo el concentrado de kombucha. De este se extrae 1cc, y se dispone en el segundo tubo que contiene 9cc de agua destilada estéril se homogeniza en agitador eléctrico obteniendo la dilución 1/10; de esta dilución se extrae 1cc, para ser agregado al tercer tubo, conteniendo 9cc de agua destilada, se homogeniza obteniendo la dilución 1/100; al cuarto tubo que contiene 9cc de agua destilada se realiza el mismo procedimiento obteniendo la dilución 1/1000, el tubo testigo contiene 10cc de agua destilada estéril.



3.6.3. Tratamiento del inóculo con las diluciones de Kombucha

De las placas Petri con medio de cultivo PDA, donde han prosperado las cepas fungosas de los diferentes hongos en estudio se extrajeron porciones de micelio, se sometieron a las diluciones de Kombucha.

Cada porción de micelio de hongo, tuvo un área de 1 cm², fueron sometidas a las diluciones de Kombucha (1/1, 1/10, 1/100, 1/1000 y testigo), luego se realiza la agitación mecánica por cinco minutos; con el propósito de facilitar el desprendimiento de esporas o conidios.

Ayudados con una pipeta se extrajo el sobrenadante que contiene el inóculo, la presencia de éste se verificó al microscopio, luego se procedió a realizar la siembra en placas Petry con medio de cultivo PDA; dejando una gota de suspensión de esporas en el centro de la placa posteriormente cuando el líquido desaparece en el medio se procedió la identificación anotando la dilución y el inóculo del hongo respectivo. Luego se incubó entre 18 y 22°C, evaluándose el proceso de germinación por un tiempo de 96 horas.

Tabla 2. Tratamiento con las diluciones de Kombucha, con el inóculo de los fitopatógenos comunes (*Fusarium sp.*, *Rhizoctonia solani*, *Verticillium sp.*, *Alternaria sp.*).

Hongo	Diluciones de Kombucha				
	C pH:3.33	1/10 pH:4.01	1/100 PH:6.68	1/1000 PH: 7.30	Agua PH:7.54

Fusarium sp.

Rhizoctonia solani

Verticillium sp.

Alternaria sp.

3.7. Evaluaciones

Luego de realizada la siembra del inóculo tratado con las diluciones de Kombucha en medio de cultivo PDA, se realizaron las siguientes evaluaciones.

- . Alteración morfológica de la espora inóculo de los fitopatógenos.
- . Germinación de esporas a las de 96 horas de incubación.
- . Formación de hifas, conidióforos y conidios a las 96 horas de incubación.
- . Crecimiento y desarrollo de micelio.
- Crecimiento y desarrollo de los patógenos en los tratamientos (concentrado, “1/10”, “1/100”, “1/1000”, testigo), respectivamente, a las 96 horas de incubación.

CAPÍTULO IV

RESULTADOS Y DISCUSIONES

4.1. Efecto de Kombucha en el inóculo de cuatro especies de fitopatógenos fungosos.

4.1.1. Efecto de las diluciones de Kombucha en el inóculo de *Fusarium* sp.

Tabla 3. Crecimiento y desarrollo de *Fusarium* sp., en las diluciones del Kombucha, a las 96 horas de incubación.

Repeticiones	Tratamientos (Diluciones de Kombucha)				
	C	1/10	1/100	1/1000	Testigo
R1	2.5 cm	5.6 cm	5.8 cm	5.8 cm	5.9 cm
R2	3.2 cm	5.8 cm	5.9 cm	5.9 cm	5.9 cm
R3	2.6 cm	5.6 cm	5.8 cm	5.9 cm	5.9 cm
Promedio	2.7cm	5.7 cm	5.8 cm	5.9 cm	5.9 cm

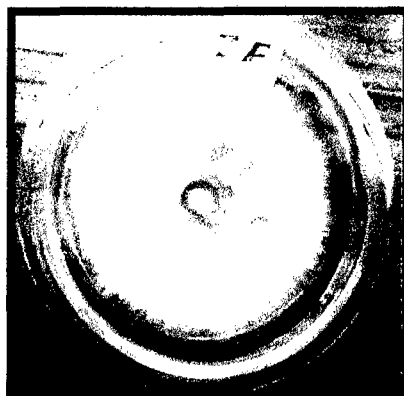


Fig. 3. Micelio de *Fusarium* sp., (Tratamiento testigo), en PDA a las 96 horas de incubación

4.1.1.2. Efecto del concentrado de Kombucha en el inóculo de *Fusarium* sp.

Micro y macro conidios de *Fusarium* sp., expuesto al concentrado de kombucha, durante cinco minutos y sembrado en PDA, incubado entre 18 a 22°C de temperatura, y observado después de 24 horas de incubación mostro crecimiento inconspicuo de micelio, este proceso se repite hasta las 96 horas de observación; en este periodo de tiempo el micelio se muestra en forma de copo algodonoso, alcanzando un diámetro promedio de 2.7 cm. Comparado con el testigo, la proliferación micelial es menos denso, este resultado se asume, a que los procesos de intoxicación en el inóculo, por parte de los microorganismos que contiene Kombucha, han tenido efecto sólo en microconidios, en donde las paredes celulares aún no muestran la concentración ideal de quitina; facilitando la permeabilidad, como lo reporta Agrios (1996).

El proceso de ingreso de los metabolitos de Kombucha, al interior de las células del inóculo de *Fusarium* sp., es por el efecto de la desactivación de las enzimas del patógeno. Los microorganismos que integran Kombucha, metabolizan, sustancias antibióticas, ácido glucurónico, alcoholes, vitaminas, aminoácidos y otros aún no determinados (Gunther, 1991). De estos los antibióticos, son los productos que han ocasionado antagonismo selectivo.

El desarrollo limitado de los filamentos del hongo, en el medio cultivo, se debió a que en el PDA, también se ha difundido los metabolitos de producto antagonico, en el momento de la siembra; debido, a que en el haza de siembra, conduce alícuotas de Kombucha.



Fig. 4. Micelio de *Fusarium* sp., en PDA a las 96 horas de incubación; producto del inóculo tratado con el concentrado de Kombucha.

4.1.1.3 Efecto de la dilución “1/10” de Kombucha en el inóculo de *Fusarium* sp.

El inóculo de *Fusarium* sp., tratado con la dilución de Kombucha “1/10”; cultivados en PDA, germinaron, crecieron y desarrollaron, alcanzando un promedio de 5.7 cm de diámetro, 2 mm menos que el testigo, además el micelio algodonoso fue menos denso; debido a que los microconidios mostraron permeabilidad a los metabolitos de los microorganismos que componen Kombucha.

Los filamentos observados al microscopio muestran desarrollo de conidióforos y por naturaleza formación de fialides y conidios.



Fig. 5. Micelio de *Fusarium* sp., en PDA a las 96 horas de incubación; producto del inóculo tratado con la dilución 1/10 de Kombucha.

4.1.1.4. Efecto de la dilución de Kombucha "1/100" en el inóculo de *Fusarium* sp.

Conidios de *Fusarium* sp., expuestos en la dilución de Kombucha "1/100", desarrolla filamentos profusamente ramificados, indicando que existe germinación de macro y micro conidios. A las 96 horas de incubación el promedio del desarrollo micelial es de 5.8 cm, visto al microscopio se aprecia la formación de conidióforos, fálides y conidios abundantes la pigmentación del micelio se muestra de color blanco oscuro debido a la formación y madurez de los conidios.

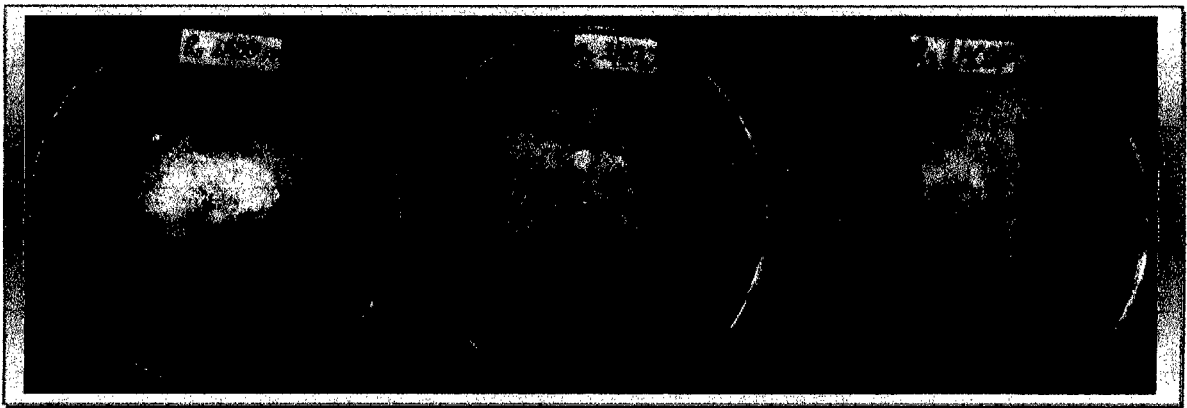


Fig. 6. Micelio de *Fusarium* sp., en PDA a las 96 horas de incubación; producto del inóculo tratado con la dilución 1/100 de Kombucha.

4.1.1.5. Efecto de Kombucha "1/1000" en el inóculo de *Fusarium* sp.

El inóculo de *Fusarium* sp., tratado con la dilución "1/1000" no tiene efecto antagónico principio que se comprueba con el crecimiento y desarrollo de micelio de la placa testigo a las 96 horas de incubación, el micelio tiene un promedio de 5.9 cm, visto al microscopio muestra formación de conidióforos, fálides y conidios, éste se mostró de blanco oscuro por la maduración de conidios.

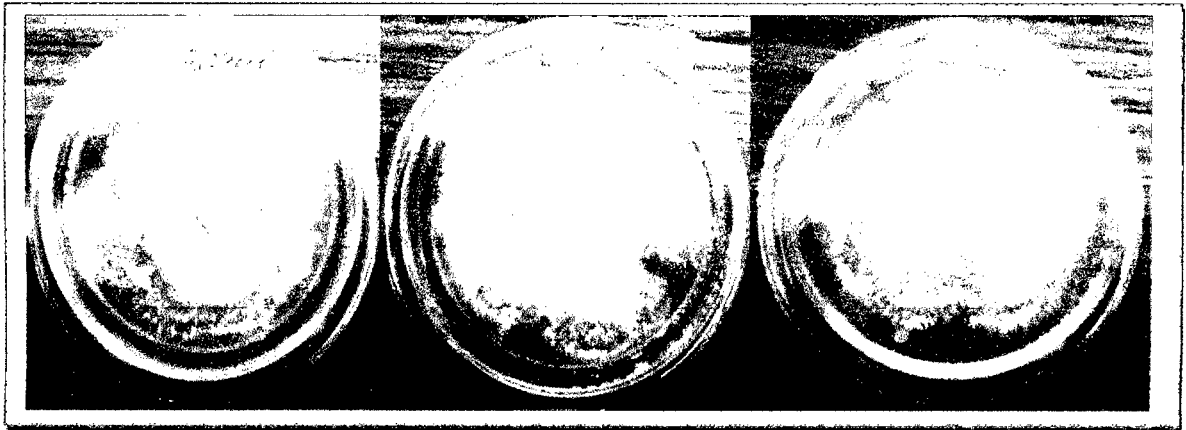


Fig.7. Micelio de *Fusarium* sp., en PDA a las 96 horas de incubación; producto del inóculo tratado con la dilución 1/1000 de Kombucha.

4.1.2. Efecto de las diluciones de Kombucha en el inóculo de *Rhizoctonia solani*.

Tabla 4. Crecimiento y desarrollo en centímetros de la *Rhizoctonia solani* en las diluciones de Kombucha a las 96 horas.

Repeticiones	Tratamientos (Diluciones de Kombucha)				
	C	1/10	1/100	1/1000	Testigo
R1	0cm	0.1cm	2.8cm	3.8cm	4cm
R2	0cm	0.2cm	2.5cm	3.5cm	4cm
R3	0cm	0.1cm	2.6cm	3.9cm	4cm
Promedio	0cm	0.3cm	2.6cm	3.7cm	4cm

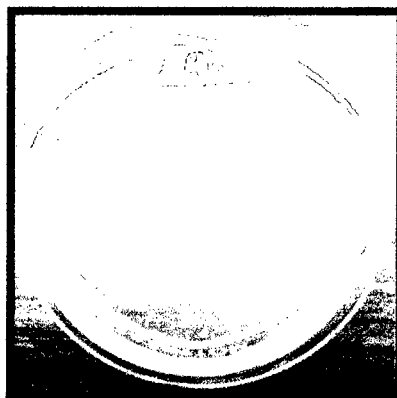


Fig. 8. Micelio de *Rhizoctonia solani* (Tratamiento testigo) en PDA a las 96 horas de incubación.

4.1.2.1. Efecto del concentrado de Kombucha en el inóculo de *Rhizoctonia solani*.

Los esclerocios de *R. solani* expuestos en el concentrado de metabolitos de los microorganismos que conforman Kombucha y sembrados en PDA, incubados entre 18° - 22 °C, no desarrolla micelio, visto al microscopio observamos la ruptura de la pared y desprendimiento de la membrana citoplasmática de la hifa del hongo, ver (fig.10), esto se debe a que las células del hongo sufren alteración enzimática, por la intoxicación del Kombucha; indicando que la cubierta de melanina y quitina de las paredes celulares del hongo, son permeables. Considerándolo como fungicida.

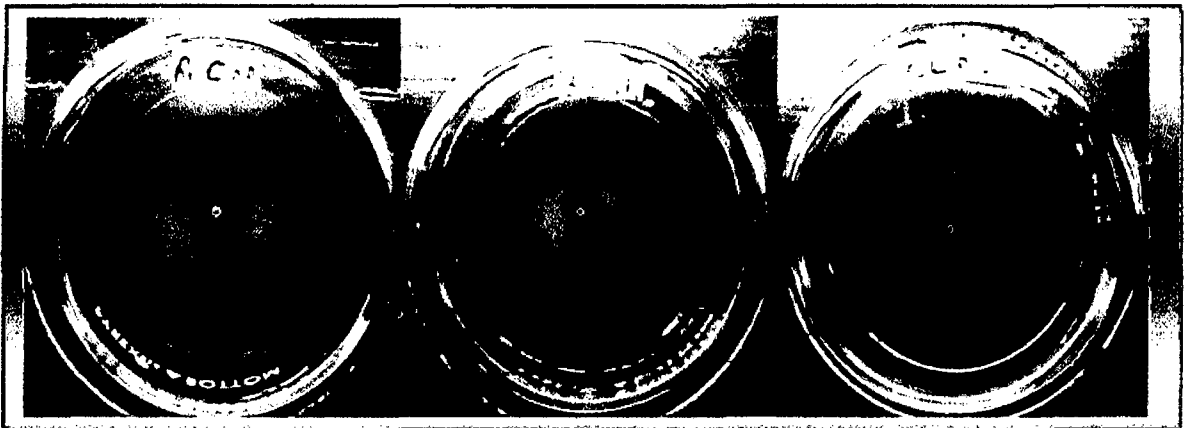


Fig. 9. Esclerocios de *Rhizoctonia solani* en PDA, no brotaron, a las 96 horas de incubación; apréciense dos halos alrededor del esclerocio, uno de color amarillo cremoso y el exterior blanco lechoso; característica de difusión de metabolitos de los microorganismos que conforman Kombucha.



Fig.10. Hifa de *Rhizoctonia solani*, mostrando desprendimiento de la membrana citoplasmática de la pared celular, por efecto antagonístico del concentrado de Kombucha.

4.1.2.2. Efecto de la dilución de Kombucha "1/10" en el inóculo de *Rhizoctonia solani*

Los esclerocios de *R. solani*, expuestos en la dilución "1/10" de Kombucha, a las 96 horas de incubación se observa que existe brotamiento, formando micelio de crecimiento irsuto, sólo sobre el esclerocio; los filamentos no desarrollan en la superficie del PDA, debido a que se ha difundido Kombucha. Basados en este resultado aseveramos que la dilución tiene comportamiento antagónico selectivo, ya que sólo algunas células del pseudo parénquima son afectadas y otras no.

Estos resultados, indican que esta dilución, puede ser utilizada, como alternativa en la disminución de incidencia y severidad de Rhizoctoniasis en diferentes cultivos.

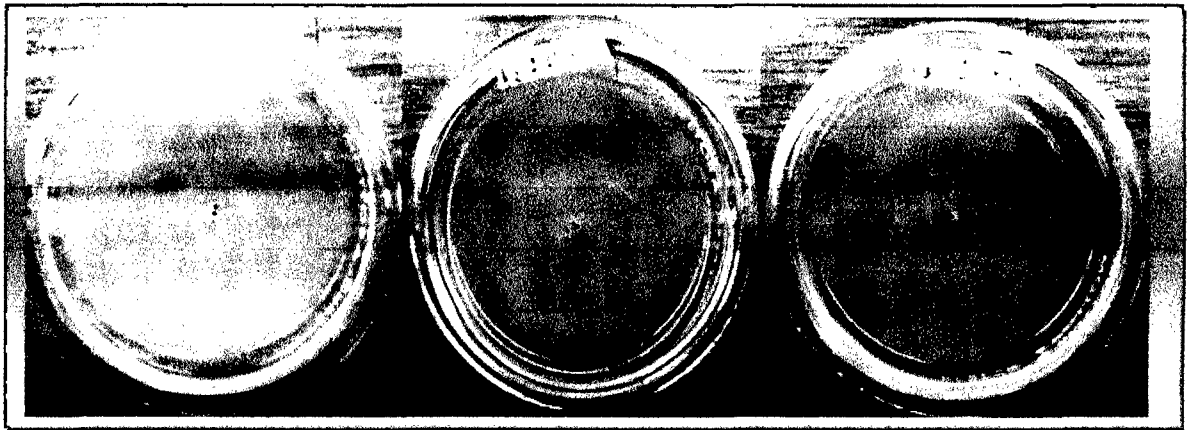


Fig.11. Micelio inconspicuo, de crecimiento irsuto en la superficie del esclerocio de *Rhizoctonia solani*, a las 96 horas de incubación (Tratamiento "1/10") de Kombucha.

4.1.2.3. Efecto de la dilución de Kombucha "1/100" en inóculo de *Rhizoctonia solani*.

La dilución de los metabolitos de Kombucha "1/100" sobre esclerocios de *R. solani*, sembrados en PDA, no ocasionó antagonismo, brotaron convenientemente, originando micelio blanco algodonoso primero y marrón claro después; a las 96 horas de incubación el crecimiento micelial fue de 2,6 cm de diámetro. Este resultado indica que Kombucha en esta dilución no muestran antagonismo. Los filamentos observados al microscopio, muestran las ramificaciones en ángulo recto.

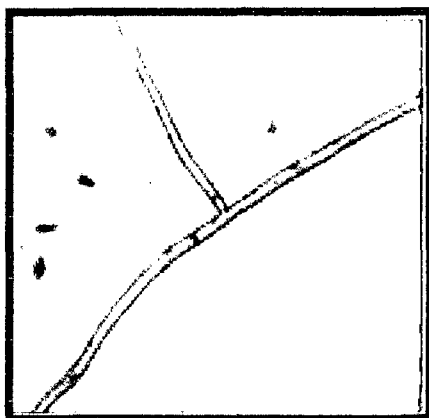


Fig. 12. Filamento de *Rhizoctonia solani* formando ángulo recto.

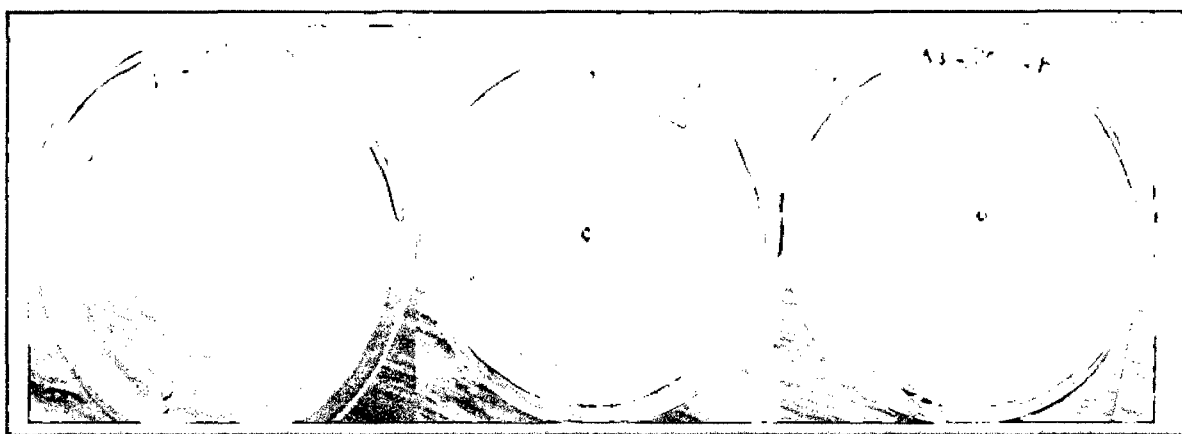


Fig. 13. Micelio de *Rhizoctonia solani* en PDA a las 96 horas de incubación, producto del esclerocio tratado con la dilución 1/100 de Kombucha.

4.1.2.4 Efecto de la dilución de Kombucha “1/1000” en el inóculo de *Rhizoctonia solani*.

La dilución “1/1000” de Kombucha no afecta a las células del pseudo parénquima de los esclerocios de *R. solani* produciendo el brotamiento normal alcanzando un promedio de 3.7cm de diámetro.

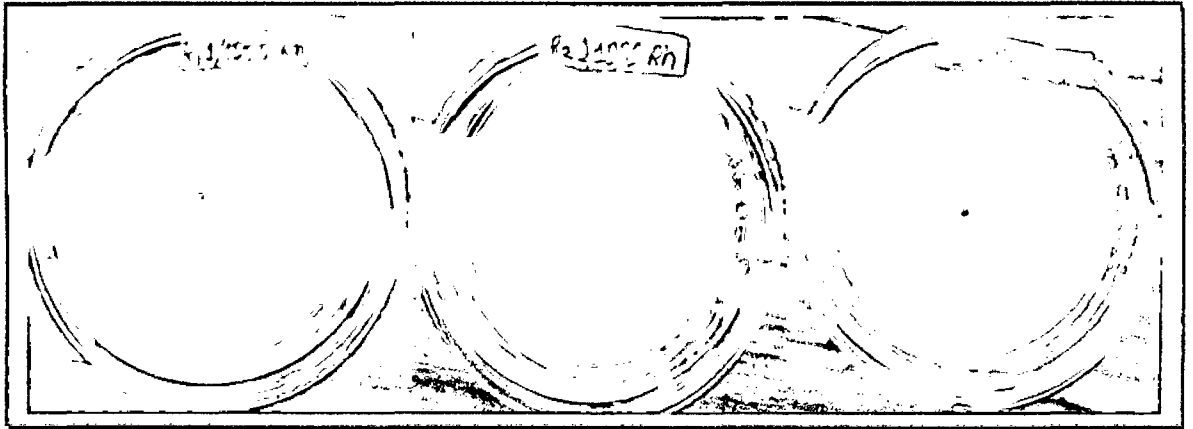


Fig.14. Micelio de *Rhizoctonia solani* en PDA, a las 96 horas de incubación producto del esclerocio tratado con la dilución 1/1000 de Kombucha.

4.1.3 Efecto de las diluciones de Kombucha en el inóculo de *Verticillium sp.*

Tabla 5. Crecimiento y Desarrollo en del *Verticillium sp.*, en las diluciones del Kombucha a las 96 horas.

Repeticiones	Tratamientos (Dilución de Kombucha)				
	C	1/10	1/100	1/1000	Testigo
R1	0.0cm	0.0cm	0.0cm	4.6cm	5.6cm
R2	0.0cm	0.0cm	0.0cm	3.8cm	5.6cm
R3	0.0cm	0.0cm	0.0cm	3.4cm	5.6cm
Promedio	0.0cm	0.0cm	0.0cm	3.9cm	5.6cm

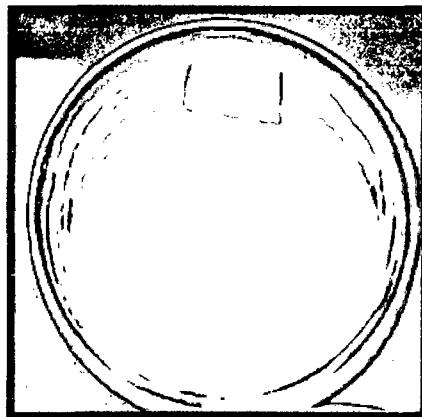


Fig. 15. Micelio de *Verticillium sp.*, (Tratamiento testigo), a 96 horas de incubación.

4.1.3.1. Efecto del concentrado de Kombucha en el inóculo de *Verticillium* sp.

Conidios de *Verticillium* sp., tratados con el concentrado de Kombucha, cultivados en PDA, incubados entre 18 a 22°C, no germinaron por tanto no hubo desarrollo de micelio del hongo; debido que los metabolitos de los microorganismos que conforman Kombucha desactivan las enzimas de las células del inóculo, visto al microscopio se observa ruptura de pared, membrana y emanación, desprendimiento de la membrana citoplasmática de la pared de los filamentos del hongo, (ver fig. 17), Kombucha penetran fácilmente las paredes celulares de los conidios hasta inactivarlos completamente.

Por las características antes enunciadas; el concentrado de Kombucha se considera como fungicida.



Fig. 16. PDA, libre de micelio de *Verticillium* sp., después de 96 horas de incubación, de haber sembrado esporas expuestas a Kombucha concentrado. Apreciar en cada caja Petry partículas del cuerpo fructífero de kombucha.

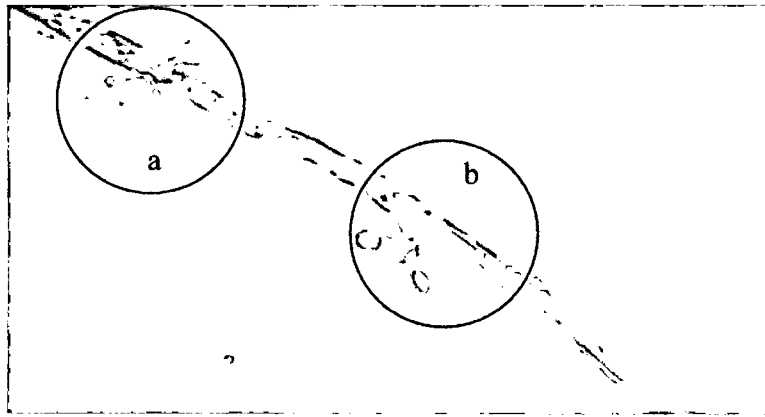


Fig.17. Filamento de *Verticillium* sp., mostrando ruptura de pared, membrana y emanación Citoplasmática (a); desprendimiento de la membrana citoplasmática de la pared celular (b), por efecto Antagónico del concentrado de Kombucha.

4.1.3.2. Efecto de la dilución de Kombucha “1/10”, “1/100” en el inóculo de *Verticillium* sp.

Los inóculos de *Verticillium* sp., tratados con la diluciones de Kombucha “1/10” y “1/100” y sembrados en medio PDA, no mostraron desarrollo de micelio; inhibió la germinación total de esporas, por efecto intoxicación. Ambas diluciones tienen comportamiento antagónico para este patógeno, considerándolo fungicida.

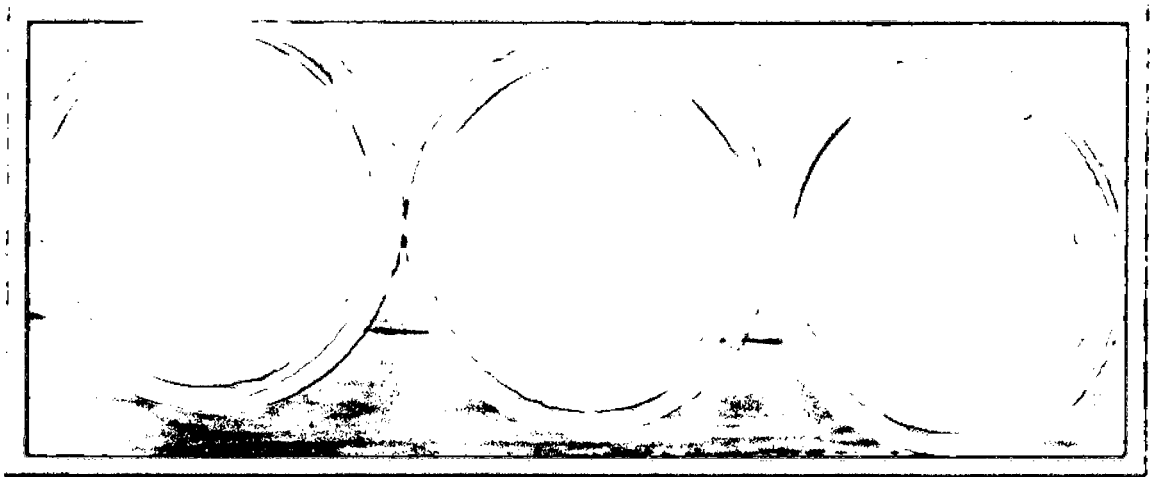


Fig. 18. PDA, libre de micelio de *Verticillium* sp., después de 96 horas de incubación, de haber sembrado esporas expuestos en la dilución 1/10 de Kombucha

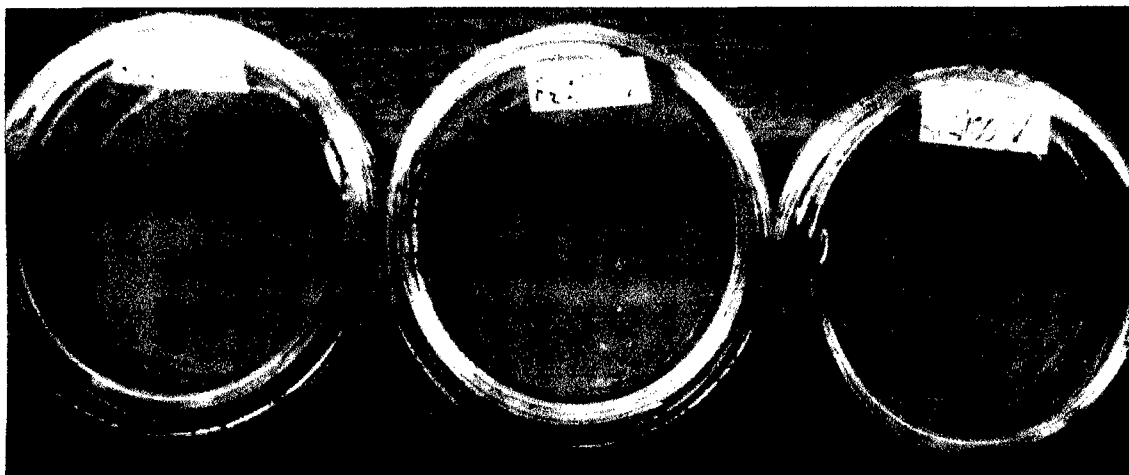


Fig. 19. PDA, libre de micelio de *Verticillium* sp., después de 96 horas de incubación, de haber sembrado esporas expuestas en la dilución 1/100 de Kombucha.

4.1.3.5 Efecto de la dilución de Kombucha “1/1000” en el inóculo de *Verticillium* sp.

Inóculo de *Verticillium* sp., tratados en dilución de Kombucha “1/1000” y sembrados en medio de cultivo PDA, incubados entre 18 a 22 °C, no germinaron; indicando que a esta concentración los metabolitos de los componentes de Kombucha se encuentran extremadamente diluidos, que por más que hayan penetrado, no ejercen acción de intoxicación en las células de este patógeno.

Las hifas, observadas al microscopio, muestran normal ramificación, formación de conidióforos, fálides y conidios. El promedio del desarrollo del micelio fue de 3.9 cm de diámetro.

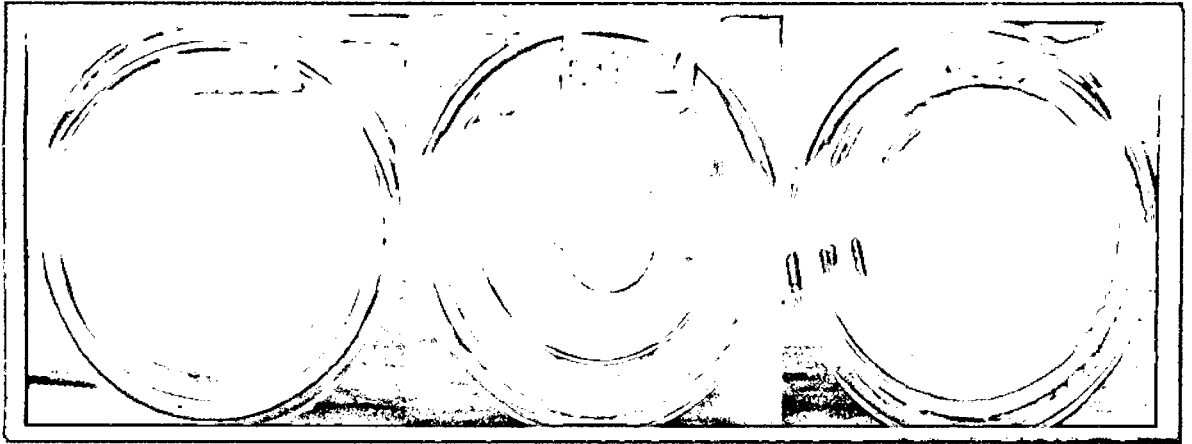


Fig. 20. Micelio de *Verticillium* sp., en PDA, a las 96 horas de incubación, tratado con la dilución 1/1000 de Kombucha se observa desarrollo y crecimiento del fitopatógenos.

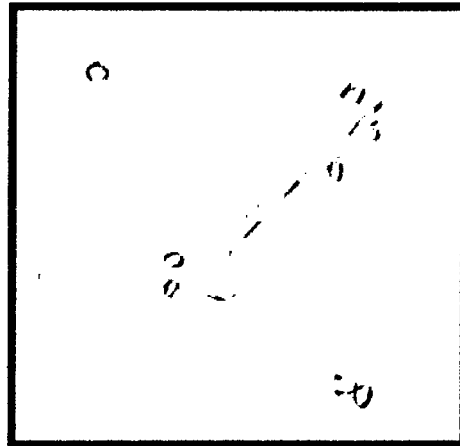


Fig.21. Hifa, conidióforo, ramificación verticilada y conidios de *Verticillium* sp., producto de la formación de micelio, después que el inóculo se trató con la dilución de Kombucha 1/1000.

4.1.4. Efecto de las diluciones de Kombucha en el inóculo de *Alternaria* sp.

Tabla 6. Crecimiento y desarrollo de *Alternaria* sp., en las diluciones del Kombucha a las 96 horas.

Repeticiones	Tratamientos (Dilución de Kombucha)				
	C	1/10	1/100	1/1000	Testigo
R1	0.0cm	0.0cm	0.0cm	1.5cm	2.3cm
R2	0.0cm	0.0cm	0.0cm	1.8cm	2.3cm
R3	0.0cm	0.0cm	0.0cm	1.5cm	2.3cm
Promedio	0.0cm	0.0cm	0.0cm	1.6cm	2.3cm

4.1.4.1. Efecto del concentrado de Kombucha en el inóculo de *Alternaria* sp.

Conidios muriformes de *Alternaria* sp., tratados con el concentrado de Kombucha y sembrados en PDA, e incubados entre 18 – 22 °C, no germinaron; debido a que los componentes de Kombucha desactivan las enzimas del patógeno, resultado que nos condujo a determinar que los metabolitos, de los diferentes microorganismos que conforman Kombucha, atraviesan sin dificultad las paredes celulares del inóculo de este hongo, llegando a desactivar las enzimas del patógeno, ocasionando deshidratación y lisis celular ocasionando la muerte. Por estas características, Kombucha, tiene características de ser fungicida.



Fig. 22. PDA, sembrados con esporas de *Alternaria* sp., tratados con Kombucha concentrado; después de 96 horas de incubación, sin manifestar micelio del hongo.

4.1.4.2. Efecto de la dilución de Kombucha "1/10", "1/100" en el inóculo de *Alternaria* sp.

El inóculo de *Alternaria* sp., tratadas con las diluciones de Kombucha "1/10" y "1/100" y sembrados en medio PDA, después de 96 horas de incubación entre 18 – 22° C, no mostraron germinación de esporas; característica que se evidencia en las figuras 23 y 24. Ambas diluciones tienen comportamiento antagónico; principio indicador para ser utilizado como fungicida

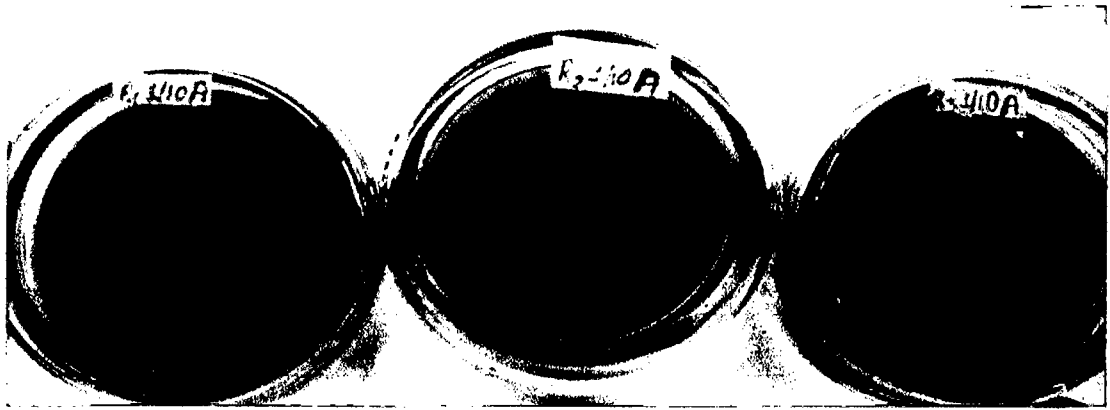


Fig. 23. Inóculo de *Alternaria* sp., después de 96 horas de incubación, entre 18 – 22 °C, sin mostrar formación de micelio en PDA, debido a que la solución 1/10 de Kombucha a intoxicado al inóculo del patógeno.

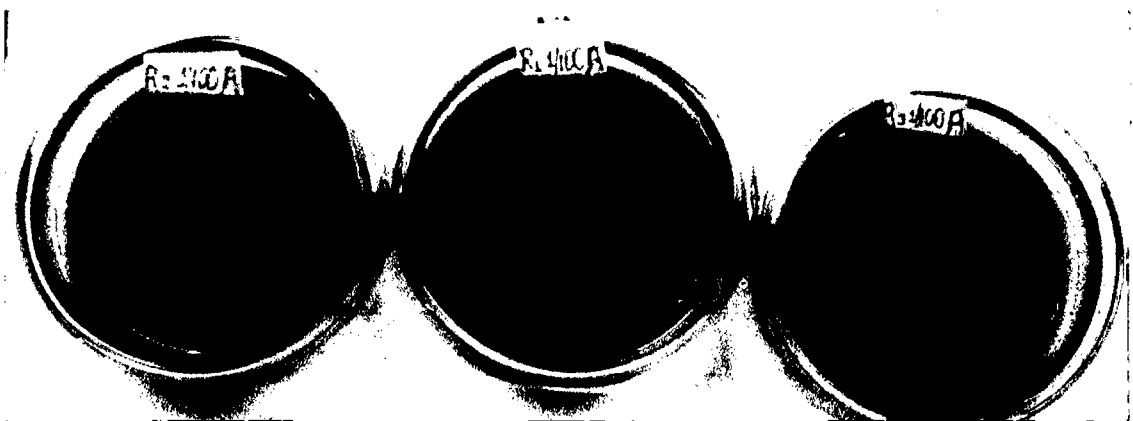


Fig. 24. Inóculo de *Alternaria* sp., después de 96 horas de incubación, entre 18 – 22 °C, sin mostrar formación de micelio en PDA, debido a que la solución 1/100 de Kombucha a intoxicado al inóculo del patógeno.

4.1.4.3. Efecto de la dilución de Kombucha "1/1000" en el inóculo de *Alternaria* sp.

Células de los conidios de *Alternaria* sp., expuestos a la dilución "1/1000" de Kombucha; sembrados en PDA, incubados entre 18 – 22 °C, germinan en forma limitada, dando origen a la formación de micelio, aunque de crecimiento y desarrollo limitado en comparación con el tratamiento testigo (T). Esta característica indica que tiene comportamiento antagónico parcial, debido que a partir de 48 horas de incubación, se manifiesta la formación de micelio. El crecimiento y desarrollo de éste es limitado, alcanzando 1.6 cm de diámetro en 96 horas y coloreado de marrón claro, a oscuro debido a la concentración de melanina tanto en hifas como conidios.

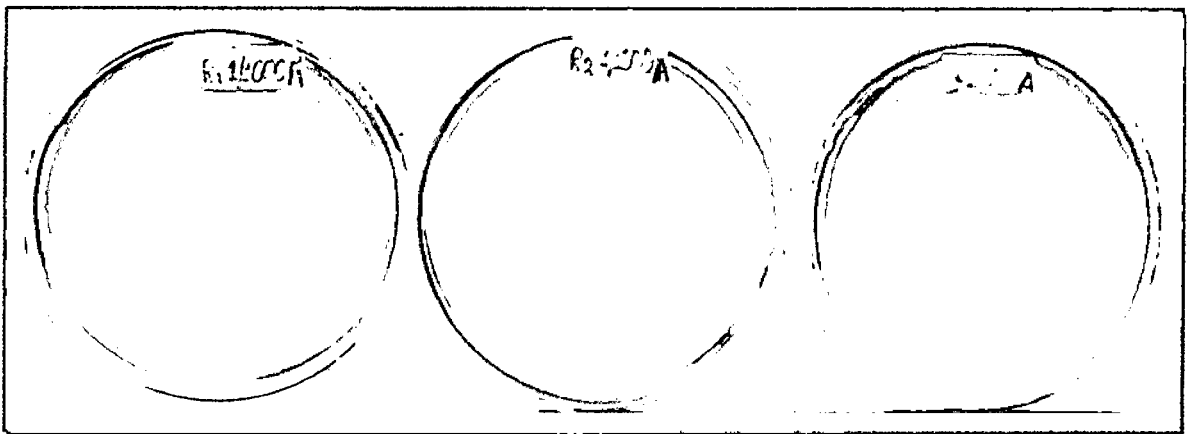


Fig. 25. Inóculo de *Alternaria* sp., sembrado en PDA, después de estar expuesto a la dilución 1/1000 de Kombucha. Apreciar formación de micelio marrón oscuro característica inconfundible de este patógeno.

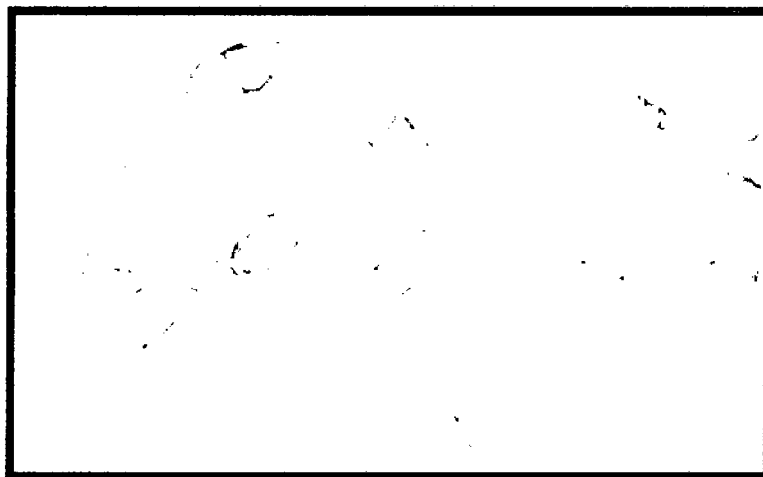


Fig. 26. Conidios de *Alternaria* sp., expuestos al efecto de la dilución 1/1000 de Kombucha, mostrando tubos germinativos.

4.2. Tabla resumen, e ilustración del efecto de Kombucha, en el inóculo de cuatro especies de fitopatógenos fungosos.

En la Tabla 5 se resume, el efecto antagónico y no antagónico de los metabolitos alcoholes, ácido glucorónico, ácido acético, vitaminas, aminoácidos y otros, que son producidos por los microorganismos *Saccharomyces* sp., *Acetobacter* sp., y otros que conforman Kombucha.

Tabla N° 7. Crecimiento y desarrollo de los patógenos (*Fusarium* sp., *Rhizoctonia solani*, *Verticillum* sp.), en las respectivas diluciones de Kombucha indicando los promedios.

Diluciones de Kombucha	Inóculo de los fitopatógenos			
	<i>Fusarium</i> sp.	<i>Rhizoctonia solani</i>	<i>Verticillum</i> sp.	<i>Alternaria</i> sp.
Concentrado	2.4cm	0.0cm	0.0cm	0.0cm
1/10	5.7cm	0.3cm	0.0cm	0.0cm
1/100	5.8cm	2.6cm	0,0cm	0.0cm
1/1000	5.9cm	3.7cm	3.9cm	1.6cm
TESTIGO	5.9cm	4.0cm	5.6cm	2.3cm

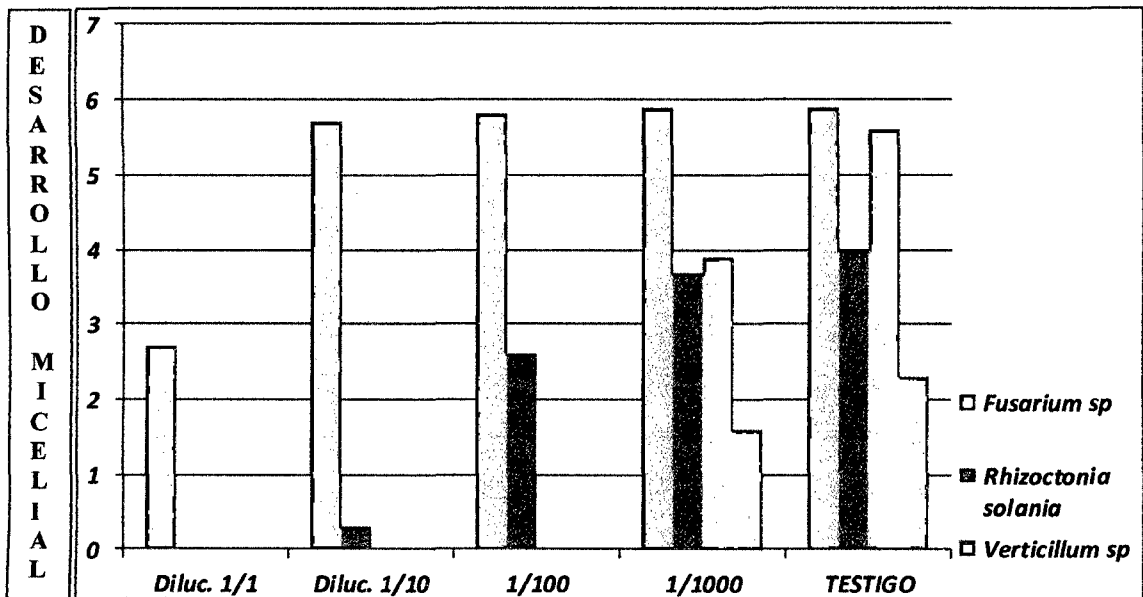


Fig. 27. Diagrama comparativo del desarrollo de los fitopatógenos, con las diluciones de Kombucha a las 96 horas de incubación.

4.3. Prueba de Duncan, efecto de Kombucha a inóculos de cuatro especies de fitopatógenos fungosos.

Patógenos	Tratamientos	Rendimiento
1 <i>Fusarium sp.</i>	Concentrado	2.4
2 <i>Rhizoctonia solani</i>	Concentrado	0.0
3 <i>Verticillium sp.</i>	Concentrado	0.0
4 <i>Alternaria sp.</i>	Concentrado	0.0
5 <i>Fusarium sp.</i>	1/10	5.7
6 <i>Rhizoctonia solani</i>	1/10	0.3
7 <i>Verticillium sp.</i>	1/10	0.0
8 <i>Alternaria sp.</i>	1/10	0.0
9 <i>Fusarium sp.</i>	1/100	5.8
10 <i>Rhizoctonia solani</i>	1/100	2.6
11 <i>Verticillium sp.</i>	1/100	0.0
12 <i>Alternaria sp.</i>	1/100	0.0
13 <i>Fusarium sp.</i>	1/1000	5.9
14 <i>Rhizoctonia solani</i>	1/1000	3.7
15 <i>Verticillium sp.</i>	1/1000	3.9
16 <i>Alternaria sp.</i>	1/1000	1.6
17 <i>Fusarium sp.</i>	Testigo	5.9
18 <i>Rhizoctonia solani</i>	Testigo	4.0
19 <i>Verticillium sp.</i>	Testigo	5.6
20 <i>Alternaria sp.</i>	Testigo	2.3

4.3.1. Prueba del rango múltiple de Duncan para rendimiento

Test del control del índice de error, comparaciones tipo I

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	1.335

Número de medias	2	3	4	5
Rango crítico	1.780	1.863	1.914	1.947

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Agrupamiento Duncan	Media	N	tratamientos
A	4.4500	4	t
A			
B A	3.7750	4	1/1000
B			
B C	2.1000	4	1/100
C			
C	1.5000	4	1/10
C			
C	0.6000	4	concentrado

CAPÍTULO V

CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

1. El concentrado de Kombucha, tiene comportamiento antagónico al inóculo de *Rhizoctonia solani*, *Verticillium* sp., y *Alternaria* sp.
2. Las diluciones 1/10, 1/100, son antagónicas al inóculo de *Verticillium* sp., y *Alternaria* sp.
3. En inóculo de *Fusarium* sp., el concentrado y la dilución 1/10 de Kombucha, permiten observar la germinación de esporas con la consecuente formación de micelio aunque de crecimiento y desarrollo limitado.
4. Recomendamos realizar investigaciones, de tratamiento de fitopatógenos fungosos en campo

CAPÍTULO VI

LITERATURA CITADA

- Ames, T. 1974. Fitopatología General. 1ed. Lima-Perú. Departamento de Sanidad Vegetal – Sección Fitopatología. 150 p.
- Ames. 1974 Fitopatología Agrícola. 2 ed. Madrid – España. Grupo Mundi – Prensa. 755 pág.
- Agrios, G. 1996. Fitopatología. Guzmán, M. Grupo Noriega Editores. 2 ed. México. D.F. Editorial Limusa. S.A. 838 p.
- A. Garriz- J. A. Chamizo. (1994) Química. Editorial. Addison-Wesley. 2º edición. Argentina. 1994. paginas.
- Arévalo Q. J., y C. Arévalo V.2009. Inhibición del micelio de *Moniliophthora roreri* por efecto de cinco extractos vegetales obtenidos con cuatro extractantes químicos. Instituto de Cultivos Tropical, San Martín. Resumen Científico del XLX congreso peruano de fitopatología.
- Barbancik, G, F. 1954. Libro “El Hongo de Té”.1era edición Rusia. 186-243pg.
- Brock, Smith, Madigan Microbiología (1987) 4ª edición. Copyright. España.pg
- Castañeda, E. C. y M. Roncal, 2011. Lechuga (*Lactuca sativa* L.) semihidroponía y su susceptibilidad a microorganismos fungosos. Tesis Ingeniera Agrónoma. Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad
- Brown, Lemay, Bursten. (2004). Química la ciencia central. 9ª edición. Perarson, Mexico.121-139.
- XIX Congreso Peruano de Fitopatología. Resúmenes Científicos Cajamarca 2006.31p.
- Constantino Jhon Alexopoulos. (1966). Introducción a la Micología 3ºeditorial Editorial Copyright. New York. 108-257pag.

- Curtiz Barnes, Schnek, Flores. (2005). Biología. 6ª edición. Panamericana. España. 736,796,8910.
- Chuquimango Álvarez, Delicia Dolores y M. Roncal, 2012. Patogénesis de fitopatógenos fungosos en el cultivo de chalarina (*Casimiroa edulis* Llave). Tesis Ingeniera Agrónoma. Fitopatología. Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cajamarca.
- Donal Voet, Judith G. Voet. 2006. Bioquímica. 3ª edic. Buenos Aires-Argentina. Panamericana. 604-625 pág.
- Gastón, A.1999. Patología de cultivos Epidemiología y Control Holístico. Universidad Católica de Chile.Chile.346.
- Gerard, Tortora, 1993. Introducción a la Microbiología, 3ªed. España, Editorial Acribia. 765p.
- Gunther, W. Frank. 1991. Kombucha, “Bebida Saludable y Remedio Natural del Lejano Oriente” 1ª edición. Monthly magazine. Alemania pp.18-23.
- H. Girard- R. Rougieux. (1964) “Manual de técnicas bacteriológica. 1ª ed. Acribia, España. 189-208.
- Hooker, W. J. 1980. Compendio de enfermedades de la papa. Versión española por Teresa Ames de Icochea. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima – Perú. 166 pág.
- INTA-FAO.1979. Compendio del curso de perfeccionamiento en Control Integrado de Plagas (T.I).INTA. Pergamino. (Bs.As.) Rep. Arg. 18pg.
- John Webster. 1970. Introduction to fungi. Second Edition New York. USA. 155p
- Madigan, Martinko, Praker. (2006). Biología de los Microorganismos. 10ª edición. Pearson. España. 687p.
- Mar Oxford. (1998) Diccionario de Biología, 2ªedición. Pearson. España. 657-663.
- Muñoz, F. 2002 Plantas Medicinales y Aromáticas estudio cultivo y procesado, Primera Edición, Editorial Mundi prensa, España. 365 p.
- Neira, M. Makdonado, E. y E. Rodríguez; 2009. Antagonismo de cepas bacterianas frente a (*Colletotrichum gloesporioides* Penz.), 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.

- Neiser E. Hernández Nimboma. 2012. Tesis en Agronomía *Crucíferas* Antagónicas A *Sclerotium cepivorum* Berck. En el Cultivo de Ajo (*Allium sativum* L.). UNC Cajamarca Perú.
- Pitt J. (2001) Toxigenic *Penicillium* Species. In: Food Microbiology Fundamentals and Frontiersn 2° ed. USA. 467-480.
- Rene Vigiani, A. 1990. Control integrado de plagas. 2ª edición. edit. Editorial Hemisferio Perú.124p.
- Romero, C. S. 1988. Hongos Fitopatógenos. 1ra. Ed. Universidad Autónoma de Chapingo. México. 356 pág.
- Roncal, 1995. Mohos post cosecha en frutos suculentos. Facultad de Ciencias Agrícolas y Forestales. Cajamarca Perú. Oficina General de Investigación de la UNC.
- Roncal, M. 2004. Principios de Fitopatología Andina. 1 ed. Cajamarca – Perú. Oficina General de Investigación de la UNC. 420 p.
- Rotem, J. 1994. The genus *Alternaria*, first edition. Printed in the United States of American on acid-free paper.326 p.
- Soberanis, W. Gómez, H., Marín, J. E., Quintana, A., Paz, J. Rodríguez, C., Tirado, J., García, L. 2009. Control de enfermedades del cacao con hongos antagonistas. Servicio Nacional de Sanidad Agraria. La Molina Lima, resumen científico del XLX congreso peruano de fitopatología.
- Torres, H. 2002. Manual de Enfermedades más importantes de la Papa en el Perú. Centro Internacional de la Papa (CIP). Lima – Perú. 60 pág.
- Valenzuela López, E. 1987. Microorganismos entomológicos, en su aprovechamiento en el control de insectos plagas. 1° edic. Universidad Autónoma de Chapingo. 120p.
- Zirena, J. y E. de la Peña. 1977. Manejo de suelos. Departamento de ciencias Agropecuarias. UNC– Perú. 236 p.

GLOSARIO

Acérvalo: Estructura fúngal semejante a un platito, tapizado de pequeños conidióforos y sus respectivos conidios. Resalta a la vista como puntitos negros dentro de las lesiones hundidas o antracnosis, localizados en los tallos, tallitos y frutos.

Antagonismo: Contrariedad rivalidad, oposición sustancial o habitual, especialmente en doctrinas y opiniones.

Antibiótico: Es una sustancia química producida por un ser vivo o derivado sintético, que mata o impide el crecimiento de ciertas clases de microorganismos sensibles, generalmente bacterias.

Artrospora: Espora producto de la fragmentación de una hifa.

Basidio. Estructura en forma de mazo que contiene a las basidiosporas.

Basidiospora: Espora producida de manera sexual y localizada sobre un basidio.

Cepa: Progenie de un solo aislamiento en un cultivo puro aislado; grupo de aislados similares una raza.

Cariogamia: Fusión de dos núcleos de diferente polaridad.

Catenulado: Distribución de conidios, esporas o esporangios, formando cadenas.

Cenocítico: Hifa sin divisiones transversales.

Clamidosporas: Esporas de origen asexual, producidas por algunos hongos y provistas de gruesas paredes celulares que le permiten resistir condiciones ambientales adversas.

Conidio: Estructura de reproducción de origen sexual o asexual producida por los hongos.

Conidióforo: Hifa especializada sobre la cual se forman uno o más conidios.

Cultivo Hidropónico: Consiste en disponer las plantas inoculadas protegidas con papel filtro para proporcionar la humedad y facilitar la infección del patógeno.

Espora: Célula asexual o sexual. Elemento reproductor del comportamiento semejante al de una semilla, pero no posee embrión.

Fiálides: Estructura fungal pequeña en forma de botella, producto de la ramificación de algunos conidióforos.

Fitoenfermedad: Cualquier mal funcionamiento de las células que repercute en los tejidos y órganos de una planta.

Fosforilación oxidativa: es un proceso metabólico que utiliza energía liberada por la oxidación de nutrientes para producir adenosina trifosfato (ATP).

Gutación: Exudación de agua a lo largo del borde de las hojas.

Gliceraldehído: es una aldotriosa cuya fórmula es $C_3H_6O_3$. Posee dos isómeros ópticos, ya que tiene un carbono asimétrico.

Haustorios: Proyección de hifas de un hongo que actúa como órgano de absorción en las células del hospedero.

Hifa: Unidad estructural del hongo.

Inoculación: Mecanismo por el que se pone en contacto un patógeno con una planta hospedante o con un órgano de ésta.

Kombucha: Conocida también como hongo manchuriano, hongo de té u hongo chino) es una bebida fermentada de ligero sabor ácido.

Micelio: Conjunto de hifas que constituyen el cuerpo o soma del hongo, a la vista aparecen como masas algodonosas.

Patógeno: Ser vivo, que vive a expensas de otro ocasionando daño.

Patogenicidad: Capacidad que tiene un patógeno para producir enfermedad

Sésil: Estructura somática del hongo sin pedicelo.

Septo: Pared transversal de las hifas o esporas.

Signo: Presencia visible del patógeno en la planta afectada.

Síntoma: Manifestación de la enfermedad, confrontándose expresiones visibles a los sentidos.

Toxina: Compuesto que produce los microorganismos y que es toxico para las plantas y animales.

Tubo germinativo: Crecimiento inicial del micelio debido a la germinación de un hongo.

ANEXOS

Procedimiento de la Prueba de Duncan en el efecto de Kombucha, al inóculo de cuatro especies de fitopatógenos fungosos.

Sistema SAS 3

	Patógenos	Tratamientos	Rendimiento
1	<i>Fusarium</i> sp	concentrado	2.4
2	<i>Rhizoctonia solani</i>	concentrado	0.0
3	<i>Verticillum</i> sp	concentrado	0.0
4	<i>Alternaria</i> sp	concentrado	0.0
5	<i>Fusarium</i> sp	1/10	5.7
6	<i>Rhizoctonia solani</i>	1/10	0.3
7	<i>Verticillum</i> sp	1/10	0.0
8	<i>Alternaria</i> sp	1/10	0.0
9	<i>Fusarium</i> sp	1/100	5.8
10	<i>Rhizoctonia solani</i>	1/100	2.6
11	<i>Verticillum</i> sp	1/100	0.0
12	<i>Alternaria</i> sp	1/100	0.0
13	<i>Fusarium</i> sp	1/1000	5.9
14	<i>Rhizoctonia solani</i>	1/1000	3.7
15	<i>Verticillum</i> sp	1/1000	3.9
16	<i>Alternaria</i> sp	1/1000	1.6
17	<i>Fusarium</i> sp	Testigo	5.9
18	<i>Rhizoctonia solani</i>	Testigo	4.0
19	<i>Verticillum</i> sp	Testigo	5.6
20	<i>Alternaria</i> sp	Testigo	2.3

Sistema SAS 4

Procedimiento GLM

Información del nivel de clase

	Clase	Niveles	Valores
Patógenos	4	<i>Fusarium</i> sp, <i>Rhizoctonia solani</i> , <i>Verticillum</i> sp, <i>Alternaria</i> sp	
Tratamientos	5	1/10, 1/100, 1/1000, concentrado, testigo	
		Número de observaciones	20

Sistema SAS 5

Procedimiento GLM

Variable dependiente: rendimiento

Fuente	DF	Suma de cuadrados	Cuadrado de la media	F-Valor	Pr > F
Modelo	7	92.9455000	13.2779286	9.95	0.0004
Error	12	16.0200000	1.3350000		
Total correcto	19	108.9655000			

R-cuadrado	Coef Var	Raiz MSE	rendimiento	Media
0.852981	46.49586	1.155422		2.485000

Fuente	DF	Cuadrado de Tipo I SS	la media	F-Valor	Pr > F
Patógenos	3	52.15750000	17.38583333	13.02	0.0004
Tratamientos	4	40.78800000	10.19700000	7.64	0.0027

Fuente	DF	Cuadrado de Tipo III SS	la media	F-Valor	Pr > F
Patógenos	3	52.15750000	17.38583333	13.02	0.0004
Tratamientos	4	40.78800000	10.19700000	7.64	0.0027

Sistema SAS 6

Procedimiento GLM

Test del control del índice de error, comparaciones tipo I

Alfa	0.05
Error de grados de libertad	12
Error de cuadrado medio	1.335

Número de medias	2	3	4	5
Rango crítico	1.780	1.863	1.914	1.947

Medias con la misma letra no son significativamente diferentes.

Agrupamiento	Duncan	Media	N	tratamientos
A	4.4500	4	t	
A				
B A	3.7750	4	1/1000	
B				
B C	2.1000	4	1/100	
C				
C	1.5000	4	1/10	
C				
C	0.6000	4	concentrado	