

	GESTIÓN DE SERVICIOS ACADÉMICOS Y BIBLIOTECARIOS		CÓDIGO	FO-GS-15	
			VERSIÓN	02	
	ESQUEMA HOJA DE RESUMEN			FECHA	03/04/2017
				PÁGINA	1 de 1
ELABORÓ		REVISÓ		APROBÓ	
Jefe División de Biblioteca		Equipo Operativo de Calidad		Líder de Calidad	

RESUMEN TRABAJO DE GRADO

AUTOR(ES): NOMBRES Y APELLIDOS COMPLETOS

NOMBRE(S): CRISTIAN CAMILO **APELLIDOS:** MIRANDA BELTRAN

FACULTAD: CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA AGRONÓMICA

DIRECTOR:

NOMBRES(S): MARLON HANS **APELLIDOS:** RODRIGUEZ AGUILAR

NOMBRES(S): NANCY EUNICE **APELLIDOS:** NIÑO CASTAÑEDA

TITULO DEL TRABAJO (TESIS): EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA IN VITRO DEL EXTRACTO VEGETAL DE SALVIA AMARGA (*Teucrium fruticans* L.), SOBRE EL HONGO *Colletotrichum lindemuthianum*, AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN FRÍJOL (*Phaseolus vulgaris* L.).

RESUMEN

La Antracnosis del fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.), causada por el hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Mag.) Scrib., es una de las principales limitantes en la producción de este cultivo, tanto en campo como en postcosecha; ya que puede generar pérdidas en rendimientos de hasta el 95%. El objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto de Salvia Amarga (*Teucrium fruticans* L.), sobre el desarrollo del hongo *C. lindemuthianum*. Para la obtención del extracto vegetal, se evaluaron tres solventes (alcohol 96°, agua y trementina). Se determinó la dosis mínima inhibitoria y se evaluó el efecto de tres concentraciones (3%, 5% y 8%), sobre el crecimiento, germinación, recolonización y esporulación del hongo *C. lindemuthianum*, en comparación con un control químico (Myclobutanil), empleado en la región. Se obtuvo que el solvente etanólico permitió la extracción de los MS que tienen un efecto inhibitorio sobre *C. lindemuthianum*, con una concentración mínima del 8% se presentó un porcentaje de inhibición micelial del 98% y de esporas del 99.9%. El extracto de Salvia Amarga supero el efecto antifúngico *in vitro* de la dosis comercial de Myclobutanil, demostrando que puede ser una alternativa viable para el control de Antracnosis en frijol.

PALABRAS CLAVE: Antracnosis, compuesto vegetal, solvente, dosis mínima inhibitoria, fríjol.

CARACTERÍSTICAS:

PÁGINAS: 102 **PLANOS:** ___ **ILUSTRACIONES:** ___ **CD ROOM:** ___

Copia No Controlada

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DEL EXTRACTO
VEGETAL DE SALVIA AMARGA (*Teucrium fruticans* L.), SOBRE EL HONGO
Colletotrichum lindemuthianum, AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN FRÍJOL
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

CRISTIAN CAMILO MIRANDA BELTRAN

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA**

2023

**EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DEL EXTRACTO
VEGETAL DE SALVIA AMARGA (*Teucrium fruticans* L.), SOBRE EL HONGO
Colletotrichum lindemuthianum, AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN FRÍJOL
(*Phaseolus vulgaris* L.)**

CRISTIAN CAMILO MIRANDA BELTRAN

TRABAJO DE INVESTIGACIÓN

Presentado como requisito parcial para optar al título de Ingeniero Agrónomo

Director (a):

Ingeniero Agrónomo, M.Sc. Marlon Hans Rodríguez Aguilar

Codirector (a):

Bióloga, Ph.D. Nancy Eunice Niño Castañeda

**UNIVERSIDAD FRANCISCO DE PAULA SANTANDER
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS Y DEL AMBIENTE
PROGRAMA DE INGENIERÍA AGRONÓMICA
SAN JOSÉ DE CÚCUTA**

2023



ACTA DE SUSTENTACIÓN TRABAJO DE GRADO

FECHA: jueves 08 de junio del 2023

HORA: 10:00 a.m.

LUGAR: Salón SC 301 UFPS

PLAN DE ESTUDIOS: INGENIERÍA AGRONÓMICA

TÍTULO DEL TRABAJO DE GRADO: "EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DEL EXTRACTO VEGETAL DE SALVIA AMARGA (*Teucrium fruticans L.*), SOBRE EL HONGO *Colletotrichum lindemuthianum*, AGENTE CASUAL DE ANTRACNOSIS EN FRÍJOL (*Phaseolus vulgaris L.*)".

MODALIDAD: INVESTIGACIÓN

JURADOS: ALINA KATIL SIGARROA RIECHE
ANA MARÍA ARISMENDY PABÓN
JESÚS ARTURO RAMÍREZ SULVARÁN

DIRECTOR: MARLÓN HANS RODRÍGUEZ AGUILAR
CO-DIRECTOR(A): NANCY EUNICE NIÑO CASTAÑEDA

NOMBRE DEL ESTUDIANTE:

CRISTIAN CAMILO MIRANDA BELTRÁN **CÓDIGO:** 1620721

CALIFICACIÓN: 4,3 (Cuatro coma tres)

OBSERVACIONES: APROBADO

FIRMA DE LOS JURADOS:


ALINA KATIL SIGARROA R. 
ANA MARÍA ARISMENDY P. 
JESÚS ARTURO RAMÍREZ S.


Vo. Bo. Coordinador Comité Curricular

Dedicatoria

Para todas aquellas personas que de una u otra manera permitieron sobreponerme a los obstáculos y confiaron en mí.

CRISTIAN CAMILO MIRANDA BELTRAN

Agradecimientos

A los directores Marlon Hans Rodríguez Aguilar y Nancy Eunice Niño Castañeda por su experiencia, orientación, paciencia y apoyo en cada uno de los temas relacionados con mi trabajo de investigación.

A los profesores Fabio Alexander Rivera Labrador e Isaías Ernesto Guerrero Marcucci por su experiencia, orientación y apoyo durante el transcurso de mi carrera.

A Wendy Carolina Soler García por su compañía, apoyo, amistad incondicional y desinteresada.

A las señoras Luz Stella Salazar Jaramillo y Nubia Gamboa por su compañía y orientación en la búsqueda del material vegetal necesario para la ejecución de mi trabajo de investigación.

Tabla de contenido

	Pág.
Introducción	17
Problema	20
Titulo	20
Planteamiento del problema	20
Formulación del problema	22
Objetivos	22
Objetivo general	22
Objetivos específicos	22
Justificación	23
Alcances y limitaciones	25
Alcances	25
Limitaciones	25
Delimitaciones	25
Espacial	25
Temporal	25
Marco referencial	26
Antecedentes	26
Antecedentes empíricos	26
Antecedentes bibliográficos	27
Marco teórico	29
Generalidades del cultivo de fríjol (<i>Phaseolus vulgaris</i> L.)	29

Taxonomía	29
Descripción botánica y morfológica	29
Requerimientos edafoclimáticos	30
Propiedades físicas y nutricionales	31
Producción en Colombia.	31
Buenas prácticas en cosecha y postcosecha.	32
Antracnosis en el cultivo de fríjol	32
Agente causal	32
Sintomatología	33
Diseminación	34
Diagnóstico	34
Control	35
Generalidades de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	36
Nombre científico	36
Taxonomía	37
Hospedantes	37
Descripción morfológica	38
Requerimientos para su desarrollo	38
Ciclo de vida	39
Generalidades de la especie <i>Teucrium fruticans</i> L. (Salvia Amarga)	40
Taxonomía	40
Descripción botánica y morfológica	41
Usos y composición	42

Distribución global	43
Extractos vegetales en la agricultura	43
Usos y utilidades	43
Composición y propiedades	44
Metodologías para la obtención de extractos vegetales	45
Marco conceptual	46
Marco contextual	47
Marco legal	48
Diseño metodológico	50
Tipo de trabajo	50
Población y muestra	50
Población	50
Muestra	50
Hipótesis	51
Fases de la investigación	51
Patógeno e inóculo	51
Fase I: Extractos vegetales	52
Obtención del extracto vegetal de Salvia Amarga	52
Prueba de la acción inhibitoria de los extractos vegetales de Salvia Amarga	55
Fase II: Dosis mínima inhibitoria	56
Prueba de dosis mínima inhibitoria del extracto etanólico de Salvia Amarga	56
Fase III: Actividad antifúngica	58
Inhibición del crecimiento de <i>C. lindemuthianum</i>	58

Inhibición de la germinación y recolonización de <i>C. lindemuthianum</i>	60
Inhibición de la esporulación de <i>C. lindemuthianum</i>	63
Resultados y discusión	65
Fase I: Extractos vegetales	65
Prueba de la acción inhibitoria de los extractos vegetales de Salvia Amarga	65
Fase II: Dosis mínima inhibitoria	68
Prueba de dosis mínima inhibitoria del extracto etanólico de Salvia Amarga	68
Fase III: Actividad antifúngica	71
Inhibición del crecimiento de <i>C. lindemuthianum</i>	71
Inhibición de la germinación y recolonización de <i>C. lindemuthianum</i>	77
Inhibición de la esporulación de <i>C. lindemuthianum</i>	79
Conclusiones	80
Recomendaciones	81
Bibliografía	82
Anexos	92

Lista de Tablas

	Pág.
Tabla 1. Clasificación taxonómica del Frijol (<i>P. vulgaris</i> L.)	29
Tabla 2. Contenido de macronutrientes en el frijón (<i>P. vulgaris</i> L.) por cada 100g.	31
Tabla 3. Clasificación taxonómica de <i>Colletotrichum lindemuthianum</i>	37
Tabla 4. Clasificación taxonómica de la planta Salvia Amarga (<i>Teucrium fruticans</i> L.)	41
Tabla 5. Metabolitos secundarios identificados en la planta Salvia Amarga (<i>T. fruticans</i>)	42
Tabla 6. Extractos vegetales utilizados y su acción en el control de arvenses, plagas y enfermedades	45
Tabla 7. Extractos vegetales de Salvia Amarga, obtenidos en la investigación	53
Tabla 8. Tratamientos evaluados acción inhibitoria de los extractos vegetales de Salvia Amarga	55
Tabla 9. Diseño experimental, dosis mínima inhibitoria del extracto etanólico de Salvia amarga	57
Tabla 10. Diseño experimental, crecimiento de <i>C. lindemuthianum</i> en difusión agar	58
Tabla 11. Tratamientos evaluados en el ensayo de germinación de <i>C. lindemuthianum</i>	61
Tabla 12. Porcentaje de inhibición micelial (PIM), en cada observación de los distintos tratamientos	74
Tabla 13. Concentración y porcentaje de inhibición de las esporas de <i>C. lindemuthianum</i>	79

Lista de Figuras

	Pág.
Figura 1. Etapas fenológicas del cultivo del fríjol (<i>P. vulgaris</i> L.)	30
Figura 2. Hojas y vainas de fríjol (<i>P. vulgaris</i>) con síntomas de Antracnosis (<i>C. lindemuthianum</i>)	33
Figura 3. Conidias hialinas y cilíndricas de <i>C. lindemuthianum</i> vistas desde el microscopio	38
Figura 4. Ciclo reproductivo e infeccioso de <i>C. lindemuthianum</i> , agente causal de Antracnosis	39
Figura 5. Morfología de la especie <i>Teucrium fruticans</i> (Salvia Amarga)	41
Figura 6. Ubicación geográfica de la planta Salvia Amarga (<i>T. fruticans</i>), vereda Saladito, Tona, Santander.	48
Figura 7. Replicación de <i>C. lindemuthianum</i> en medio de cultivo PDA	51
Figura 8. Recolección del material vegetal de Salvia Amarga	52
Figura 9. Proceso de extracción del extracto de Salvia Amarga	54
Figura 10. Prueba de la acción inhibitoria de los extracto vegetal de Salvia Amarga	56
Figura 11. Prueba de inhibición del crecimiento de <i>C. lindemuthianum</i> en difusión agar	59
Figura 12. Prueba de germinación de <i>C. lindemuthianum</i>	61
Figura 13. Suspensiones en agua destilada esteril de cada uno de los tratamientos	62
Figura 14. Prueba de recolonización de las esporas de <i>C. lindemuthianum</i>	62
Figura 15. Preparación de las suspensiones de conidias de <i>C. lindemuthianum</i>	63
Figura 16. Crecimiento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> después de 4 días, en cada tratamiento	65
Figura 17. Crecimiento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> después de 12 días, en cada tratamiento	66
Figura 18. Promedio de los diámetros en (cm) del micelio en cada tratamiento (Fase I)	67
Figura 19. Crecimiento micelial de <i>C. lindemuthianum</i> después de 8 días, en cada tratamiento	69

Figura 20. Promedio de los diámetros en (cm) del micelio en cada tratamiento (Fase II)	70
Figura 21. Observación final de los tratamientos luego de 18 días de sembrado el hongo <i>C. lindemuthianum</i>	72
Figura 22. Graficas del crecimiento del diámetro del micelio (CDM), durante el transcurso de 18 días	72
Figura 23. Representación grafica del comportamiento del (PIM), en cada observación	76
Figura 24. Observación de la germinación y recolonización del hongo <i>C. lindemuthianum</i> , luego de 48 horas	78

Lista de Anexos

	Pág.
Anexo 1. Registro y estadística de la prueba de la acción inhibitoria de los extractos vegetales de Salvia Amarga	92
Anexo 2. Registro y estadística de la prueba de dosis mínima inhibitoria del extracto etanólico de Salvia Amarga	93
Anexo 3. Registro fotográfico del crecimiento del micelio durante el transcurso de la prueba	94
Anexo 4. Registro de las mediciones del diámetro en (cm) de los inóculos, por cada tratamiento prueba de crecimiento en difusión agar	97
Anexo 5. Análisis de varianza y comparación de medías, prueba de crecimiento en difusión agar	98

Resumen

La Antracnosis del frijol (*Phaseolus vulgaris* L.), causada por el hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Mag.) Scrib., es una de las principales limitantes en la producción de este cultivo, tanto en campo como en postcosecha a nivel mundial; ya que puede generar pérdidas en rendimientos de hasta el 95% dependiendo de la variedad. El uso de fungicidas químicos, actualmente es la opción más empleada para su control. Sin embargo, los mercados actuales exigen la búsqueda de alternativas amigables con el medio ambiente y la salud humana; por tal razón, el objetivo de esta investigación fue evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto de Salvia Amarga (*Teucrium fruticans* L.), sobre el desarrollo del hongo *C. lindemuthianum*. Para la obtención del extracto vegetal, se evaluaron tres solventes (alcohol 96°, agua y trementina). Se determinó la dosis mínima inhibitoria y se evaluó el efecto de tres concentraciones (3%, 5% y 8%), sobre el crecimiento, germinación, recolonización y esporulación del hongo *C. lindemuthianum*, en comparación con un control químico (Myclobutanil), empleado en la región. Se obtuvo que el solvente etanólico permitió la extracción de los metabolitos secundarios que tienen un efecto inhibitorio sobre *C. lindemuthianum*, con una concentración mínima del 8% se presentó un porcentaje de inhibición micelial del 98% y de esporas del 99.9%. El extracto etanólico de Salvia Amarga supero el efecto antifúngico *in vitro* de la dosis comercial de Myclobutanil, demostrando que puede ser una alternativa viable para el control de Antracnosis en frijol.

Palabras clave: Antracnosis, compuesto vegetal, solvente, dosis mínima inhibitoria, frijol.

Abstract

Bean Anthracnose (*Phaseolus vulgaris* L.), caused by the phytopathogenic fungus *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Mag.) Scrib., is one of the main constraints on the production of this crop, both in the field and in postharvest worldwide; since it can generate yield losses of up to 95% depending on the variety. The use of chemical fungicides is currently the most used option for its control. However, current markets require the search for alternatives that are friendly to the environment and human health; For this reason, the objective of this research was to evaluate the *in vitro* antifungal activity of Salvia Amarga extract (*Teucrium fruticans* L.), on the development of the *C. lindemuthianum* fungus. To obtain the plant extract, three solvents (96° alcohol, water and turpentine), were evaluated. The minimum inhibitory dose was determined and the effect of three concentrations (3%, 5% and 8%), on the growth, germination, recolonization and sporulation of the *C. lindemuthianum* fungus was evaluated, in comparison with a chemical control (Myclobutanil), employed in the region. It was obtained that the ethanolic solvent allowed the extraction of the secondary metabolites that have an inhibitory effect on *C. lindemuthianum*, with a minimum concentration of 8% a percentage of mycelial inhibition of 98% and spores of 99.9% was presented. The ethanolic extract of Salvia Amarga surpassed the *in vitro* antifungal effect of the commercial dose of Myclobutanil, demonstrating that it can be a viable alternative for the control of Anthracnose in beans.

Key words: Anthracnose, vegetable compound, solvent, minimum inhibitory dose, beans.

Introducción

Dentro de los cultivos transitorios de gran relevancia en Colombia, se encuentra el fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.), considerado como uno de los productos básicos de la economía campesina de pequeños productores y uno de los componentes fundamentales de la dieta alimenticia colombiana por su alto grado de proteínas y su bajo costo (Barrios et al., 2016). A nivel nacional, FENALCE (2011), reportó 120,000 hectáreas (ha), sembradas en fríjol, para 2019, esta área se redujo debido a problemas fitosanitarios aproximadamente a 92.412 ha, con una producción de 114.408 toneladas y un rendimiento promedio de 1,24 toneladas por hectárea (Minagricultura, 2020).

La Antracnosis es actualmente la principal enfermedad limitante del cultivo de fríjol y es causada por el hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Mag.) Scrib., la cual ha diezmando la producción nacional, generando pérdidas superiores al 95% en el rendimiento en variedades de fríjol susceptibles al patógeno. Los daños más severos se observan cuando el ataque se presenta en estados tempranos del ciclo del cultivo, principalmente por uso de semillas no certificadas y siembras en regiones húmedas con temperaturas moderadas (Martínez, et al., 2014; CIAT, 2016). *C. lindemuthianum* afecta principalmente la calidad de las vainas del fríjol, al generar lesiones oscuras y carnosas que se convierten en chancros hundidos con centros de color salmón, afectando también peciolos y tallos (Schwartz et al., 2005). La diseminación de esta enfermedad en campo, está ampliamente relacionada con los residuos de cosecha y el uso de semillas contaminadas con este microorganismo, las cuales generalmente presentan decoloración; sin embargo, es frecuente encontrar semillas asintomáticas (Chen et al., 2013).

El uso frecuente de productos de síntesis química en la agricultura principalmente para el control de enfermedades, trae consigo serios problemas para los diferentes ecosistemas como el efecto adverso contra microorganismos y organismos benéficos; la acumulación de moléculas tóxicas en el suelo; la contaminación de fuentes de agua y la capacidad de producir alteraciones a la salud humana y animal (Gil et al., 2012). Es en este punto, donde la agricultura inteligente busca la integración de todos los sistemas que promueven la seguridad alimentaria, desde un punto de vista ambiental, social y económico. Esta agricultura se basa en una producción sustentable, donde el uso de fertilizantes, herbicidas y pesticidas de síntesis química es mínimo, permitiendo la exploración de nuevas opciones donde los metabolitos secundarios de plantas pueden ser una fuente de beneficios ambientales, sociales y económicos (Lizcano, 2007; Corrales et al., 2012).

La actividad biológica de algunos metabolitos encontrados en extractos vegetales, aceites esenciales y compuestos fenólicos se ha estudiado a nivel mundial, ofreciendo una alternativa promisoriosa en diversas áreas agronómicas (Villa et al., 2015). Distintos autores han evaluado extractos de especies vegetales en condiciones *in vitro* e *in vivo*, demostrando actividad antimicrobiana en patógenos causantes de enfermedades en diferentes cultivos (Cárdenas et al. 2005, Sharma et al. 2008, Álzate et al. 2009 y Garduno et al. 2010).

El género *Teucrium* es uno de estos ejemplos, siendo actualmente una de las fuentes más ricas en diterpenos (más de 220 identificados). Estudios fitoquímicos y farmacológicos de este género han demostrado que los metabolitos secundarios de hojas, flores y frutos presentan un predominio de sesquiterpenos, como β -cariofileno, germacreno D y β -bisaboleno (Lo Presti et al., 2010). La mayoría de estos compuestos tienen un gran potencial, destacando sus propiedades como plantas medicinales y su papel ecológico como antialimentadores frente a diferentes

especies de insectos (Piozzi et al. 2005). La Salvia Amarga (*Teucrium fruticans* L.), es un arbusto perennifolio utilizado en ornamentación y en algunas prácticas agronómicas tradicionales de desinfección de semillas. Estudios de *T. fruticans* han identificado y aislado diferentes flavonoides, los cuales exhiben interesantes propiedades biológicas tales como, actividades antipiréticas, hepatoprotectoras, antibacterianas, antioxidantes y bioquímicas (Maccioni et al., 2007).

Dada la importancia del tipo de metabolitos secundarios que posee esta especie vegetal y al uso excesivo de fungicidas de síntesis química que actualmente están generando poblaciones resistentes del patógeno, la presente investigación adscrita al grupo de investigación en diagnóstico y manejo de enfermedades en plantas – GIDMEP, busca encontrar alternativas para el control de enfermedades por medio de extractos naturales, evaluando la actividad antifúngica del extracto vegetal de Salvia Amarga (*T. fruticans*), en condiciones *in vitro*, sobre el hongo *C. lindemuthianum* agente causal de antracnosis en el cultivo de fríjol (*P. vulgaris*).

1. Problema

1.1 Título

EVALUACIÓN DE LA ACTIVIDAD ANTIFÚNGICA *IN VITRO* DEL EXTRACTO VEGETAL DE SALVIA AMARGA (*Teucrium fruticans* L.), SOBRE EL HONGO *Colletotrichum lindemuthianum*, AGENTE CAUSAL DE ANTRACNOSIS EN FRÍJOL (*Phaseolus vulgaris* L.).

1.2 Planteamiento del problema

El fríjol (*P. vulgaris*), es conocido como un producto importante para la alimentación por su alto contenido de proteínas y elementos minerales esenciales, además se caracteriza por ser uno de los cultivos de ciclo corto más predominante en la economía de muchas regiones del país, contando con aproximadamente 137.000 pequeños productores en Colombia (DANE, 2013). La infección por microorganismos es una de las causas de enfermedades más frecuentes y con mayor énfasis en el cultivo del fríjol, el avance de la enfermedad está muy asociado al tipo de patógeno, la susceptibilidad de la variedad, y las condiciones ambientales prevalecientes en la zona; además que, la presencia temprana de enfermedades está íntimamente relacionada con la sobrevivencia del patógeno en residuos de cosecha, suelo y semilla (Araya et al., 2006).

El hongo *C. lindemuthianum*, causa la Antracnosis en el fríjol, una enfermedad presente en todo el mundo y que produce pérdidas económicas considerables al productor. Temperaturas entre 13 y 25 °C y humedades relativamente altas favorecen esta enfermedad, la cual en variedades susceptibles puede llegar a ser devastadora, causando la pérdida completa de la producción (Castellanos et al., 2016). Los síntomas principales aparecen en el envés de las hojas,

localizados a lo largo de las nervaduras, con manchas pequeñas de color rojo ladrillo a negro. Estas lesiones también pueden aparecer en distintas partes de la planta, como en los pecíolos, ramas, tallos, cotiledones y vainas; en estas últimas se producen lesiones redondas, hundidas, con bordes bien definidos (CIAT, 2016).

La utilización de fungicidas químicos constituye una medida eficiente, rápida, práctica y económicamente viable en el control de esta enfermedad, sin embargo, las poblaciones de hongos objeto de control generan resistencia, tornando estos productos ineficientes (Mikaberidze et al., 2015). Esto sucede debido a una reducción adquirida y heredable de la sensibilidad del hongo a un principio activo específico, obteniendo la habilidad de adaptación a condiciones agronómicas normalmente adversas; por lo cual, algunos individuos logran sobrevivir, multiplicarse y propagarse a pesar de haber sido expuestos a un fungicida (Beckerman, 2013).

A nivel mundial diferentes productos de síntesis química han causado efectos adversos, entre estos se destaca el Metalaxyl, cuyo uso indiscriminado ha generado resistencia del patógeno hacia este ingrediente activo y, por tanto, la pérdida de eficiencia de esta molécula (Navarro et al. 1981). Desde que *C. lindemuthianum* adquirió resistencia, los estudios se han enfocado en monitorear la eficiencia y dosis de los diferentes fungicidas (ingredientes activos), buscando zonas geográficas con aislamientos resistentes para rotar con nuevas moléculas (Ceyhan et al. 2012). Es importante resaltar que la mayoría de ingredientes activos de los productos que se comercializan en Colombia son de síntesis química, en el año 2019 solo se encontraron 67 registros de Bioinsumos (agentes microbianos, parasitarios, extractos vegetales e inoculantes biológicos) reportados por el ICA; en comparación con las cifras más recientes, donde se reportan alrededor de 3.034 registros nacionales de plaguicidas químicos de uso agrícola (ICA, 2022); las altas cifras de fungicidas químicos resultan alarmantes, ya que los

productos siguen creando fenómenos de resistencia en los patógenos contra los que se utilizan (Hollomon, 2015).

Si bien, se ha demostrado que los tratamientos de tipo biológico con extractos vegetales y productos a base de microorganismos son importantes y eficientes para el control de fitopatógenos (Mesa et al., 2019), se hace necesario incrementar los estudios para determinar el efecto de extractos vegetales, sobre la inhibición de diferentes microorganismos patógenos de plantas; en este caso en particular, sobre el hongo *C. lindemuthianum* por su importancia económica en el cultivo de frijol a nivel nacional.

1.3 Formulación del problema

¿Puede el extracto vegetal de Salvia Amarga (*Teucrium fruticans* L.), manifestar actividad antifúngica *in vitro* sobre el crecimiento y desarrollo de *Colletotrichum lindemuthianum*?

1.4 Objetivos

1.4.1 Objetivo general

Evaluar la actividad antifúngica *in vitro* del extracto vegetal de Salvia Amarga (*Teucrium fruticans* L.), sobre el hongo *Colletotrichum lindemuthianum*, agente causal de Antracnosis en fríjol (*Phaseolus vulgaris* L.).

1.4.2 Objetivos específicos

- Evaluar tres (3), tipos de solventes para la obtención del extracto vegetal de Salvia Amarga (*T. fruticans*).

- Determinar la dosis mínima inhibitoria, del extracto vegetal de Salvia Amarga (*T. fruticans*), sobre el desarrollo del hongo *C. lindemuthianum*.
- Comparar la actividad antifúngica de tres (3), concentraciones del extracto vegetal de Salvia Amarga (*T. fruticans*), en el crecimiento, germinación, recolonización y esporulación del hongo *C. lindemuthianum*.

1.5 Justificación

El control químico de las enfermedades es una de las medidas de manejo más empleadas en la agricultura moderna. En muchas ocasiones, el empleo de fungicidas representa una medida efectiva, funcional y rentable, sin embargo, generan resistencia dentro de las poblaciones objeto de control, convirtiendo a los insumos de síntesis química ineficientes, causando así, graves problemas a los productores y a la comunidad en general (Carmona et al., 2017). El surgimiento de resistencia en los hongos frente a los diferentes principios activos fungicidas, es uno de los aspectos más relevantes de la agricultura actual, ya que la vida útil o efectiva de un fungicida se ve limitada a la pérdida del control efectivo de la enfermedad en campo, causada por la habilidad de adaptación del hongo a diferentes condiciones normalmente adversas (Lucas et al., 2015).

Además, que el uso de plaguicidas de origen sintético provoca consecuencias como: intoxicación de humanos y animales debido a trazas en los alimentos, destrucción de suelos y hábitats, contaminación de fuentes acuíferas, aparición de plagas resistentes, aparición de enfermedades humanas y ambientales, etc. Aun así, dicho consumo ha superado al de productos de origen biológico, esto debido principalmente a la falta de información y alternativas viables para los usuarios (Pérez E, 2012).

En Colombia, según la Cámara Procultivos ANDI (2021), el uso de plaguicidas en 2018, fue de 37.773 toneladas, una cifra inferior al promedio de la década del 2000, pero que sigue siendo considerablemente alta. Es por eso que la FAO (2018), señala respecto al uso de plaguicidas que “cuando sea necesario deberían emplearse plaguicidas sintéticos de menor riesgo para el control selectivo, en la cantidad adecuada y en el momento oportuno”. Adicionalmente, señala que “el manejo integrado de plagas puede promoverse mediante las escuelas de campo para agricultores, la producción local de agentes de control biológico, normas estrictas respecto al uso de plaguicidas y la eliminación de las subvenciones de plaguicidas”.

Por estos motivos, desde finales del siglo XX, se ha incrementado el interés en la búsqueda de alternativas más seguras que permitan mitigar el impacto ambiental negativo que producen las sustancias químicas. Esto ha llevado a la utilización de sustancias de origen biológico, las cuales son más aceptadas por los consumidores ya que suponen ser seguras para la salud y el medio ambiente (Rota et al., 2008).

Actualmente, la aplicación de extractos vegetales es una alternativa muy atractiva para el control de enfermedades en cualquier etapa del cultivo. Estas sustancias son una mezcla compleja de compuestos volátiles, los cuales son producidos como metabolitos secundarios en diferentes partes de la planta y que han demostrado poseer propiedades antibacterianas y antifúngicas eficientes para el control de enfermedades (Velásquez et al., 2014). Teniendo en cuenta que Salvia Amarga (*T. fruticans*), es una planta utilizada dentro de la medicina ancestral en la región Nortesantandereana y que posee múltiples metabolitos secundarios que pueden tener propiedades antimicrobianas, es necesario hacer estudios para evaluar su posible efecto antifúngico sobre hongos fitopatógenos, en este caso sobre *C. lindemuthianum*, en frijol (*P. vulgaris*).

1.6 Alcances y limitaciones

1.6.1 Alcances

La investigación hace parte del macroproyecto “Plantas promisorias y su potencial en el control de patógenos en plantas”, donde se realizó la evaluación *in vitro* de las propiedades antifúngicas del extracto de Salvia Amarga (*T. fruticans*), sobre el hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum* causante de Antracnosis en fríjol (*P. vulgaris*).

1.6.2 Limitaciones

En el transcurso del proyecto se presentaron cambios que condicionaron algunos aspectos en la investigación como, la cantidad disponible de material vegetal, los tipos de solventes y los métodos y técnicas empleados en laboratorio.

1.7 Delimitaciones

1.7.1 Espacial

El proyecto se llevó a cabo en el laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Francisco de Paula Santander, sede Campos Elíseos del municipio de Los Patios, Norte de Santander.

1.7.2 Temporal

El desarrollo del proyecto se llevó a cabo en un periodo de ocho (8), meses, tiempo que permitió cumplir con todas las actividades pertinentes del trabajo de investigación.

2. Marco referencial

2.1 Antecedentes

2.1.1 Antecedentes empíricos

El uso de extractos vegetales para el control de enfermedades agrícolas ha sido una práctica ancestral, ampliamente utilizada por los agricultores en diversas culturas y regiones, convirtiéndose en una alternativa para mitigar la contaminación de los alimentos y del medio ambiente, al igual que los gastos que generan los plaguicidas sintéticos en los cultivos (Márquez et al. 2007). Su obtención no se limita a una gran inversión, ya que su elaboración es sencilla, con materiales vegetales presentes en la zona; los agricultores utilizan métodos simplificados como macerar, machacar, moler, picar, hervir, etc. distintas partes de la planta y mezclarlas con solventes como, agua o alcohol. Su aplicación ha sido efectiva, gracias a su acción preventiva, curativa, inhibitoria, toxica y alelopática en diferentes etapas del ciclo vegetativo, postcosecha y en el microbiota del suelo (Martínez et al., 2008).

El ajo (*Allium sativum*), es muy utilizado por su alto contenido de azufre, el cual le brinda propiedades insecticidas y antifúngicas, este bulbo es utilizado por los agricultores y personas en general, con el propósito de proteger algunos cultivos y plantas de jardín, su extracción es un proceso muy sencillo en el cual se macera, machaca, licua etc.; y se mezcla con un solvente, esta solución es aplicada directamente a la planta como método preventivo, repelente y curativo (Torija et al., 2013).

2.1.2 Antecedentes bibliográficos

Una estrategia que ha resultado satisfactoria para reducir la utilización de agroquímicos costosos y potencialmente peligrosos, ha sido el manejo integrado de plagas y enfermedades; dentro de esta opción se encuentra, la utilización de sustancias de origen natural, consideradas más seguras para la salud humana y la conservación de los ecosistemas; y a su vez la más aceptada por los consumidores (Kavitha et al., 2011).

Para contrarrestar la Antracnosis del tomate de árbol, ocasionada por el hongo *Colletotrichum sp*; Álzate et al. (2009), realizaron una investigación por medio de extractos vegetales, en la cual se evaluó la actividad antifúngica contra la especie *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales (AE) de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios, timol y citral. Los resultados demostraron que el timol a 125 mg/L y el citral a 300 mg/L inhiben el crecimiento micelial completamente durante once días de incubación. La germinación de las esporas se evitó en un 100% con el AE de limoncillo a 350 y 400 mg/L, timol a 100 y 125 mg/L, y citral a 250 y 300 mg/L, después de un período de doce horas. Adicionalmente, el timol a 125 mg/L y el citral a 300 mg/L inhiben completamente la esporulación y el AE de tomillo a 350 mg/L la permite en baja extensión.

El estudio de Bolívar et al. (2009), evaluó el potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo *in vitro* del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.), causante de Antracnosis en frutos de mango (*Mangifera indica*), por medio de la aplicación de los extractos etanólicos (EE), de hojas de *Azadirachta indica*; *Phyllanthus niruri*; *Calotropis procera*; *Lippia origanoides*; *Gliricidia sepium* y *Heliotropium indicum*. El patógeno se hizo crecer en medio PDA y la determinación del efecto de los EE se realizó a una concentración de 2,5% bajo tres métodos de aplicación *in vitro*. Bolívar et al. (2009), encontraron que las plantas diferían en los

grupos de metabolitos secundarios. Los EE del *L. origanoides* y *H. indicum*, homogenizados en el medio, ocasionaron la mayor disminución del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

La investigación de Pérez et al. (2011), evaluó la actividad inhibitoria in vitro de extractos de hojas de *Melissa officinalis*, *Origanum vulgare*, *Jatropha gossypilia*, *Eucalyptus sp.*, *Melia azederach* y *Mascagnia concinna*, sobre aislados de hongo del género *Colletotrichum*, causante de la enfermedad Antracnosis en el cultivo del ñame (*Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata*). Una vez preparados los extractos de hojas de *M. officinalis* y *O. vulgare*, evaluaron su actividad inhibitoria sobre seis aislados de hongo del género *Colletotrichum*. Para la prueba inhibitoria utilizaron el método de siembra directa sobre la superficie del medio PDA; sobre cada cepa se adicionaron 250 µl de cada extracto por separado. La prueba se evaluó midiendo el crecimiento radial de cada cepa con los diferentes tratamientos a 96 y 168 h. Los resultados expresados en porcentaje de inhibición, mostraron una alta actividad de los extractos obtenidos de las hojas de las plantas de *M. azederach* y *M. concinna*, sobre los hongos evaluados y su acción fue similar al control positivo.

El uso de extractos vegetales sobre otros hongos fitopatógenos presentes en muchos cultivos también ha sido ampliamente estudiado. La investigación de Velásquez et al. (2014), evaluó y comparó *in vitro* la actividad antifúngica del aceite comercial de mandarina, timol y carvacrol, sobre los hongos *Penicillium digitatum* y *Penicillium italicum*, a concentraciones de 40 y 50 ppm. Como resultado, todos los compuestos y aceites evaluados presentaron un porcentaje de inhibición entre 50% y 100%, para ambos hongos, siendo mayor la inhibición en dosis de 50 ppm. Carvacrol presentó mayor actividad antifúngica sobre ambos hongos. *P. digitatum* mostró mayor sensibilidad que *P. italicum*, al efecto de los aceites esenciales evaluados.

2.2 Marco teórico

2.2.1 Generalidades del cultivo de frijol (*Phaseolus vulgaris* L.)

2.2.1.1 Taxonomía

El frijol común se denomina *Phaseolus vulgaris*, esta especie pertenece a la familia de las leguminosas, la cual comprende una amplia gama de variedades. Su clasificación taxonómica se presenta en la Tabla 1.

Tabla 1

Clasificación taxonómica del Fríjol (P. vulgaris L.)

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Fabales</i>
Familia:	<i>Fabaceae</i>
Genero:	<i>Phaseolus</i>
Especie:	<i>P. vulgaris</i>

Fuente: (Ramírez J., 2011)

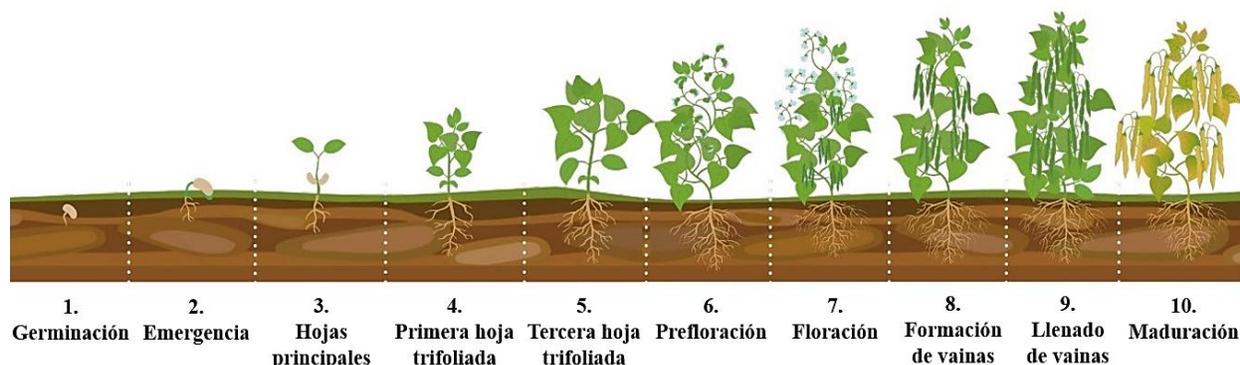
2.2.1.2 Descripción botánica y morfológica

Esta planta se puede clasificar según sus hábitos de crecimiento, los cuales son de cuatro tipos: hábito de crecimiento determinado arbustivo, indeterminado arbustivo, indeterminado postrado, indeterminado trepador. Las etapas de desarrollo del frijol son diez (10), las cuales se presentan en la Figura 1; cinco etapas de desarrollo vegetativo y cinco de desarrollo reproductivo, requiriendo de 62 a 77 días después de la siembra para completar la madurez (Faiguenbaum et al., 2015).

La planta de fríjol se caracteriza por sus hábitos de crecimiento arbustivo y voluble, los cuales se relacionan con el periodo de maduración; el arbustivo presenta un tiempo de maduración corto mientras el voluble es por etapas; es decir, en lapsos de tiempo (Ospina, 2002).

Figura 1

Etapas fenológicas del cultivo del fríjol (P. vulgaris L.)



Fuente: Adaptado de FertiGlobal, 2020.

2.2.1.3 Requerimientos edafoclimáticos

La planta se desarrolla de manera adecuada en diferentes pisos térmicos desde los 900 a hasta los 2700 metros sobre el nivel del mar (msnm), con rangos de temperatura que oscilan entre 15 y 27 °C y una humedad relativa de 60 a 75 %, su requerimiento hídrico exige precipitaciones superiores a los 500 mm/año (Núcleo, 2015). El cultivo requiere suelos ligeramente ácidos con un rango de pH entre 5.5 y 6.5, con una textura franco limosa y franco arcillosa profundos y bien drenados, sin embargo, se adapta a diversas condiciones de suelo y topografía. En Colombia se recomienda sembrar las plantas en terrenos planos, con distancias de siembra entre surcos de 0,70 m y 0,07 m, logrando una densidad de población aproximada de 200.000 plantas por hectárea (Calero et al., 2018).

2.2.1.4 Propiedades físicas y nutricionales

Las propiedades físicas del fríjol se clasifican de acuerdo a las variedades del mismo, como forma, tamaño, peso, capacidad de absorción del agua y superficie del grano (lisa, rugosa o angulosa). Con respecto al valor nutricional se caracteriza por ser una fuente de proteína y lisina, esta última es un aminoácido esencial en la dieta del ser humano. Su información nutricional se encuentra en la Tabla 2.

Tabla 2

Contenido de macronutrientes en el fríjol (P. vulgaris L.) por cada 100g.

Componente	Contenido	Unidad
Calorías	322	Kcal
Proteínas	21.8	g
Grasas	2.5	g
Carbohidratos	55.4	g
Tiamina	0.63	mg
Riboflavina	0.17	mg
Niacina	1.8	mg
Calcio	183	mg
Hierro	4.7	mg

Fuente: (Faiguenbaum et al., 2015)

2.2.1.5 Producción en Colombia

Según FENALCE (2020), la producción de este grano para el año 2019 en Colombia fue de 114.408 toneladas de fríjol, siendo Huila el principal departamento productor con 22.963 ton, seguido por Santander con 17.760 ton, Antioquia con 14.746 ton, Nariño con 14.576 ton y Norte de Santander con 10.990 ton. Entre el año 2016 y 2019 el área sembrada en fríjol ha disminuido en un 13% debido a problemas fitosanitarios que afectan a los productores y su comercialización, entre los cuales se destaca la Antracnosis (Minagricultura, 2020).

2.2.1.6 Buenas prácticas en cosecha y postcosecha

La inocuidad debe ser prioridad durante todo el proceso productivo, considerando que muchos de los problemas pueden generarse desde el campo y pueden transferirse a otras fases como el procesamiento, empaque, transporte, comercialización e inclusive en la preparación del producto y su consumo. Esta labor es responsabilidad de todas las personas involucradas en el proceso productivo (Minsalud, 2015). La cosecha de granos debe ser realizada en el momento en que estos alcanzan la madurez fisiológica. Sin embargo, en este estado el contenido de humedad del grano es muy alto (mayor al 30%), lo que puede generar deterioro del grano en postcosecha. De esta forma, se recomienda cosechar en la etapa de madurez de cosecha, en la cual cerca del 75% de las vainas están secas (la humedad del grano es de aproximadamente del 20%).

Cabe destacar que el periodo de floración en la planta de fríjol voluble es largo, por lo que las plantas no maduran al mismo tiempo siendo necesario cosechar en varias etapas, en la medida que las vainas van alcanzando la madurez (Arias et al. 2007). Para el manejo en postcosecha (manipulación, empaque, transporte, y almacenamiento), del grano, su cuidado debe iniciar desde el campo, ya que durante la etapa de comercialización se pueden producir algunos daños importantes; entre ellos: daños mecánicos, pudriciones y enfermedades por el deficiente proceso de secado, partición de granos, ataque de plagas, entre otros (Faiguenbaum et al., 2015).

2.2.2 Antracnosis en el cultivo de fríjol

2.2.2.1 Agente causal

La Antracnosis, es causada por el hongo fitopatógeno *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Mag.) Scrib., ha sido reportado en varias investigaciones, como la enfermedad más importante del fríjol, ya que puede llegar a causar pérdidas en rendimiento de hasta 100%,

cuando se siembran variedades susceptibles (Montes R et al. 2013; Martínez P. et al., 2014; DGSV-CNRF. 2020).

2.2.2.2 Sintomatología

El síntoma característico de la Antracnosis se encuentra en las vainas como se observa en la Figura 2, este se inicia con una o varias lesiones pequeñas, redondas, color marrón rojizo, de borde definido, las cuales aumentan el tamaño y presentan su centro hundido (Cháves, 1980).

Figura 2

Hojas y vainas de fríjol (P. vulgaris) con síntomas de Antracnosis (C. lindemuthianum)



Fuente: (Miranda, 2022).

En el estado de plántula, los síntomas se observan en el hipocótilo o en el epicótilo como pequeñas lesiones de color marrón oscuro, de aspecto acuoso, ligeramente hundidas y de forma ovalada. A medida que la planta se desarrolla, esas lesiones se pueden observar sobre el tallo principal o el pedúnculo de las hojas. Cuando el ataque es severo, la plántula puede morir porque el tallo principal se quiebra en los puntos donde la lesión logró destruir al menos la mitad del diámetro (Tamayo P, 1995).

En las hojas, los síntomas están muy bien definidos, sobre todo en el envés. El hongo avanza por las venas, primarias o secundarias, causando necrosis de los tejidos. Algunas veces se produce en el haz de las hojas una lesión oscura, con borde definido, forma irregular a los lados de las venas.

2.2.2.3 Diseminación

El hongo puede sobrevivir de diferentes maneras: como saprofito en el suelo por mucho tiempo, en la dormancia de las semillas, como esporas entre los dos cotiledones, como micelio dentro de la testa y como estroma en los residuos de cosecha donde puede sobrevivir hasta dos años (SARH, 1992). El medio más importante de diseminación, a corta distancia, es el salpique de agua lluvia sobre los residuos de cosecha, ya que estos contienen conidias, conidióforos o acérvulos del hongo. La semilla contaminada es otro medio de transmisión importante, ya que una planta infectada con Antracnosis aún produce semillas, las cuales estarán contaminadas, Sin embargo, algunas condiciones de poca humedad o de sequía son inadecuadas para este patógeno y, por lo tanto, las plantas y las semillas estarán libres de ellos (Agrios, 2005).

2.2.2.4 Diagnóstico

Se puede diagnosticar mediante el aislamiento de los patógenos a partir de tejidos vegetales infectados colocados en agar nutritivo. Este método generalmente requiere de 10 a 14 días para emitir un diagnóstico. Así mismo, existe un sistema basado en PCR para detección rápida y sensible en todos los tipos de tejidos de frijol, el cual permite un diagnóstico en un periodo de 24 horas proporcionando datos cualitativos sobre la presencia o ausencia del patógeno (Chen et al., 2007; Martínez P. et al., 2014).

2.2.2.5 Control

Para el control de este patógeno se han reportado sustancias y agentes biológicos promisorios que pueden tener efecto negativo en el desarrollo de *Colletotrichum lindemuthianum*.

García et al. (2010), señalaron que los fenoles obtenidos del cascalote (*Caesalpinia cacalaco*), en sus metabolitos se encuentran ácidos gálicos y tánicos, que tienen actividad fungistática contra *C. lindemuthianum* raza R-0 y R-1472, dando muy buenos resultados en campo en tratamientos preventivos en invernadero.

Brand et al. (2010), comprobaron que los extractos de plantas pueden ayudar a controlar las enfermedades de las plantas debido a su actividad antimicrobiana y la activación de los mecanismos de defensa. Se estudió la aplicación de extractos de *Allium sativum* L. y *Rosmarinus officinalis* L. sobre *C. lindemuthianum* obteniendo una reducción del crecimiento micelial y efecto en la inducción de faseolina.

Christmann et al. (2019), evaluaron la eficiencia de hongos *Trichoderma* en ensayos in vitro para el control de *C. lindemuthianum* (antagonismo, producción de compuestos volátiles y no volátiles). La Antracnosis se controló en plantas de fríjol con el uso de productos alternativos. Los hongos endófitos *Trichoderma viride* y *Trichoderma tomentosum* inhibieron el crecimiento micelial de *C. lindemuthianum* en los tres ensayos in vitro.

Sumado a esto, el control genético por medio del uso de variedades con resistencia a *C. lindemuthianum* es otra alternativa para el control de esta enfermedad, algunas variedades resistentes reportadas en Colombia son: G 2333, MAC 74, BAT 841, DICTA 17. Sin embargo, no todas están disponibles para los agricultores (CIAT, 2016).

Es por eso que existen métodos de control cultural utilizados como: el uso de semilla limpia o no contaminada, eliminación de residuos de cosecha, con el objetivo de reducir también los niveles de inóculo y la rotación de cultivos, que no sean hospedantes de esta enfermedad, por lapsos de tiempo, para reducir el nivel de inóculo (García, 2014).

Sin embargo, su severidad hace que muchos agricultores utilicen una amplia gama de fungicidas, lo cual representa altos costos en la producción y contaminación ambiental. La aplicación de fungicidas se realiza en aspersiones foliares, tanto para prevenir la infección como en acciones curativas por medio de fungicidas sistémicos. En ataques intermedios, se aplican fungicidas como: propiconazol, tebuconazol, tiofanato metílico, carbendazim, oxiclورو de cobre y sulfato de cobre, antes de floración y durante la formación de vainas; ataques muy tempranos limitan la eficiencia de los fungicidas (Castaño, 2015).

Sobre la eficiencia de otros fungicidas, Boersma et al. (2019), señalaron que los fungicidas del grupo de las estrobilurina (azoxistrobina, kresoximmetilo, picoxistrobina, piraclostrobina, trifloxistrobina) son efectivos contra *C. lindemuthianum* cuando la única enfermedad presente en campo es la Antracnosis.

2.2.3 Generalidades de Colletotrichum lindemuthianum

2.2.3.1 Nombre científico

En su estado asexual (estado imperfecto): *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Mag.) Scrib., y en su estado sexual (rara vez se encuentra en medio artificial o en la naturaleza): *Glomerella cingulata*.

2.2.3.2 Taxonomía

La clasificación de este hongo fitopatógeno se presenta en la Tabla 3. Aun así, el género *Colletotrichum* es confuso taxonómicamente, debido a que existe variación del nombre del género de acuerdo con su estado sexual. En el año 2012, la Subcomisión Internacional de Taxonomía de *Colletotrichum* (ISTC), apoyaron el uso del término *Colletotrichum*, sobre el de *Glomerella* debido a su mayor uso en investigaciones, lo que dio la expectativa de generar menores cambios taxonómicos en las especies de ese género (Damm et al., 2010; Zhang et al., 2013).

Tabla 3

Clasificación taxonómica de Colletotrichum lindemuthianum

Reino:	<i>Fungi</i>
Phyllum:	<i>Ascomycota</i>
Clase:	<i>Sordariomycetes</i>
Orden:	<i>Glomerellales</i>
Familia:	<i>Glomerellaceae</i>
Genero:	<i>Colletotrichum</i>
Especie:	<i>C. lindemuthianum</i>

Fuente: (Catalogue of life, 2019)

2.2.3.3 Hospedantes

Además del fríjol, *Phaseolus vulgaris*, *C. lindemuthianum* también tiene como hospederas a: *P. vulgaris* var. *aborigineus*, que es una forma silvestre ancestral sudamericana del fríjol común. Así como otras especies de fríjol como, tepari (*P. acutifolius*), fríjol ayocote (*P. coccineus*), fríjol lima (*P. lunatus*) fríjol lima grande (*P. lunatus* var. *macrocarpus*), fríjol mungo (*Vigna mungo*), fríjol mungo cultivado (*V. radiata*), caupí (*V. unguiculata*), fríjol de Egipto (*Lablab purpureus*) y haba (*Vicia faba*).

2.2.3.4 Descripción morfológica

C. lindemuthianum produce micelio septado como se observa en la Figura 3, cuando joven es hialino y se torna de color café oscuro a negro a medida que envejece, los conidios son unicelulares, hialinos con una vacuola y miden 5.7 x 2.0 micras, su forma es desde oblonga a cilíndrica. Cuando germinan emiten un tubo germinativo que desarrolla sobre la superficie de la hoja, una estructura llamada apresorio, que utiliza para fijarse al hospedante; luego de completar su ciclo, rompe la epidermis formando acérvulos, constituidos por conidióforos cortos que miden de 40 a 60 micras de longitud, evidenciando en el ápice los conidios (García, 2014).

Figura 3

Conidias hialinas y cilíndricas de C. lindemuthianum vistas desde el microscopio



Fuente: (Liu et al. 2013).

2.2.3.5 Requerimientos para su desarrollo

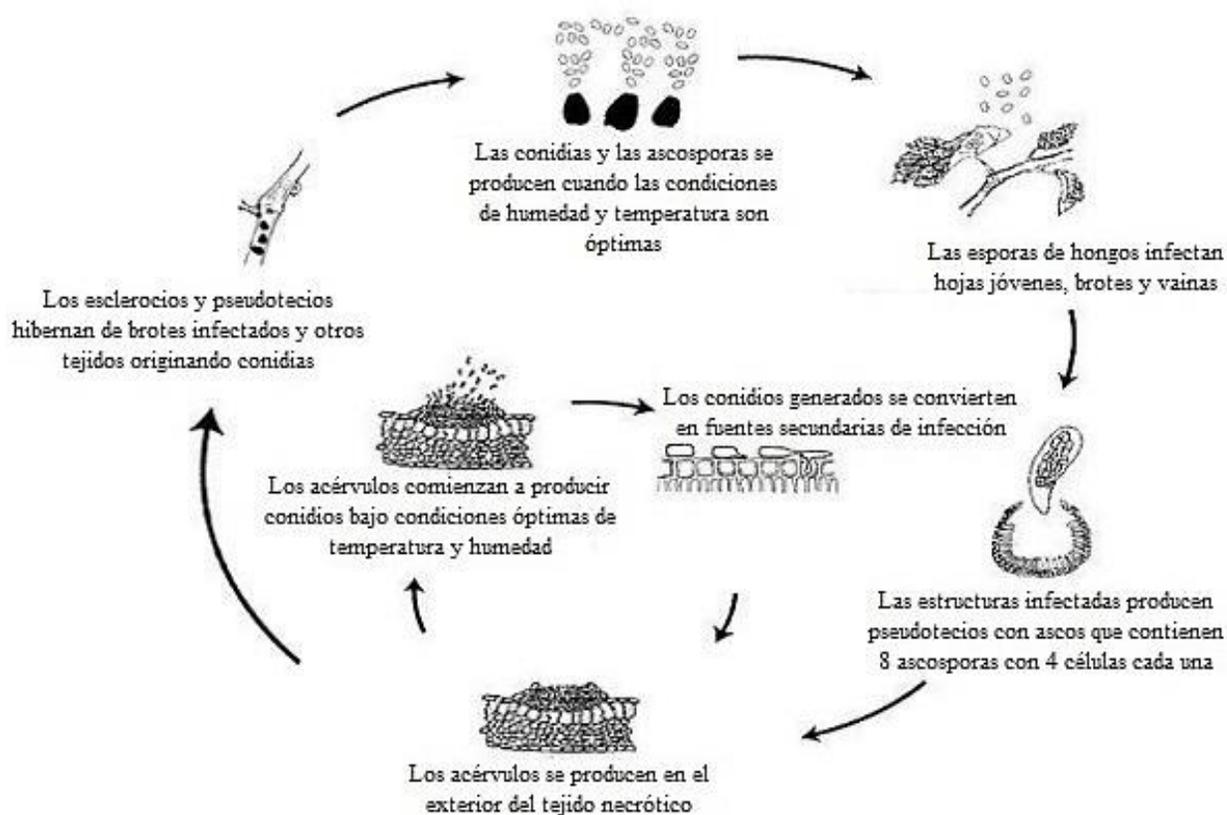
La Antracnosis del fríjol *C. lindemuthianum* se presenta principalmente en elevaciones por encima de mil metros sobre el nivel del mar. Las temperaturas medias (13 - 26°C), y humedades relativamente altas (92 - 100%), en forma de lluvias moderadas y frecuentes acompañadas por vientos favorecen la infección y desarrollo del patógeno (León, 2009).

2.2.3.6 Ciclo de vida

Los conidios al entrar en contacto con la parte aérea de la planta, en condiciones de humedad relativamente alta y temperatura moderada, pueden germinar y producir una estructura para la adherencia y penetración del hongo en el tejido de la planta conocido como apresorio, dando así lugar, a un ciclo reproductivo e infeccioso en las plantas como se observa en la Figura 4. Luego de esto, comienzan a desarrollarse las hifas y forman un micelio compacto que se alimenta de células del huésped apareciendo las lesiones características (Agrios, 2005).

Figura 4

Ciclo reproductivo e infeccioso de C. lindemuthianum, agente causal de Antracnosis



Fuente: Adaptado de (Kumar, 2016).

Los conidios de *C. lindemuthianum* pueden germinar en cuatro horas en condiciones de alta humedad; formando un tubo germinativo y apresorios por medio del cual se adhiere a la cutícula del hospedante, y penetra en forma mecánica a través de la cutícula y la epidermis. Los primeros síntomas suelen presentarse en zonas de baja exposición a la radiación solar, como el envés de las hojas, o en zonas próximas al suelo. Con el transcurso del tiempo, en el centro de las lesiones pueden desarrollarse unas masas de un color salmón característico, donde en su interior se forman las conidiósporas (acérvulos o cuerpo fructífero asexual), cuando los acérvulos se rompen, se dispersan las conidias con la ayuda de gotas de agua y del viento principalmente; las conidias en clima seco forman masas viscosas, firmes y duras, mientras que en climas cálidos y húmedos forman masas rosáceas (Agrios, 2005).

Las conidias pueden sobrevivir varios años en el suelo y en restos de cosecha. Además, las hifas pueden sobrevivir dentro de la testa de la semilla, aunque no se manifiesten síntomas claros. Es por esto que las semillas son un mecanismo importante de propagación de la enfermedad (Pérez E et al. 2010). Este proceso produce nuevas infecciones de plantas colindantes, incidencia en las plantas y facilita la conservación en el medio (DGSV, 2020).

2.2.4 Generalidades de la especie *Teucrium fruticans* L. (*Salvia Amarga*)

2.2.4.1 Taxonomía

La planta *Teucrium fruticans*, fue descrita por Carlos Linneo y publicado en *Species Plantarum*, su clasificación taxonómica se presenta en la Tabla 4. Es conocida popularmente por el nombre de Teucro, Olivilla, *Salvia Amarga*, Olivera, *Salvia rabia* o Troyana real.

Tabla 4

Clasificación taxonómica de la planta Salvia Amarga (Teucrium fruticans L.)

Reino:	<i>Plantae</i>
División:	<i>Magnoliophyta</i>
Clase:	<i>Magnoliopsida</i>
Orden:	<i>Lamiales</i>
Familia:	<i>Lamiaceae</i>
Genero:	<i>Teucrium</i>
Especie:	<i>T. fruticans</i>

Fuente: Herbari virtual del Mediterrani Occidental.

2.2.4.2 Descripción botánica y morfológica

T. fruticans es una especie de planta fanerógama, conocida por ser utilizada como planta ornamental debido al atractivo contraste de sus llamativas flores azules con su follaje siempre verde, en la Figura 5, se observa el color verde grisáceo por encima y blanco plateado por debajo que identifica esta planta.

Figura 5

Morfología de la especie Teucrium fruticans (Salvia Amarga)



Fuente: Adaptado de Herbari virtual del Mediterrani Occidental.

Es un arbusto perennifolio que crece hasta alcanzar una altura máxima de 2 metros, aunque normalmente se deja crecer entre 0.5 a 1.5 m, muy ramificado, voluminoso,

frecuentemente ginodioico. Los tallos son erectos, foliosos, cuadrangulares; los jóvenes herbáceos, gris-blanquecinos, a veces pardo-rojizos, con pelos acintados, largos; los viejos leñosos, glabros, redondeados. Las hojas tienen un limbo de tamaño variable, con haz verde oliva, pubescente o glabrescente, con envés blanquecino. La inflorescencia, se agrupa en racimos, tiene ramas laterales con verticilastos. Las flores son erectas, hermafroditas o femeninas, con pedicelos tomentosos. Los frutos, son obovoides, reticulados, con pelos largos y acintados, y de color pardo (Acquaviva et al. 2017).

2.2.4.3 Usos y composición

Esta planta ha sido utilizada ancestralmente debido a sus propiedades depurativas y diuréticas por medio de la infusión de sus hojas, además, diferentes estudios han identificado metabolitos secundarios como los diterpenos y flavonoides que tienen varios efectos antioxidantes y bioquímicos (Barrachina et al. 1995; Calatayud et al. 1998). Su composición química ha sido estudiada por (Kisiel W et al. 2001), donde se han aislado diterpenos, derivados de triterpenos y flavonoides, algunos de los componentes identificados en la especie *T. fruticans* se presentan en la Tabla 5.

Tabla 5

Metabolitos secundarios identificados en la planta Salvia Amarga (T. fruticans)

Terpenos	Flavonoides
Germacreno D	Cirsilineol
β -cariofileno	Cirsimaritin
β -pineno	
β -mirceno	
β -bisaboleno	

Fuente: (Kisiel W et al. 2001; Flamini et al. 2001).

2.2.4.4 Distribución global

Es una planta nativa de la región mediterránea occidental, sur de Italia, Sicilia y norte de África, en Marruecos, Argelia, Túnez y Libia. Presente en el centro y sur de la península ibérica. Cultivada en otras partes del mundo, incluido en América, en su mayoría en ambientes urbanos. La planta se puede encontrar en las grietas de las rocas calizas desde el nivel del mar hasta los 1000 msnm, sin embargo, en Colombia se encuentra a una elevación de 2500 a 3200 msnm, limitando con zonas de paramo (Fernández et al. 2015). En nuestro país se ha geolocalizado en la región de los Andes, específicamente en los departamentos de Boyacá y Cundinamarca, además de los departamentos aledaños.

2.2.5 Extractos vegetales en la agricultura

2.2.5.1 Usos y utilidades

Dentro del concepto de una agricultura sostenible y ecológica, el uso de sustancias de origen biológico a partir de extractos vegetales, para el control de plagas y enfermedades, constituyen una alternativa promisoría en los sistemas agrícolas, ya que poseen múltiples propiedades, a un bajo costo y siendo amigables con el medio ambiente (Gan y Wickings, 2017). Gran variedad de investigaciones se han centrado en analizar los compuestos naturales de origen vegetal; logrando reportar sustancias con actividades antagonistas (bactericidas, fungicidas, insecticidas, repelentes y nematocidas) en contra de varios microorganismos (Tripathi et al., 2004).

Los extractos de origen vegetal han sido utilizados desde la antigüedad por muchas civilizaciones, sus formulaciones basadas en distintas plantas se utilizaron con fines rodenticidas, insecticidas y conservación de víveres almacenados (Ahmet et. al, 2005). En el siglo XIX se utilizaban moléculas de origen vegetal como los alcaloides para acciones fitosanitarias, pero a

partir de la II Guerra Mundial estos insumos de origen biológico, fueron drásticamente sustituidos por la revolución verde, en la cual predominó el uso de pesticidas de síntesis química como, organoclorados, organofosforados y carbamatos (Kagale et al., 2004).

2.2.5.2 Composición y propiedades

En la actualidad, se han intensificado los estudios de productos de origen vegetal, con énfasis en su composición química, debido a que las plantas tienen la capacidad de sintetizar gran diversidad de metabolitos secundarios, que por su composición química son clasificados en dos grupos principales: nitrogenados y no nitrogenados. Los metabolitos secundarios (MS), que contienen nitrógeno, incluyen a los alcaloides, aminoácidos no protéicos, aminas, glucósidos cianogénicos y glucosinolatos. Los MS no nitrogenados se dividen en terpenoides, poliacetilenos, policétidos y fenilpropanoides; esta variabilidad ocasiona perfiles metabólicos diferentes entre especies, entre los miembros de una población y entre los diferentes órganos de la planta, la cual es parte de la estrategia de adaptación de las plantas (Sepúlveda et al., 2004).

Dichos compuestos le proporcionan importantes características a los extractos, como son antiapetitivos, antivirales, antimicrobianos, bioherbicidas y repelentes, que permiten su utilización para proteger los cultivos e incrementar la calidad y producción alimentaria de una manera más amigable con el medio ambiente, ya que tienen la propiedad de ser menos tóxicos y más fácilmente degradables (Ávalos et al., 2009). Las características de algunos extractos de especies vegetales, utilizados en la agricultura tradicional para el control de plagas y enfermedades, se presentan en la Tabla 6.

Tabla 6

Extractos vegetales utilizados y su acción en el control de arvenses, plagas y enfermedades

Extracto	Acción	Control
Ajenjo (<i>Artemisia absinthium</i>)	Repelente	Babosas
Ajo (<i>Allium sativum</i>)	Insecticida Acaricida	Insectos en hortalizas
Albahaca (<i>Ocimum basilicum</i>)	Repelente	Mosca blanca
Canela (<i>Cinnamomum verum</i>)	Herbicida	Gramíneas
Clavo (<i>Syzygium aromaticum</i>)	Herbicida	<i>Amaranthus sp.</i> <i>Ipomoea sp.</i>
Crisantemo (<i>Chrysanthemum spp.</i>)	Insecticida Acaricida	<i>Eriohotyia japónica</i> <i>Sacadodes pyrelis</i>
Fríjol (<i>Phaseolus vulgaris</i>)	Fungicida	<i>Pseudoperonospora cubensis</i> <i>Botrytis cinérea</i> <i>Sphaeroteca pannosa</i>
Dioscórea (<i>Dioscorea spp.</i>)	Insecticida Acaricida	<i>Alabama argillacea</i> <i>Liriomyza quadrata</i>
Lavanda (<i>Lavandula angustifolia</i>)	Repelente	Babosas y moscas
Eucalipto (<i>Eucalyptus globulus</i>)	Herbicida	<i>Eleusine indica</i> <i>Portulaca oleracea</i>

Fuente: Laboratorio Basel (BASELAB). (QuimiNet, 2012).

2.2.5.3 Metodologías para la obtención de extractos vegetales

Los procesos para obtener extractos vegetales son variables, estos componentes son extraídos de los diferentes órganos vegetativos y reproductivos, previamente triturados y con un tamaño de partícula determinado y en contacto con cantidad suficiente de solvente (Pardo et al., 2011). Entre las técnicas de extracción se encuentra: la percolación, el arrastre con vapor y extracción Soxhlet, la extracción asistida con ultrasonido, la extracción asistida con microondas, la extracción con solvente acelerado y la extracción con fluidos supercríticos; donde se emplean distintos solventes para obtener extractos acuosos, etanólicos, aceites esenciales entre otros (Mesa et al., 2015).

2.3 Marco conceptual

Aislamiento. separación de un determinado microorganismo del resto de microorganismos que le acompañan. El método más usual es la siembra por estría sobre un medio de cultivo sólido adecuado dispuesto en una placa de Petri.

Cepa: población de microorganismos aislado en cultivo puro y caracterizado taxonómicamente con una o más características morfológicas, fisiológicas o moleculares, que lo distinguen de otros aislamientos de la misma especie.

Crecimiento del diámetro micelial (CDM): longitud de crecimiento del diámetro del micelio del hongo en el medio de cultivo (caja de Petri).

Esporulación: mecanismo de reproducción asexual a través de esporas y endosporas por parte de los hongos y diversas especies vegetales.

Extracto etanólico (EE): compuesto producido de la obtención de sustancias con el uso de etanol como solvente.

Extracto vegetal (EV): compuesto producido de la obtención de sustancias biológicamente activas presentes en los tejidos de plantas, por el uso de un solvente y un proceso de extracción adecuado.

Fitopatógeno: microorganismo que generan enfermedades en las plantas a través de disturbios en el metabolismo celular, al secretar enzimas, toxinas, fitorreguladores y otras sustancias y, además, absorbiendo nutrientes de la célula para su propio crecimiento.

Huésped: organismo que alberga a otro en su interior o lo porta sobre sí, ya sea como parásito, comensal o mutualista.

Inhibición: suspensión, impedimento o interrupción temporal de una función o actividad de un organismo.

Inóculo: término colectivo para referirse a los microorganismos o sus partes (esporas, fragmentos miceliales, etc.) capaces de provocar infección o simbiosis cuando se transfieren a un huésped.

Medio de cultivo: conjunto de componentes o sustancias sintéticas y/o naturales empleados para permitir la multiplicación, mantenimiento, recuperación, crecimiento, detección, transporte y/o enumerar diferentes microorganismos como bacterias, hongos y algunos parásitos.

Metabolismo secundario (MS): compuestos químicos sintetizados por la planta, a partir de excedentes del metabolismo primario.

Principio activo: sustancia responsable del efecto biológico del producto (herbicida, insecticida, acaricida, fungicida, etc.)

Recolonización: presencia, crecimiento y multiplicación de un microorganismo en un hospedero sin causar una respuesta inmune específica o infección.

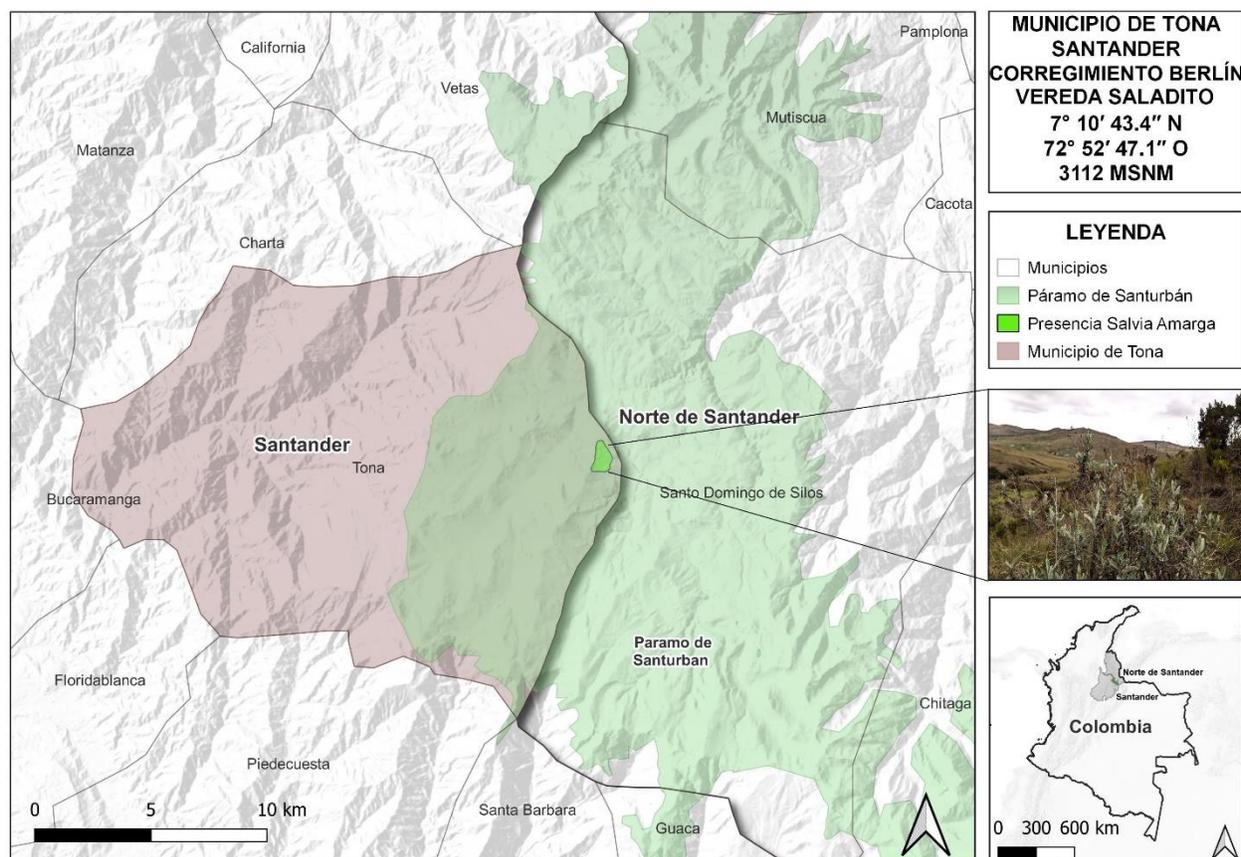
2.4 Marco contextual

La recolecta del material vegetal de Salvia Amarga, se llevó a cabo por medio de la identificación previa de la especie en un área silvestre perteneciente al Páramo de Berlín. Específicamente en la vereda Saladito del corregimiento de Berlín, Municipio de Tona, Santander, como se observa en la Figura 6, localizado geográficamente a $7^{\circ} 10' 43.4''$ de latitud Norte y $72^{\circ} 52' 47.1''$ de longitud al Oeste de Greenwich a una altura de 3112 msnm.

Las diferentes actividades contempladas en los objetivos de la investigación se llevaron a cabo por medio del uso de los equipos e instalaciones del laboratorio de Sanidad Vegetal de la Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente, en la Universidad Francisco de Paula Santander, Sede Campos Elíseos, Municipio de Los Patios, Norte de Santander, Colombia.

Figura 6

Ubicación geográfica de la planta Salvia Amarga (T. fruticans), vereda Saladito, Tona, Santander.



Fuente: (Miranda, 2022), QGIS 3.22.

2.5 Marco legal

El Instituto Colombiano Agropecuario ICA mediante el Decreto 1840/94, le corresponde otorgar el registro y ejercer el control legal y técnico de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en el país. Orientando el uso y manejo adecuado de estos, para prevenir y minimizar daños a la salud humana, la sanidad agropecuaria y el ambiente bajo las condiciones autorizadas. Además, define a los “Extractos vegetales” como preparado de origen natural, obtenido de una(s) especie(s) botánica(s) que conserva sus propiedades esenciales y que se utiliza con fines de fitoprotección agrícola (ICA, 2004).

La presente investigación está enmarcada dentro del término “Bioensayo” definido en el Artículo 3 de la Resolución No. 00375 (27 de febrero de 2004), como una prueba experimental de control de calidad realizado al nivel de laboratorio o invernadero que permite verificar la actividad biológica de un Bioinsumo o Extracto Vegetal de uso agrícola.

En el Código Sanitario Nacional establecido en la Ley 9 de 1979 (Artículo 22-35) se dictan medidas sanitarias que contempla la regulación del ambiente y manejo de los recursos naturales, constituyéndose como base del derecho sanitario, mediante el establecimiento de un ordenamiento jurídico único en sus tres áreas definidas: Saneamiento ambiental, atención a las personas y vigilancia, y control sanitario.

Es de importancia la Guía Técnica Colombiana GTC 35. Guía para la recolección selectiva de residuos sólidos: Métodos de recolección selectiva necesaria para mantener la calidad de los materiales aprovechables, donde se dicta que estos materiales deben estar presentados y almacenados para que no genere impactos negativos al ambiente y al ser humano.

En lo que respecta a la resistencia generada a los microorganismos fitopatógenos, por el uso indiscriminado de productos de origen químico; el Ministerio de Salud Pública mediante el decreto 1843 de 1991, reglamenta el control y vigilancia epidemiológica en el uso y manejo de plaguicidas, con el objeto de evitar que afecten la salud de la comunidad, la sanidad animal y vegetal o causen deterioro en el ambiente.

Además, cabe destacar las responsabilidades asignadas a los agricultores, propietarios de bodegas de vegetales almacenados y profesionales que recomienden o prescriban plaguicidas de uso agrícola, entre otros aspectos, adoptadas en el manual técnico en aplicación de insumos agrícolas, contemplado en la Resolución 1068 (24 de abril de 1996) del ICA.

3. Diseño metodológico

3.1 Tipo de trabajo

Trabajo de investigación realizado en condiciones *in vitro* y evaluado por medio de diseños experimentales completamente aleatorizados en los cuales se aplicaron fundamentos estadísticos básicos, metodologías de extracción vegetal y manejo de hongos fitopatógenos en laboratorio, con base en metodologías propuestas por Pérez A et al. (2011); Ceyhan N, et al. (2012) y Velásquez M, et al. (2014).

3.2 Población y muestra

3.2.1 Población

Se utilizaron 1,5 kilogramos frescos de Salvia Amarga (hojas, flores y tallos) y 1,5 litros de solvente para la obtención de los extractos vegetales. El aislamiento utilizado para los experimentos se obtuvo a partir de la cepa del hongo *C. lindemuthianum* (Labfito – 1583) del laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Francisco de Paula Santander.

3.2.2 Muestra

Se dispuso de tres (3), preparaciones del extracto de Salvia Amarga, utilizando tres (3), solventes (alcohol de 96°, agua y trementina en relación 1:1 mg/ml), y 180 cajas de medio de cultivo PDA (Potato Dextrose Agar), para la inoculación de la cepa del hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum* utilizado en los experimentos.

3.3 Hipótesis

La aplicación del extracto vegetal de Salvia Amarga (*Teucrium fruticans*), en medios de cultivo inoculados con *Colletotrichum lindemuthianum*, inhibe el desarrollo de este hongo fitopatógeno.

3.4 Fases de la investigación

3.4.1 Patógeno e inóculo

Los conidios y fragmentos de micelio del hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum* se obtuvieron a partir de la cepa activa Labfito – 1583 (colección laboratorio de Sanidad Vegetal de la Universidad Francisco de Paula Santander), la cual se aisló originalmente de fríjol en el municipio de Pamplonita, Norte de Santander y se cultivó en PDA a 22 °C bajo un régimen de 8 horas luz/oscuridad durante 12 días. Los platos con medio de cultivo se multiplicaron colocando discos de PDA colonizados de 5mm de diámetro como se observa en la Figura 7.

Figura 7

Replicación de C. lindemuthianum en medio de cultivo PDA



Fuente: (Miranda, 2022)

Su crecimiento se realizó en la incubadora de hongos con el mismo régimen de temperatura y luz. El inóculo se obtuvo por suspensión de todos los propágulos fúngicos en agua desionizada estéril, las suspensiones se llevaron a una concentración de 1×10^6 conidios/ml y se cuantificaron usando un hemocitómetro. La viabilidad de estos propágulos se verificó en PDA y se determinaron en unidades formadoras colonia (UFC)/ml.

3.4.2 Fase I: Extractos vegetales

3.4.2.1 Obtención del extracto vegetal de Salvia Amarga

Inicialmente se recolectaron partes aéreas (hojas, flores y tallos), de la planta de Salvia Amarga, procedentes de la zona silvestre de la vereda Saladito en el corregimiento de Berlín, Tona, Santander. Los cortes fueron hechos con tijeras de podar y las ramas fueron introducidas en un saco de fibra previamente desinfectado como se observa en la Figura 8, para su posterior traslado hacia el lugar de procesamiento.

Figura 8

Recolección del material vegetal de Salvia Amarga



Fuente: (Miranda, 2022), A). Planta de Salvia Amarga; B). Corte y empacado del material vegetal.

El protocolo establecido en la investigación, se basó en la metodología de percolación utilizada por Díaz et al., (2007) con algunas variaciones en sus procesos, debido a factores externos como la disponibilidad de equipos y materiales especializados. Sin embargo, esta condición favoreció a la creación de un protocolo sencillo y práctico para la obtención de extractos vegetales en laboratorio.

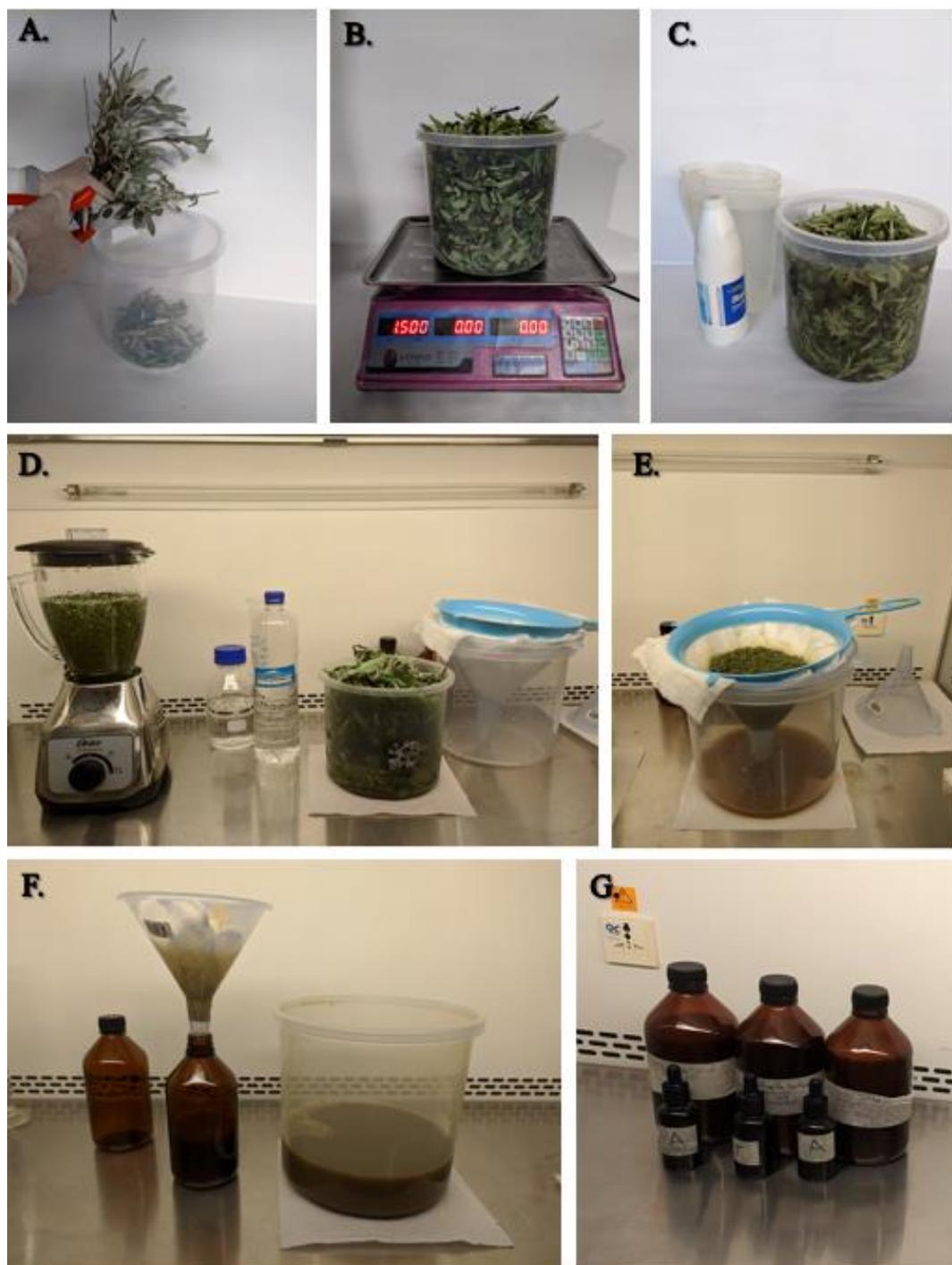
En el laboratorio de Sanidad Vegetal se realizó el proceso de extracción como se observa en la Figura 9, utilizando 1500 g de material vegetal fresco pesados en balanza digital (Gynipot GY-6990); al material cortado en trozos pequeños, se le practicó un prelavado con solución de hipoclorito de sodio al 0.2% por 2 minutos y luego 4 lavados con agua destilada estéril. La preparación de los extractos con los distintos solventes, se realizaron teniendo en cuenta la cantidad de material vegetal, por el volumen de solvente, en relación 1:1 mg/ml. El proceso de homogenización se llevó a cabo en una licuadora industrial (Oster® BLST-4655), por 5 minutos, hasta obtener una mezcla uniforme; luego se procedió a filtrar la mezcla para separar los sólidos, utilizando un filtro plástico recubierto con 4 capas consecutivas de gasa estéril. De acuerdo con la metodología de Bianchi et al. (1997), los extractos obtenidos con cada solvente se presentan en la Tabla 7, y fueron dispuestos en frascos Schott de coloración ámbar, para su correcta conservación y almacenamiento, llevándolos a refrigeración en oscuridad a 4°C hasta su uso.

Tabla 7

Extractos vegetales de Salvia Amarga, obtenidos en la investigación

Tipo de extracto vegetal	Solvente	Proporción
Extracto etanólico de Salvia Amarga	Alcohol (96°)	1:1 (mg/ml)
Extracto acuoso de Salvia Amarga	Agua	1:1 (mg/ml)
Extracto de Salvia Amarga	Trementina	1:1 (mg/ml)

Fuente: (Miranda, 2023)

Figura 9*Proceso de extracción del extracto de Salvia Amarga*

Fuente: (Miranda, 2022), A). Corte en trozos pequeños; B). Pesaje del material vegetal; C). Desinfección con hipoclorito de sodio; D). Proceso de licuado, E). Filtrado de sólidos, F). Envasado de cada extracto; G). Frascos con cada uno de los extractos obtenidos.

3.4.2.2 Prueba de la acción inhibitoria de los extractos vegetales de Salvia Amarga

Se evaluó la acción inhibitoria de los extractos vegetales de Salvia Amarga, con relación a sus solventes, a partir del crecimiento del hongo en medio de cultivo PDA, en presencia de cada uno de los extractos; comparando la actividad del solvente trementina en estado puro, disuelto en PDA. Se evaluaron 6 repeticiones por cada uno de los tratamientos, para un total de 24 cajas de Petri evaluadas. (Tabla 8).

Tabla 8

Tratamientos evaluados acción inhibitoria de los extractos vegetales de Salvia Amarga

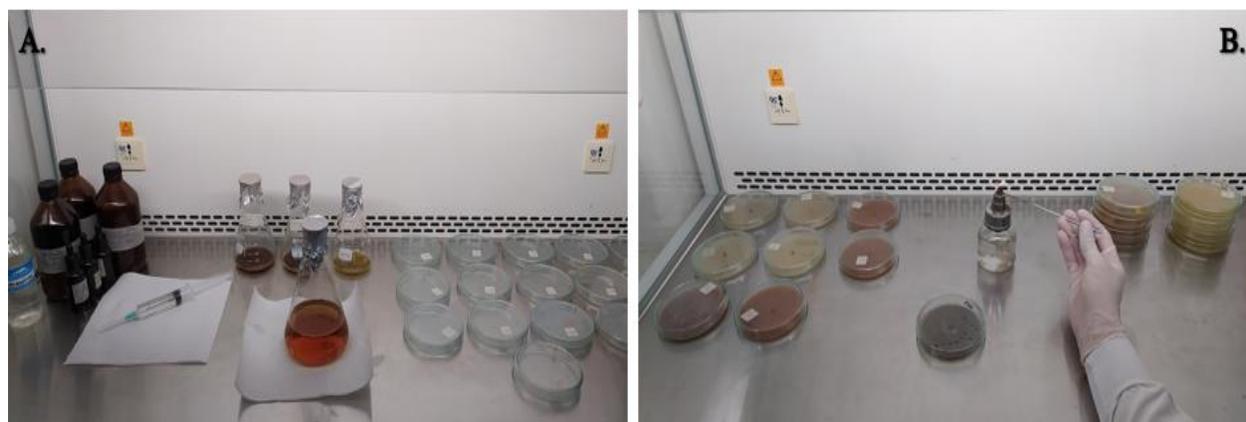
TTO	Medio de cultivo	Concentración
T1	PDA + Trementina	20%
T2	PDA + Extracto etanólico (96°) de Salvia Amarga	20%
T3	PDA + Extracto acuoso de Salvia Amarga	20%
T4	PDA + Extracto de Salvia Amarga con trementina.	20%

Fuente: (Miranda, 2023)

Como se observa en la Figura 10, la prueba se llevó a cabo, mezclando cada uno de los extractos y la trementina en estado puro, a una concentración del 20% (tomado de su relación 1:1), con el medio de cultivo PDA a una temperatura de 40 °C y adicionándolo posteriormente a las cajas de Petri. Posteriormente, se inóculo cada caja con un disco de micelio de 5 mm de diámetro tomado de la cepa de *C. lindemuthianum* almacenada, y se llevó a la incubadora a 22 °C para mantener las condiciones óptimas de crecimiento. El valor de la concentración del 20%, corresponde al óptimo económico que fue determinado por el grupo de investigación en diagnóstico y manejo de enfermedades en plantas (GIDMEP), para esta especie, dentro del macroproyecto “Plantas promisorias y su potencial en el control de patógenos en plantas”.

Figura 10

Prueba de la acción inhibitoria de los extracto vegetal de Salvia Amarga



Fuente: (Miranda, 2022), A). Preparación de los tratamientos en medio de cultivo PDA B). Inoculación de *C. lindemuthianum* en cada uno de los tratamientos.

Por último, se realizó el seguimiento a las 24, 48, 72 y 96 horas, observando el crecimiento del diámetro micelial (CDM), del hongo en cada tratamiento. Posterior a esto, se realizó una última observación a los 12 días, para confirmar el efecto antifúngico. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza y comparación de medias por medio del programa estadístico InfoStat versión 2020 (Anexo 1).

3.4.3 Fase II: Dosis mínima inhibitoria

3.4.3.1 Prueba de dosis mínima inhibitoria del extracto etanólico de Salvia Amarga

Se evaluó la dosis mínima inhibitoria del extracto etanólico de Salvia Amarga, a partir del crecimiento del diámetro micelial (CDM), del hongo *C. lindemuthianum*, en medio de cultivo PDA, en presencia del extracto etanólico; en comparación con un testigo absoluto, sin extracto. En la Tabla 9, se presenta el diseño experimental, el cual se conformó por 6 repeticiones en cada tratamiento, para un total de 48 cajas de Petri evaluadas.

Tabla 9

Diseño experimental, dosis mínima inhibitoria del extracto etanólico de Salvia amarga

TTO	Medio de cultivo	Concentración (%)
T1	PDA sin aplicación (Testigo)	-
T2	PDA + Extracto etanólico de Salvia Amarga	0.5%
T3	PDA + Extracto etanólico de Salvia Amarga	1%
T4	PDA + Extracto etanólico de Salvia Amarga	2%
T5	PDA + Extracto etanólico de Salvia Amarga	3%
T6	PDA + Extracto etanólico de Salvia Amarga	5%
T7	PDA + Extracto etanólico de Salvia Amarga	8%
T8	PDA + Extracto etanólico de Salvia Amarga	10%

Fuente: (Miranda, 2023)

La prueba se llevó a cabo, mezclando el extracto etanólico de Salvia Amarga a unas concentraciones de 0.5 %, 1 %, 2%, 3%, 5%, 8% y 10% (tomado de su relación 1:1), con el medio de cultivo PDA, a una temperatura de 40 °C y adicionándolo posteriormente a las cajas de Petri. Después de 24 horas de solidificación, se inoculó cada caja con un disco de micelio de 5 mm de diámetro tomado de la cepa de *C. lindemuthianum*, y se llevó a la incubadora a 22 °C para mantener las condiciones óptimas de crecimiento.

Por último, se realizó un seguimiento hasta el octavo día, en el cual se observó el crecimiento del diámetro micelial (CDM), del hongo en cada uno de los tratamientos. Los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza y comparación de medias por medio del programa estadístico InfoStat versión 2020 (Anexo 2).

3.4.4 Fase III: Actividad antifúngica

3.4.4.1 Inhibición del crecimiento de *C. lindemuthianum*

La evaluación de la inhibición del crecimiento de *C. lindemuthianum* por el extracto etanólico de Salvia Amarga, se realizó basado en el método de difusión en agar, de acuerdo a la metodología propuesta por Viuda et al. (2008).

Los tratamientos evaluados fueron conformados por tres (3), concentraciones (3%, 5% y 8%, tomado de su relación 1:1), del extracto etanólico de Salvia Amarga en medio de cultivo PDA. Adicionalmente, se incluyó un tratamiento con alcohol de 96° como control de solvente y un fungicida químico (Myclobutanil), como control positivo, disueltos a una concentración del 8% de su composición y de su dosis comercial (100 g/200 lt), en medios de cultivo PDA respectivamente, junto a un testigo absoluto, al cual no se le agrego solvente alguno. En la Tabla 10, se presenta el diseño experimental, el cual se realizó mediante 10 repeticiones por tratamiento, para un total de 60 cajas de Petri evaluadas.

Tabla 10

Diseño experimental, crecimiento de C. lindemuthianum en difusión agar

TTO	Medio de cultivo	Concentración (%)
T1	PDA + Extracto etanólico de Salvia Amarga	3%
T2	PDA + Extracto etanólico de Salvia Amarga	5%
T3	PDA + Extracto etanólico de Salvia Amarga	8%
T4	PDA + Myclobutanil (Dosis comercial: 100 g/200 lt)	0,1 mg/200 ml
T5	PDA + Etanol 96°	8%
T6	PDA sin aplicación (Testigo)	-

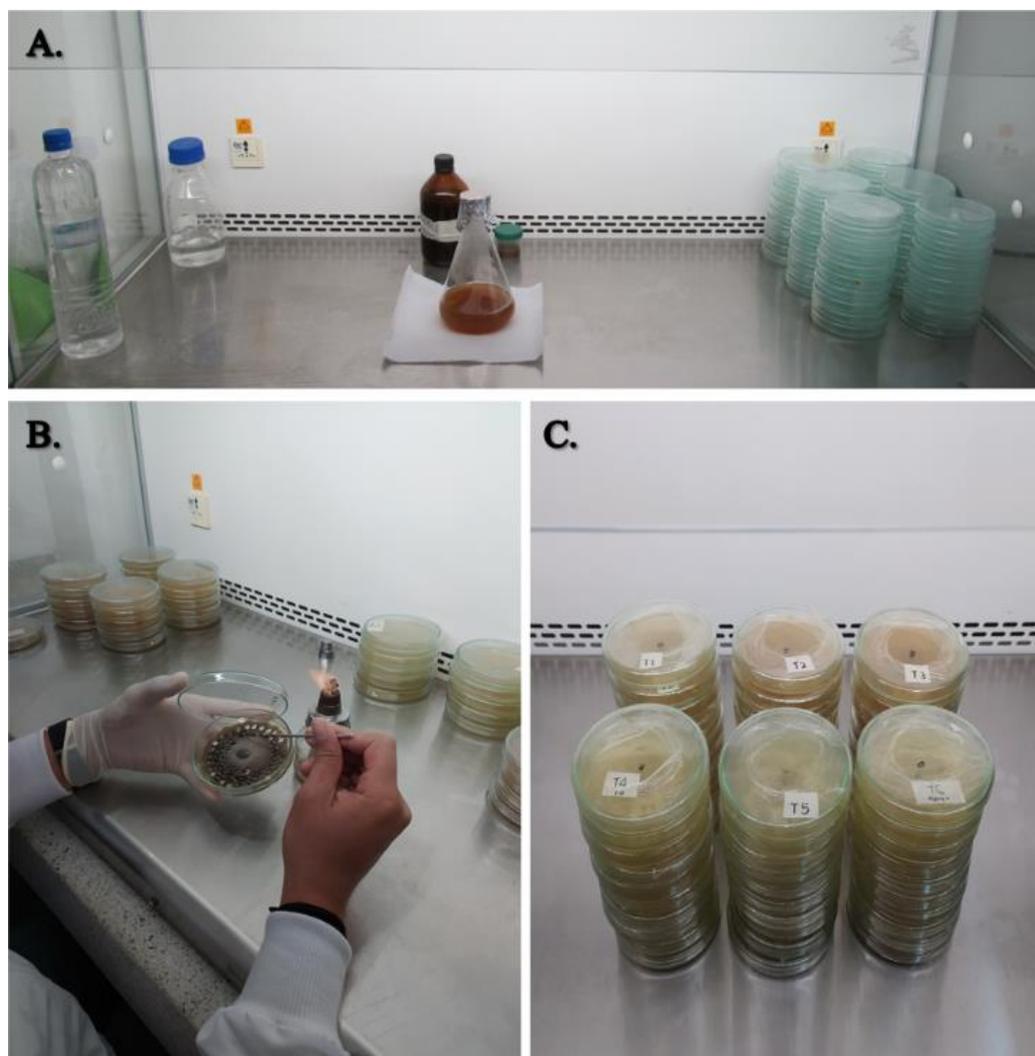
Fuente: (Miranda, 2023)

Esta metodología se realizó en cámara de flujo laminar como se observa en la Figura 11. Los tratamientos se mezclaron con el medio de cultivo PDA a una temperatura de 40 °C y se

adicionaron posteriormente a las cajas de Petri. Después de 24 horas de solidificación se tomó un disco de micelio de 0.5 cm de diámetro, de la cepa del hongo *C. lindemuthianum*, colocándolo en el centro de cada uno de los tratamientos; por último, fueron llevados a la incubadora a 22 °C para mantener las condiciones óptimas de crecimiento.

Figura 11

Prueba de inhibición del crecimiento de C. lindemuthianum en difusión agar



Fuente: (Miranda, 2022), A). Preparación de los tratamientos en medio de cultivo PDA; B). Inoculación de las cajas de Petri con *C. lindemuthianum*; C). Cajas de Petri con cada tratamiento.

Posteriormente, se realizaron ocho (8), observaciones durante un lapso de 18 días (Anexos 3 y 4). La efectividad de los tratamientos, se evaluó a partir del CDM tomado del inóculo sembrado inicialmente, hacia los bordes de la caja de Petri; las observaciones se realizaron en centímetros (cm), con una frecuencia de 3 días por semana, hasta que el testigo cubriera el 100% de la caja de Petri. Se calculó el porcentaje de inhibición micelial (PIM), por cada día observado, basándose en la fórmula propuesta por Pandey et al. (1982).

$$PIM = \frac{dc - dt}{dc - dd} \times 100$$

Dónde: (dc), es igual al diámetro de la colonia del control, (dt), es igual al diámetro de la colonia observado en cada tratamiento y (dd), es la constante de 5 mm del disco de micelio. Adicionalmente los datos obtenidos se analizaron estadísticamente mediante análisis de varianza y comparación de medias por medio del programa estadístico InfoStat versión 2020 (Anexo 5).

3.4.4.2 Inhibición de la germinación y recolonización de *C. lindemuthianum*

Se evaluó el efecto inhibitor del extracto etanólico de Salvia Amarga, sobre la germinación de las esporas y la recolonización del micelio de *C. lindemuthianum*, en cada una de los tratamientos de acuerdo al protocolo de pruebas de eficacia del laboratorio de sanidad vegetal.

Para la evaluación de germinación de las esporas, se preparó una suspensión aproximada de 1.76×10^6 conidias/ml, a partir de *C. lindemuthianum* con 14 días de crecimiento en PDA. Se adicionó 1 ml de la suspensión de esporas en cada uno de los tubos falcón, con 3 ml de la suspensión de cada tratamiento (Tabla 11), se agitó por 1 minuto y posteriormente se esparció 1 ml de la suspensión sobre la superficie de la caja de Petri con medio de cultivo PDA con la

ayuda de un asa redonda, como se observa en la Figura 12. Se realizaron 3 repeticiones por tratamiento, para un total de 18 cajas de Petri evaluadas.

Tabla 11

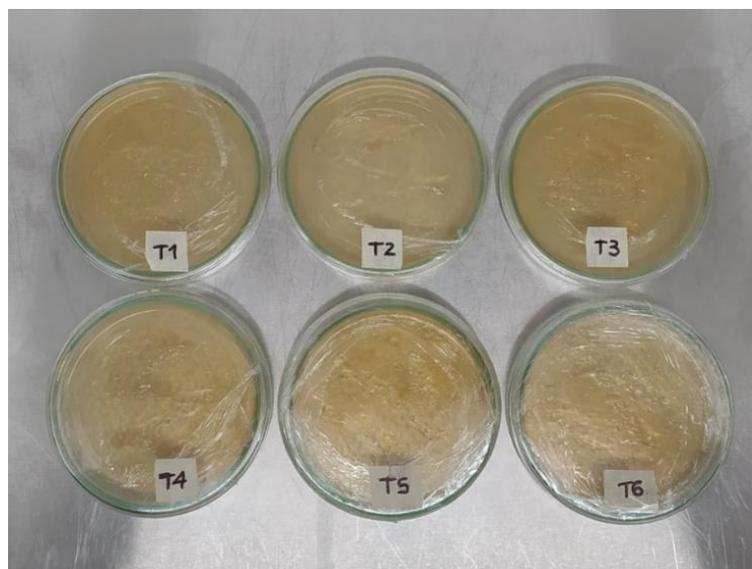
Tratamientos evaluados en el ensayo de germinación de C. lindemuthianum

TTO	Contenido	Concentración (%)
T1	Extracto etanólico de Salvia Amarga	3%
T2	Extracto etanólico de Salvia Amarga	5%
T3	Extracto etanólico de Salvia Amarga	8%
T4	Myclobutanil (Dosis comercial: 100 g/200 lt)	0,1 mg/200 ml
T5	Etanol 96°	8%
T6	Testigo	-

Fuente: (Miranda, 2023)

Figura 12

Prueba de germinación de C. lindemuthianum



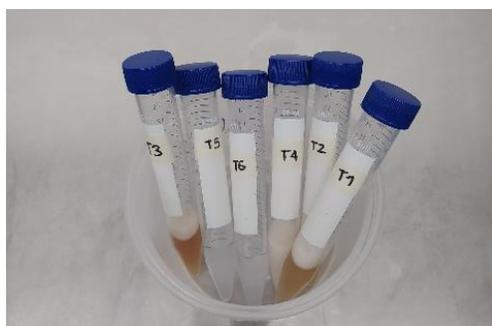
Fuente: (Miranda, 2022)

Para la evaluación de la recolonización del micelio, se prepararon en tubos falcón suspensiones de 3 ml con agua destilada estéril con cada uno de los tratamientos evaluados (Figura

14). Luego, por cada tratamiento a evaluar se tomaron 3 cajas de Petri con *C. lindemuthianum* de 14 días de crecimiento en medio de cultivo PDA y se realizó una aplicación superficial de cada suspensión con un asa redonda en un patrón de Zigzag, como se observa en la Figura 14, para un total de 18 cajas de Petri evaluadas.

Figura 13

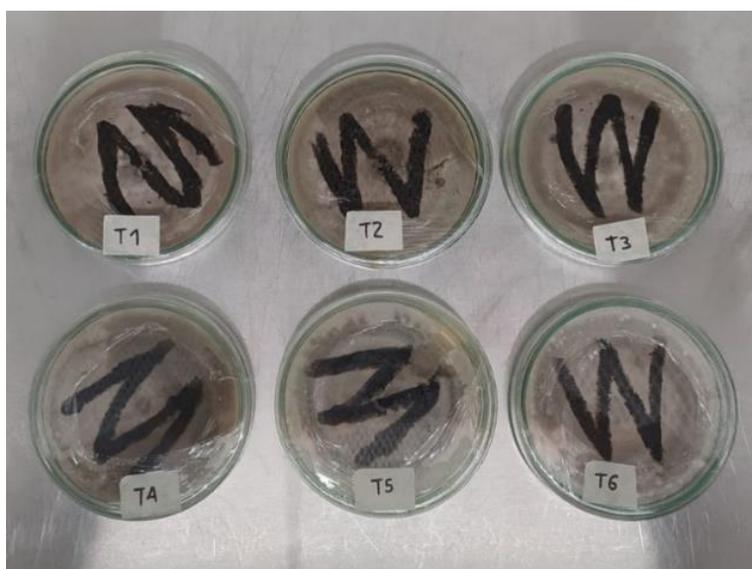
Suspensiones en agua destilada esteril de cada uno de los tratamientos



Fuente: (Miranda, 2022)

Figura 14

Prueba de recolonización de las esporas de C. lindemuthianum



Fuente: (Miranda, 2022)

Después de aplicado los tratamientos en cada una de las pruebas, las cajas de Petri fueron llevadas a la incubadora a 22 °C, para mantener las condiciones óptimas de crecimiento.

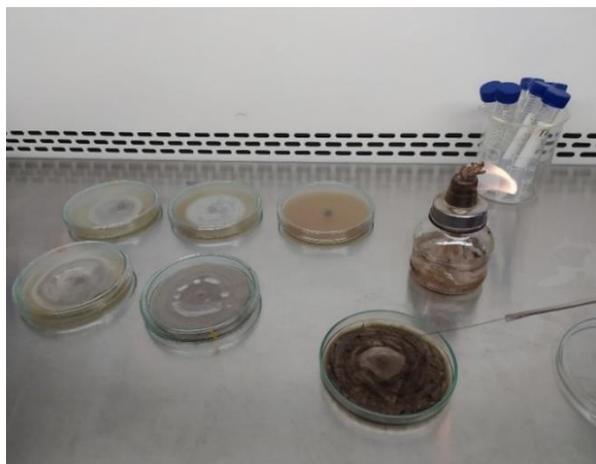
Posteriormente a las 12, 24 y 48 horas se realizaron observaciones microscópicas en cada uno de los tratamientos, para determinar la actividad inhibitoria del extracto de Salvia Amarga, sobre la germinación y recolonización de las esporas de *C. lindemuthianum*.

3.4.4.3 Inhibición de la esporulación de C. lindemuthianum

Para la cuantificación de la inhibición de la esporulación, se tomaron colonias *C. lindemuthianum* de 14 días de crecimiento en medio de cultivo PDA con los tratamientos evaluados (Tabla 9). A cada uno de los tratamientos se le removió con un asa redonda las esporas y se colectaron en 10 ml de agua estéril destilada como se observa en la Figura 15; se agito por 1 minuto y se determinó microscópicamente la concentración de esporas por mililitro (Anexo 6), utilizando la cámara de Neubauer.

Figura 15

Preparacion de las suspensiones de conidias de C. lindemuthianum



Fuente: (Miranda, 2022)

La cantidad de esporas se calculó empleando la expresión propuesta por Cell Culture Manual (2008):

$$N = n \times 10000$$

Donde: (N) es el número de conidias, (n) es el número de conidias contadas en el área del hemocitómetro y (10000) es el factor de conversión a mililitros. El porcentaje de inhibición de las esporas (PIE) se calculó usando la formula anterior de (PIM), ajustando a cantidad de esporas (Araújo et al., 2008).

$$PIE = \frac{cec - cet}{cec} \times 100$$

Donde: (cec) es la cantidad de esporas del control y (cet) es la cantidad de esporas de los tratamientos.

4. Resultados y discusión

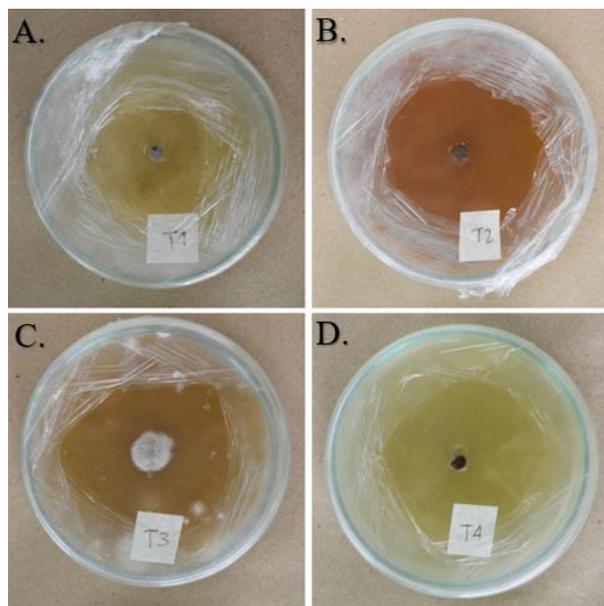
4.1 Fase I: Extractos vegetales

4.1.1 Prueba de la acción inhibitoria de los extractos vegetales de *Salvia Amarga*

Las cajas de Petri luego de 4 días de incubación, comenzaron a presentar cambios diferenciales en el crecimiento micelial. El tratamiento 3, fue el único tratamiento que presentó crecimientos de microorganismos contaminantes (hongos), junto al crecimiento de *C. lindemuthianum* (Figura 16). En los demás tratamientos evaluados no se presentó contaminación y el crecimiento de *C. lindemuthianum* fue incipiente, a diferencia del tratamiento 2, en el cual no se observó microscópicamente crecimiento micelial.

Figura 16

Crecimiento micelial de C. lindemuthianum despues de 4 días, en cada tratamiento



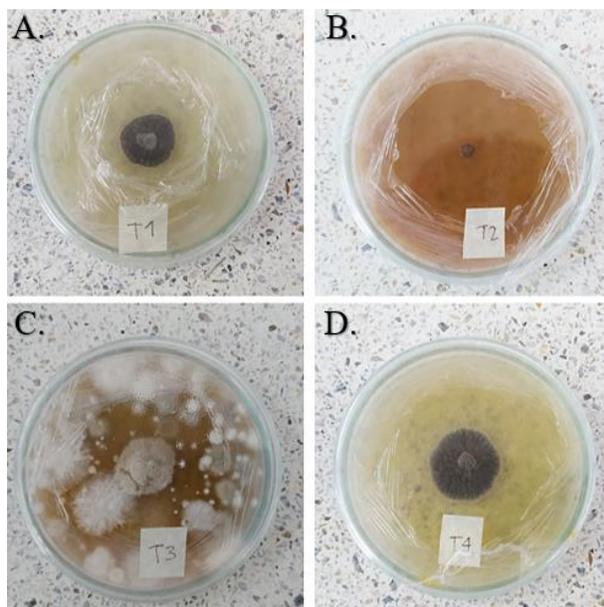
Fuente: (Miranda, 2022), A). T1 (PDA + trementina); B). T2 (PDA + extracto etanólico de *Salvia Amarga*); C). T3 (PDA + extracto acuoso de *Salvia Amarga*); D). T4 (PDA + extracto vegetal de *Salvia Amarga*, con trementina).

La contaminación observada en el tratamiento 3, posiblemente puede ser atribuida a la presencia de microorganismos en el tejido de la planta, los cuales, durante el proceso de elaboración del extracto vegetal de Salvia Amarga, se mezclaron con el solvente (agua), el cual no ejerce ninguna propiedad desinfectante sobre él y por lo tanto los microorganismos sobreviven en la solución del extracto. Este resultado concuerda con las observaciones de Hernández et al. (2010), donde afirman que el estado sanitario del material vegetal, influye en el resultado final de la calidad del extracto y de las pruebas *in vitro*.

En la Figura 17, se observa el comportamiento de los tratamientos de *C. lindemuthianum* después de 12 días de sembrado en las cajas de Petri. Los tratamientos 1, 3 y 4 presentaron crecimiento micelial, en contraste con el tratamiento 2. Los valores promedio del diámetro micelial de *C. lindemuthianum*, en cada tratamiento, se observan en la Figura 18.

Figura 17

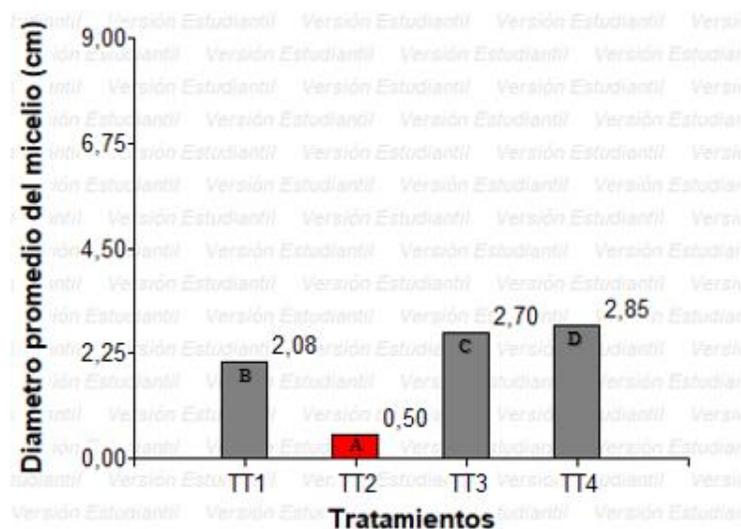
Crecimiento micelial de C. lindemuthianum después de 12 días, en cada tratamiento



Fuente: (Miranda, 2022), A). T1 (crecimiento micelial); B). T2 (inhibición del crecimiento micelial), C). T3 (contaminación con microorganismos); D). T4 (crecimiento micelial).

Figura 18

Promedio de los diámetros en (cm) del micelio en cada tratamiento (Fase I)



Fuente: (Miranda, 2023), Nota: letras iguales no presentan diferencia significativa al 5% (Tukey).

Con respecto a los tratamientos 1 y 4, no demostraron inhibición sobre *C.*

lindemuthianum; el efecto de la trementina tuvo diferencias significativas, al aplicarse puro, en comparación como solvente en el extracto de Salvia Amarga. Este resultado concuerda con las observaciones de Gallo et al. (2014) donde los componentes de este solvente, presentan varios procesos bioquímicos de oxidación que pueden suprimir o modificar las propiedades del soluto, en este caso, los metabolitos de Salvia Amarga, que permiten la inhibición sobre *C.*

lindemuthianum.

En el tratamiento 3, no se observó ningún efecto inhibitorio por parte del extracto acuoso de Salvia Amarga; este resultado concuerda con los resultados de Cowan (1999) y Rodríguez et al. (2012); (2018), donde los resultados desfavorables encontrados, pueden deberse a la polaridad del solvente agua, y a la capacidad del mismo para disolver y extraer de los tejidos los diferentes compuestos químicos de los metabolitos secundarios que poseen las propiedades antifúngicas.

Por último, el tratamiento 2 (extracto etanólico de Salvia Amarga), presentó una inhibición total del fitopatógeno *C. lindemuthianum*, ya que el valor de 0.5 cm observado en la Figura 19, corresponde al diámetro inicial del disco de micelio sembrado en la caja de Petri. El alcohol de 96° en la proporción 1:1 (solvente/material vegetal), permitió el mejor rendimiento de extracción de metabolitos de los tejidos en la fase líquida que pueden inhibir a *C. lindemuthianum*.

Estos resultados coinciden con las observaciones de Castro et. al (2003), donde subrayan que el empleo de soluciones etanólicas, favorecen la extracción y conservación de los metabolitos secundarios, en comparación con los extractos acuosos. Adicionalmente el etanol tiene un efecto desinfectante que permite eliminar microorganismos contaminantes provenientes del tejido vegetal y del proceso de extracción.

4.2 Fase II: Dosis mínima inhibitoria

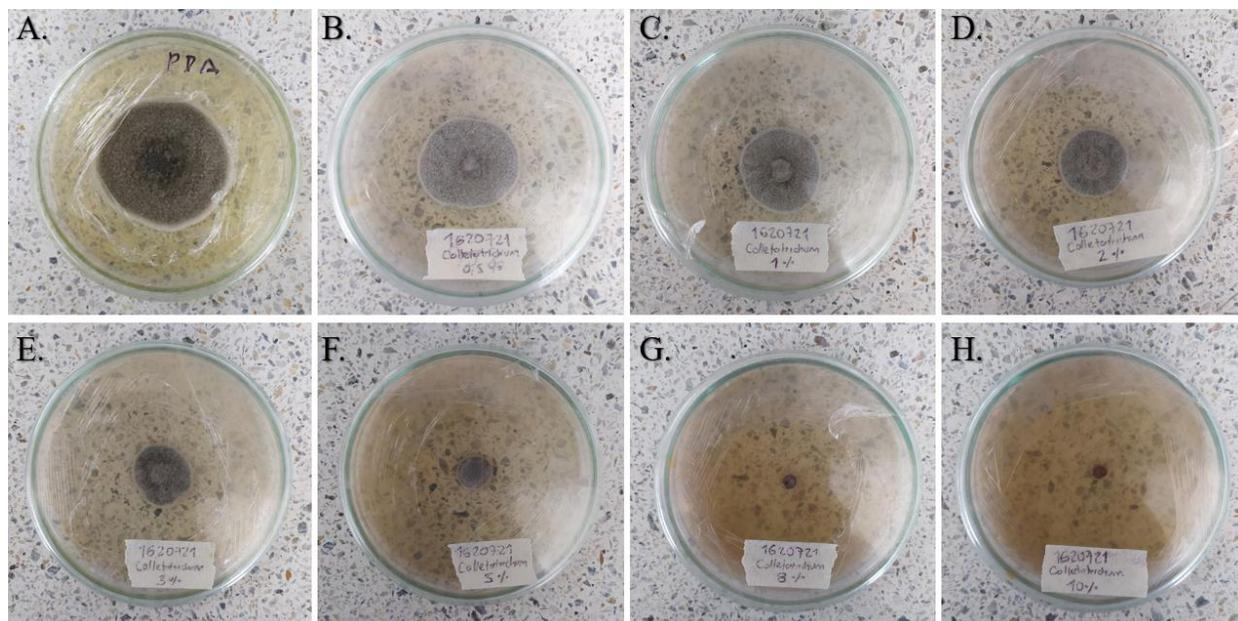
4.2.1 Prueba de dosis mínima inhibitoria del extracto etanólico de Salvia Amarga

Se observó el comportamiento de *C. lindemuthianum* después de ocho (8), días de sembrado en las cajas de Petri, donde el tratamiento 1 (testigo), tuvo un crecimiento micelial, habitual en medio de cultivo PDA, en comparación con los resultados de inhibición expresados con las concentraciones de los demás tratamientos (desde 0.5% hasta 10%).

Los tratamientos 7 y 8, con una concentración del 8% y 10 % respectivamente, presentaron los mejores resultados de inhibición, ya que no se observó crecimiento alguno, aparte del disco de micelio sembrado inicialmente; el cual permaneció con el mismo diámetro inicial de 0,5 cm (Figura 19).

Figura 19

Crecimiento micelial de C. lindemuthianum despues de 8 días, en cada tratamiento



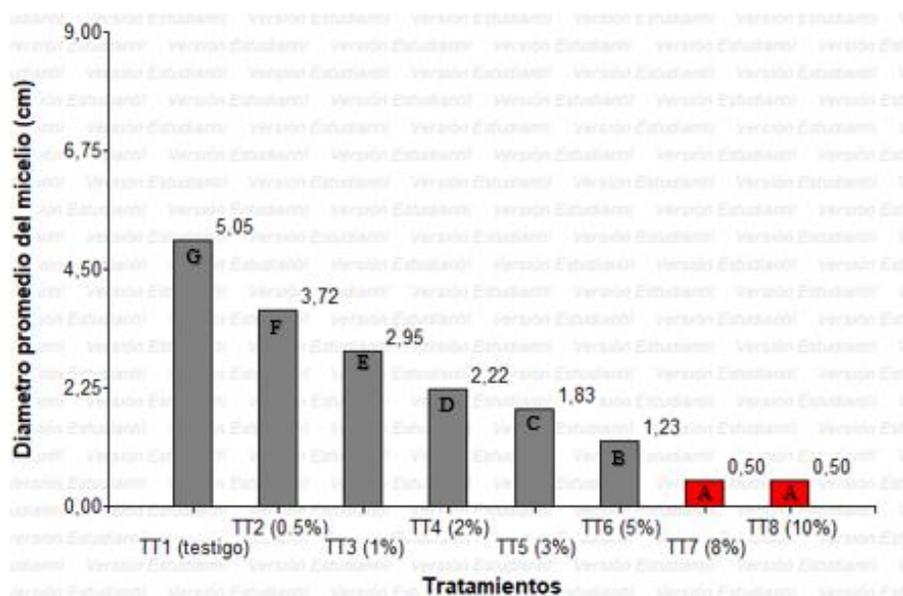
Fuente: (Miranda, 2022), A). T1 (testigo); B). T2 (0.5%); C). T3 (1%); D). T4 (2%), E). T5 (3%), F). T6 (5%); G). T7 (8%); H). T8 (10%).

La aplicación del extracto etanólico de Salvia Amarga, inhibe totalmente el crecimiento del hongo *C. lindemuthianum*, a partir de una concentración del 8%. Este valor de concentración es menor a los reportados con otros extractos etanólicos, como el caso de Contreras et. al (2015), donde la dosis mínima inhibitoria del EE de *Schinus molle*, en el control del hongo *Lasiodiplodia theobromae*, es como mínimo del 30%. Es importante tener en cuenta que ambos hongos pertenecen a la división Ascomycetes, por lo tanto, la composición del extracto etanólico de Salvia amarga, puede contener mejores concentraciones de metabolitos secundarios para la inhibición de este tipo de microorganismos que, la especie *S. molle*.

Además, en la Figura 20, se observa que, incluso la menor concentración evaluada del extracto etanólico de Salvia Amarga, tuvo un efecto inhibitor en el crecimiento micelial del hongo *C. lindemuthianum*, ya que el tratamiento 2 (concentración de 0.5 %), logró reducir en 1,33 cm el CDM en comparación con el tratamiento 1 (testigo), que presentó el mayor diámetro de crecimiento de este microorganismo en medio de cultivo PDA a los 8 días.

Figura 20

Promedio de los diámetros en (cm) del micelio en cada tratamiento (Fase II)



Fuente: (Miranda, 2023), Nota: letras iguales no presentan diferencia significativa al 5% (Tukey).

Afirmando así, que se obtuvo la mayor inhibición en el crecimiento micelial de *C. lindemuthianum*, a medida que se aumentó la concentración del extracto de Salvia Amarga. Según Sharma et al., (2006); Rojas et al., (2005); y Bettiol et al., (2014), esto se debe a que los metabolitos secundarios de algunas plantas, presentan una estimulación biológica sobre algunos hongos fitopatógenos a mayor concentración del extracto, actuando de manera más eficiente sobre las hifas de los micelios, provocando la salida de los componentes del citoplasma, la

pérdida de rigidez y la integridad de la pared celular de las hifas, dando lugar a su colapso y a la muerte del micelio, lo cual se ve reflejado desde, un efecto fungistático, hasta un efecto fungicida, en el cual se logra la inhibición total del hongo.

4.3 Fase III: Actividad antifúngica

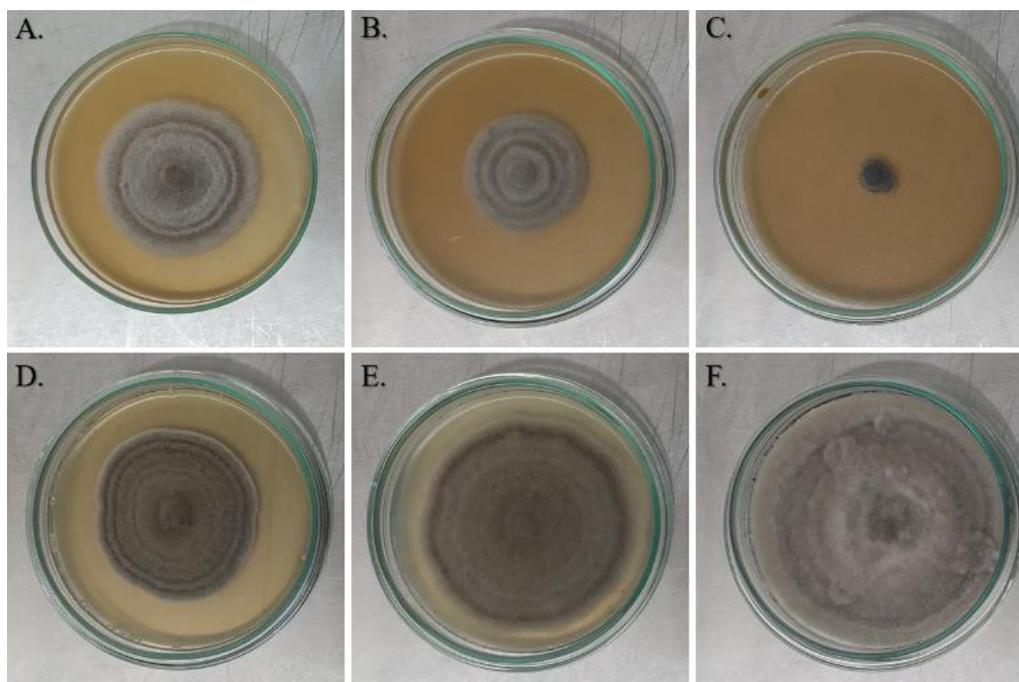
4.2.1 Inhibición del crecimiento de C. lindemuthianum

El crecimiento micelial final de *C. lindemuthianum* luego de 18 días, se observa en la Figura 21, donde se destaca la inhibición del hongo con el tratamiento 3 en comparación al tratamiento 4 (Myclobutanil) y al tratamiento 6 (testigo), donde el primero inhibió en menor grado y el segundo creció cubriendo el diámetro total de la caja de Petri. En la Figura 22, se observa igualmente el comportamiento de los valores promedio del diámetro de crecimiento micelial de *C. lindemuthianum* en cada tratamiento, durante las ocho (8), observaciones realizadas en los 18 días del experimento.

Los tratamientos demostraron efectos fungicidas y/o fungistáticos, a partir de la inhibición del crecimiento del diámetro micelial de *C. lindemuthianum*, con relación al transcurso del tiempo. En la 1^{ra} observación (2 días después), todos los tratamientos presentaron crecimiento micelial con excepción del tratamiento 3; este tratamiento presentó acción fungicida, con una residualidad de 9 días, en el cual el disco de micelio de 0,5 cm permaneció igual al inicio de la prueba. Luego de este tiempo, solo llegó a alcanzar un crecimiento micelial de 0,16 cm, después de 18 días. Cabe destacar, que los tratamientos 1 y 4, mantuvieron resultados homogéneos entre sí a partir de la 2^{da} observación (4 días después). Los tratamientos 5 y 6 presentaron los mayores valores de crecimiento en comparación con los demás tratamientos (Figura 22).

Figura 21

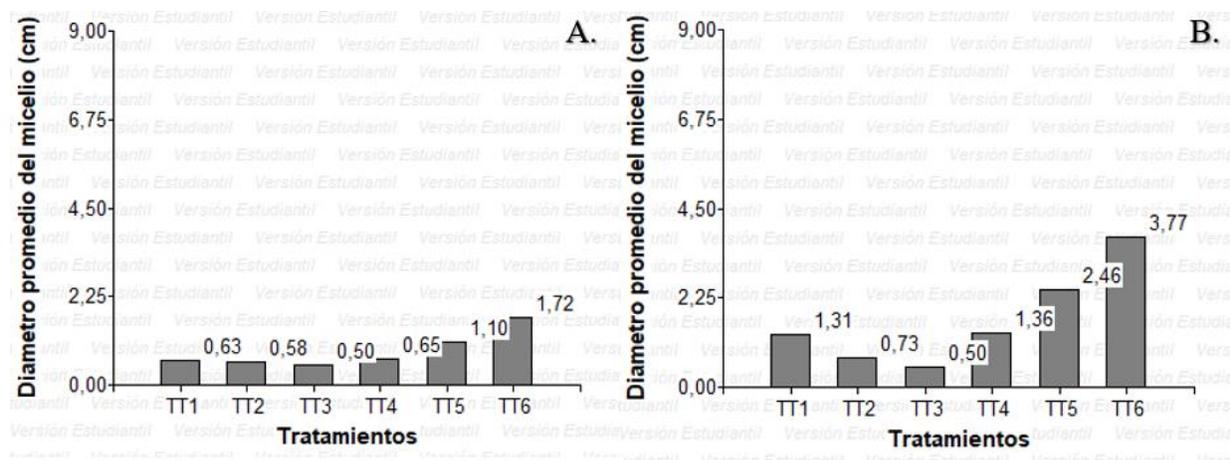
Observación final de los tratamientos luego de 18 días de sembrado el hongo *C. lindemuthianum*

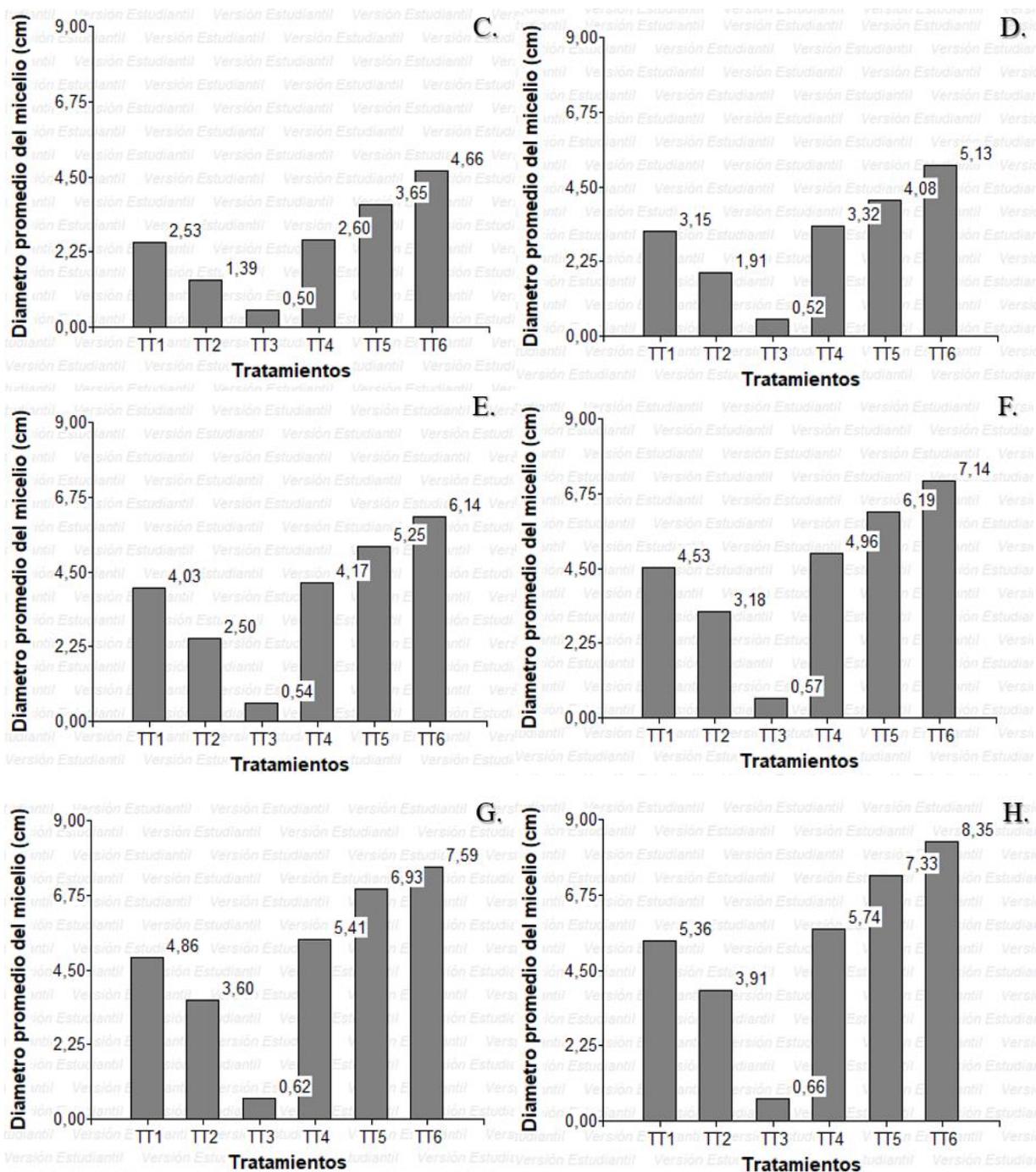


Fuente: (Miranda, 2022), A). T1 (PDA + extracto etanólico de Salvia Amarga 3%); B). T2 (PDA + extracto etanólico de Salvia Amarga 5%); C). T3 (PDA + extracto etanólico de Salvia Amarga 8%); D). T4 (PDA + Myclobutanil), E). T5 (PDA + etanol 96°), F). T6 (testigo).

Figura 22

Graficas del crecimiento del diámetro del micelio (CDM), durante el transcurso de 18 días





Fuente: (Miranda, 2023), A). 1^{ra} observación (2 días); B). 2^{da} observación (4 días); C). 3^{ra} observación (7 días); D). 4^{ta} observación (9 días); E). 5^{ta} observación (11 días); F). 6^{ta} observación (14 días); G). 7^{ma} observación (16 días). H). 8^{va} observación (18 días).

Los porcentajes de inhibición micelial (PIM), fueron registrados en la Tabla 12, indicando la efectividad de cada uno de los tratamientos, en comparación con el crecimiento habitual de *C. lindemuthianum*, en medio de cultivo PDA (tratamiento 6). Estos valores se representaron gráficamente en la Figura 23, mostrando el comportamiento de la inhibición de *C. lindemuthianum*, con los distintos tratamientos en el transcurso del tiempo evaluado.

Tabla 12

Porcentaje de inhibición micelial (PIM), en cada observación de los distintos tratamientos

TTO	% Porcentaje de inhibición micelial (PIM)							
	1 ^{ra} (2 días)	2 ^{da} (4 días)	3 ^{ra} (7 días)	4 ^{ta} (9 días)	5 ^{ta} (11 días)	6 ^{ta} (14 días)	7 ^{ma} (16 días)	8 ^{va} (18 días)
T1	89 % ^{AB}	75 % ^C	51 % ^C	43 % ^C	37 % ^C	39 % ^C	39 % ^C	38 % ^C
T2	93 % ^{AB}	93 % ^B	79 % ^B	70 % ^B	65 % ^B	60 % ^B	56 % ^B	57 % ^B
T3	100 % ^A	100 % ^A	100 % ^A	100 % ^A	99 % ^A	99 % ^A	98 % ^A	98 % ^A
T4	88 % ^B	74 % ^C	50 % ^C	39 % ^C	35 % ^C	33 % ^C	31 % ^C	33 % ^C
T5	51 % ^C	40 % ^D	24 % ^D	23 % ^D	16 % ^D	14 % ^D	9 % ^D	13 % ^D
T6	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %	0 %

Fuente: (Miranda, 2023), Nota: letras iguales no presentan diferencia significativa al 5% (Tukey).

Los PIM, obtenidos en los tratamientos 1, 2 y 3 a partir de las concentraciones de 3%, 5% y 8% del extracto etanólico de *T. fruticans* respectivamente, demostraron un mayor control en el crecimiento de *C. lindemuthianum*, en comparación con los demás tratamientos (Tabla 12). Lo cual, permite afirmar que la actividad antifúngica de cada tratamiento evaluado, mantiene una relación con el tipo de control y su concentración. Esto concuerda con los estudios de Ayala et al. (2008) y Ochoa et al. (2011), donde encontraron que los extractos de *Cinnamomum zeylanicum* y *Annona cherimola*, inhiben el crecimiento micelial del hongo *Alternaria alternata*, precisando un incremento en la inhibición, al aumentarse la concentración del extracto.

El tratamiento 3, obtuvo los mejores resultados, logrando un mayor control en el crecimiento del hongo *C. lindemuthianum*; con una concentración del 8% del extracto etanólico de Salvia Amarga. Alcanzando un 98% de inhibición micelial, debido a que el disco de micelio de 0,5 cm sembrado inicialmente en la caja de Petri, solo logró un aumento en el CDM de 0,16 cm, luego de 18 días. Estos resultados se asemejan a los obtenidos por Bolívar et al. (2009) y Velásquez et al. (2014), donde determinaron la inhibición del 100% del crecimiento de los hongos *Colletotrichum gloeosporioides* y *Penicillium spp*, por medio de la aplicación *in vitro* de extractos vegetales de *Lippia origanoides* y *Citrus reticulata*, plantas reconocidas por sus propiedades antifúngicas, provenientes de sus metabolitos secundarios.

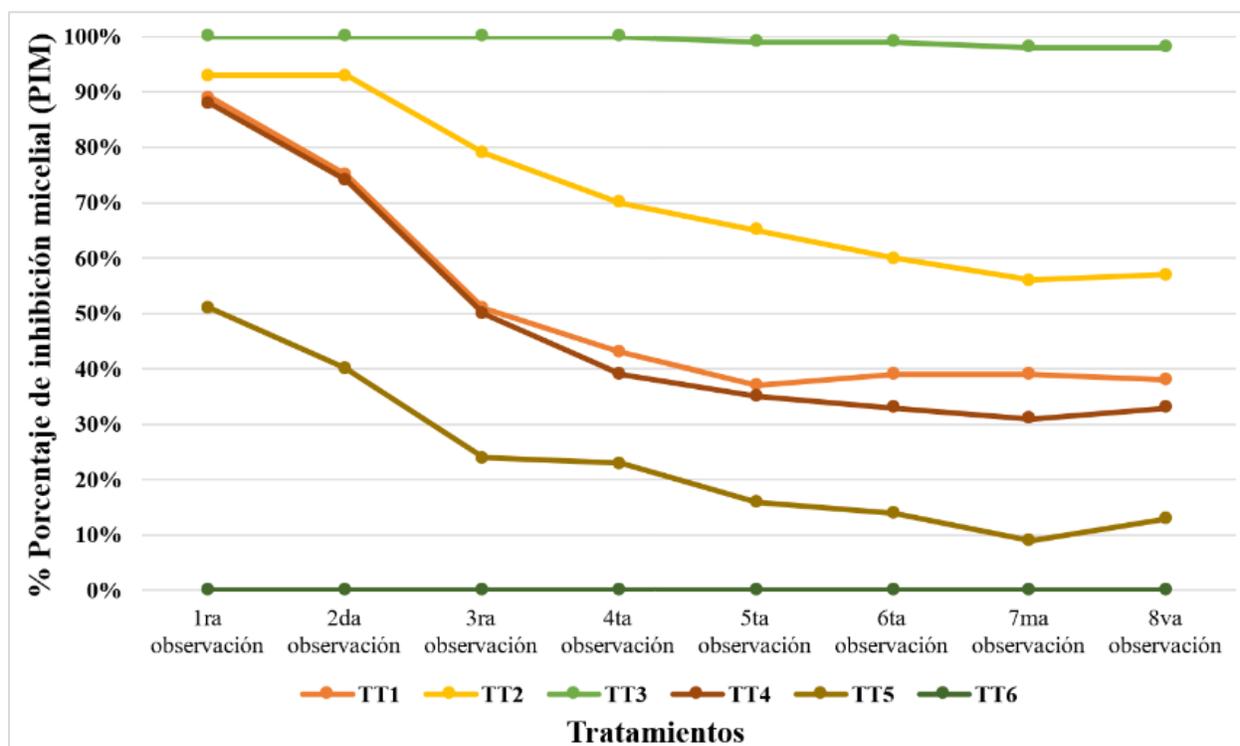
Sin embargo, el tratamiento 1 (3% del extracto etanólico de Salvia Amarga), obtuvo un PIM del 38%, siendo este valor superior al tratamiento 4 (Myclobutanil), el cual obtuvo un PIM de 33%. Esta diferencia demuestra que los metabolitos que contiene el extracto de Salvia Amarga poseen un mayor efecto sobre *C. lindemuthianum*, a diferencia de la molécula química Myclobutanil, utilizada frecuentemente para el control de este hongo fitopatógeno. Estos resultados concuerdan con la investigación de Carrero et. al (2003), donde encontraron que, la molécula química del fungicida Myclobutanil, mostró escasa o ninguna capacidad de inhibición en el crecimiento y esporulación *in vitro* del hongo fitopatógeno *Botrytis cinérea*.

Al igual que los resultados del tratamiento 5 (control del solvente), el cual manifestó escasa o ninguna capacidad de inhibición en el crecimiento micelial de *C. lindemuthianum*. El comportamiento del hongo en este tratamiento, fue muy parecido al tratamiento 6 (testigo), por lo tanto, se podría afirmar que, la presencia del alcohol como solvente no influye directamente en la actividad antifúngica expresada por los metabolitos secundarios del extracto etanólico de

Salvia Amarga, sino que, favorece a la extracción de los metabolitos secundarios y la conservación de las propiedades antifúngicas en la solución (Rodríguez et. al, 2018).

Figura 23

Representación grafica del comportamiento del (PIM), en cada observación



Fuente: (Miranda, 2023)

Los tratamientos demostraron una disminución en el porcentaje de inhibición micelial (PIM) de *C. lindemuthianum*, manifestando efectos fungistáticos y/o fungicidas, con relación al transcurso del tiempo. Este comportamiento se relaciona con la investigación de Álzate et al. (2009), donde observaron una tendencia general en la disminución de la capacidad de inhibición micelial de *Colletotrichum acutatum*, por parte del fungicida Mancozeb y de los extractos vegetales de *Thymus vulgaris* y *Cymbopogon citratus*, al avanzar el tiempo de exposición.

4.2.2 Inhibición de la germinación y recolonización de *C. lindemuthianum*

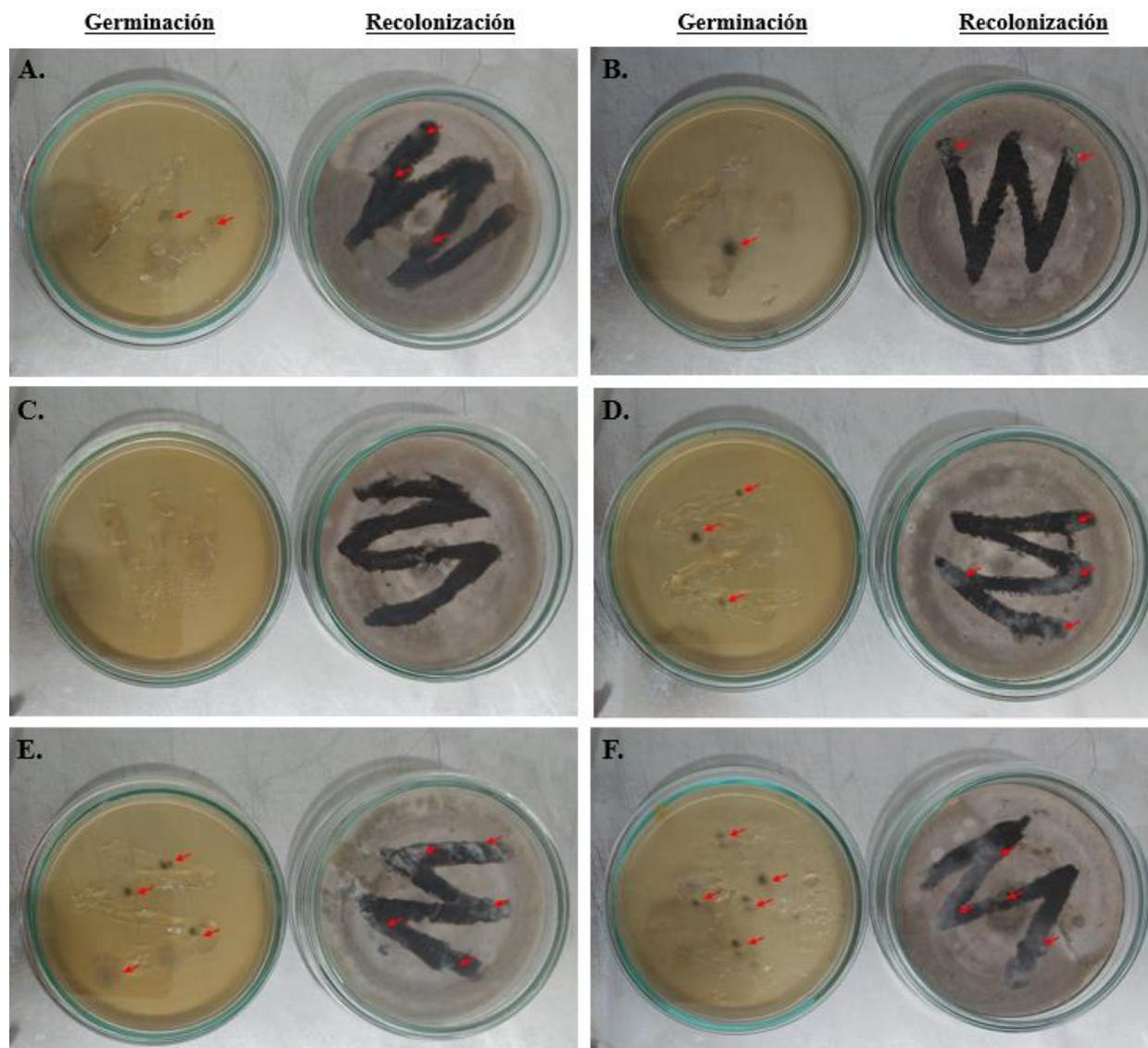
La germinación de esporas se produjo en todos los tratamientos, con excepción de la inhibición por parte del tratamiento 3 (concentración del 8% del extracto etanólico de Salvia Amarga), el cual contenía una suspensión de esporas de 1.76×10^6 conidias por mililitro de *C. lindemuthianum*, junto a una suspensión del extracto etanólico de *T. fruticans* a una concentración del 8%.

Igualmente, el tratamiento 3, logro inhibición total en la recolonización del micelio, a diferencia de los demás tratamientos, los cuales expresaron crecimiento micelial luego de la aplicación de cada solución en agua destilada estéril, sobre la superficie de la colonia de *C. lindemuthianum*, de 16 días de crecimiento. Además, que las propiedades antifúngicas expresadas por el extracto de Salvia Amarga, actuaron en soluciones líquidas y en medios de cultivo, inhibiendo el crecimiento de estructuras reproductivas (conidios), así como, el crecimiento y desarrollo micelial de *C. lindemuthianum*.

Según cada una de las pruebas, los tratamientos 1 y 2, los cuales, contenían el extracto etanólico de Salvia Amarga en concentraciones del 3% y 5% respectivamente, desarrollaron nuevas esporas y colonias de micelio, en una proporción menor, en comparación con los demás tratamientos evaluados (Figura 24). Estos resultados mantuvieron un comportamiento similar, con la prueba anterior, del crecimiento micelial y el porcentaje de inhibición, al igual, concuerda con las investigaciones de López et. al (2006) y Velásquez et. al (2014), donde los porcentajes de inhibición de la germinación y recolonización de los hongos *Colletotrichum musae*, *Botrytis cinérea*, *Penicillium digitatum* y *P. italicum*, fueron altos, obteniendo resultados favorables con la aplicación de extractos y aceites esenciales de especies vegetales.

Figura 24

Observación de la germinación y recolonización del hongo *C. lindemuthianum*, luego de 48 horas



Fuente: (Miranda, 2022), A). TTOS 1 (Extracto etanólico de *T. fruticans* 3%); B). TTOS 2 (Extracto etanólico de *T. fruticans* 5%); C). TTOS 3 (Extracto etanólico de *T. fruticans* 8%); D). TTOS 4 (Myclobutanil), E). TTOS 5 (Etanol 96°), F). TTOS 6 (testigo).

4.2.3 Inhibición de la esporulación de *C. lindemuthianum*

En todos los tratamientos (Tabla 13), se observó la presencia de conidias a nivel microscópico de *C. lindemuthianum*, presentando en los tratamientos 5 y 6 los valores de mayor concentración. El porcentaje más alto de inhibición de esporas, se obtuvo con el tratamiento 3 (concentración del 8% del extracto etanólico de Salvia Amarga), con un 99,9%. Estos resultados de inhibición tan altos en pruebas *in vitro* no son raros de encontrar; ya que estudios similares como el reportado por Moo-koh et al. (2014), obtuvieron una inhibición completa (100%) en la esporulación de las conidias del hongo *Curvularia verruculosus* utilizando el extracto de *Bonellia flammea*.

Por el contrario, el valor de inhibición del 67% obtenido en el tratamiento 4, se puede relacionar directamente con el estudio de Carrero et. al (2006), donde se evaluó la aplicación de la molécula química Myclobutanil (fungicida), sobre el hongo de la clase Ascomycetes: *Botrytis cinérea*, y donde se encontró una baja eficiencia en el control, debido a no hubo inhibición en la esporulación en la dosis comercial, permitiendo la presencia abundante de conidios y conidióforos.

Tabla 13

Concentración y porcentaje de inhibición de las esporas de C. lindemuthianum

TTO	Concentración (Conidias/mililitro)	Porcentaje de inhibición (%)
T1	5,9 x10 ⁵	97 %
T2	2,0 x10 ⁵	99 %
T3	4,0 x10 ⁴	99,9 %
T4	6,3 x10 ⁶	67 %
T5	1,2 x10 ⁷	37 %
T6	1,9 x10 ⁷	0 %

Fuente: (Miranda, 2023)

Conclusiones

- El uso de alcohol 96° como solvente, favorece la extracción y conservación de los metabolitos secundarios con características antifúngicas de la planta Salvia Amarga (*T. fruticans*).
- Se determinó que el extracto etanólico de Salvia Amarga tiene efecto inhibitorio *in vitro* sobre el hongo *C. lindemuthianum*.
- La dosis mínima inhibitoria para controlar *in vitro* a *C. lindemuthianum*, con un extracto etanólico de Salvia Amarga es del 8%.
- Se encontró que las concentraciones del extracto etanólico de Salvia Amarga, presentan *in vitro* mayor efecto inhibitorio sobre el hongo *C. lindemuthianum*, que el tratamiento químico (Myclobutanil), empleado para el control del fitopatógeno en la región nortesantandereana.
- Se obtuvo un 98% de inhibición micelial y un 99.9% de inhibición de la esporulación del hongo *C. lindemuthianum*, con el extracto etanólico de Salvia Amarga a una concentración del 8%.
- Con base en los resultados obtenidos, el extracto etanólico de Salvia Amarga, podrá ser tenido en cuenta para realizar pruebas de campo como una alternativa biológica para el control de *C. lindemuthianum*.

Recomendaciones

- Se recomienda realizar una prueba *in vivo*, con el objetivo de comprobar la actividad antifúngica del extracto etanólico de Salvia Amarga (*T. fruticans*), sobre *C. lindemuthianum*, bajo condiciones de producción semi comerciales de frijol.
- Se hace necesario aislar e identificar los compuestos metabolitos secundarios que presenta Salvia amarga, con el objetivo de caracterizar posibles moléculas que permitan su uso en Bioinsumos para el control de hongos.
- Se recomienda realizar experimentos adicionales con el extracto etanólico de Salvia Amarga, con el objetivo de ampliar el rango de microorganismos fitopatógenos que controla.
- Se recomienda evaluar diferentes proporciones y concentraciones (sustrato/solvente), del extracto etanólico de Salvia Amarga, con el fin de determinar un óptimo económico.
- Se recomienda un estudio para la multiplicación *in vitro* de Salvia Amarga, con el propósito de cultivar esta especie y no alterar el ecosistema.

Bibliografía

- Acquaviva, R., Genovese, C., Amodeo, A., Tomasello, B., Malfa, G., Sorrenti, V., Tempera, G., Addamo, A., Ragusa, S., Rosa, T., Menichini, F., & Di Giacomo, C. (2017). Biological activities of *Teucrium flavum* L., *Teucrium fruticans* L., and *Teucrium siculum* rafin crude extracts, *Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology*.
- Agrios, G. N. (2005). *Plant pathology*. Elsevier.
- Ahmet, C., Saban, K., Hamdullah, K., & Ercan, K. (2005). Antifungal properties of essential oil and crude extracts of *Hypericum linarioides* Bosse. *Biochem Syst Ecol.*; 33 (3): 245-256.
- Alzate, O., Mier, M., Afanador, K., Durango, R., & García, P. (2009). Evaluación de la fitotoxicidad y la actividad antifúngica contra *Colletotrichum acutatum* de los aceites esenciales de tomillo (*Thymus vulgaris*), limoncillo (*Cymbopogon citratus*), y sus componentes mayoritarios. *Vitae*, 16(1), 116-125.
- Apablaza, G., Díaz, M., San Martin, R., & Moya, E. (2002). Control de oidio de las cucurbitáceas con saponinas presentes en extractos de quillay (*Quillaja saponaria*). *Ciencia e Investigación Agraria*, 29(2), 83-90.
- Araújo, D., Rodríguez, D., & Sanabria, M. (2008). Respuesta del hongo *Fusarium oxysporum f. sp. cubense*, causante del mal de Panamá, a algunos extractos vegetales y fungicidas. *Revista Fitopatología Venezolana* 21 (1): 2-8.
- Araya, C. & Hernández, J. (2006). Guía para la identificación de las enfermedades del frijón más comunes en Costa Rica. San José, C.R.: MAG.
- Arias, J., Jaramillo, M., & Rengifo, T. (2007). *Manual Buenas Prácticas Agrícolas en la Producción de Frijón Voluble*. FAO. Colombia.

- Avalos, A., & Carril, E. (2009). Metabolismo secundario de las plantas. *Reduca (Biología)* 2 (3): 119-145.
- Ayala, F., Soto, A., González, E., Álvarez, O., & González, G. (2008). Microencapsulation of cinnamon leaf (*Cinnamomun zeylanicum*) and Garlic (*Allium sativum*) oils in β -cyclodextrin. *Journal of Inclusion Phenomena Macrocyclic Chemistry* 60: 359-368.
- Bautista, B., Hernández, L., & Bosque, M. (2004). Growth inhibition of selected fungi by chitosan and plant extracts. *Rev. Mex. Fitopatol.* 22: 178-186.
- Beckerman, J. L. 2013. Detection of Fungicide Resistance. Chapter 11. In: Mizuho Nita (Ed.) *Fungicides – Showcases of Integrated Plant Disease Management from Around the World*. ISBN 978-953-51-1130-6, Publisher: InTech, Chapters published May 15, 2013 under CC BY 3.0 license. pp 281-310
- Bettiol, W., Rivera, M., Mondino, P., Montealegre, J., & Colmenares, Y. (2014). Control biológico de enfermedades de plantas en América Latina y el Caribe. Facultad de Agronomía Universidad de la República, Montevideo. 404 p.
- Boersma, S., Depuydt, D., Vyn, R., & Gillard, C. (2019). Fungicide efficacy for control of anthracnose of dry bean in Ontario. *Crop Protection*.
- Bolívar, K., Sanabria, M., Rodríguez, D., Camacaro, M., Ulacio, D., Cumana, L., & Crescente, C. (2009). Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo in vitro del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. & Sacc. y de la Antracnosis en frutos de mango.
- Calero, A., Quintero, E., Olivera, D., Pérez, Y., Castro, I., Jiménez, J., & López, E. (2018). Respuesta de dos cultivares de frijol común a la aplicación foliar de microorganismos eficientes. *Cultivos Tropicales*, 39(3), 5-10.

- Carmona, M., Reis E., & Sautua, F. (2017). Chapter 9 Sustainable Chemical Control of Main Soybean Diseases in South America 203-245 pp In: Fletcher, B. (Ed). Soybeans: Cultivation, Nutritional Properties and Effects on Health Editors. NOVA. ISBN978-1-63485-866-3.
- Carrero, C., Cedeño, L., Quintero, K., Pino, H., & Rodriguez, L. (2003). Identificación y sensibilidad in vitro a fungicidas del agente causal de la podredumbre del tallo en plántulas de Eucalyptus cinerea en Mérida, Venezuela. *Interciencia*, 28(11), 656-659.
- Castellanos, G., Jara, C., & Mosquera, G. (2016). Guías Prácticas de Laboratorio para el Manejo de Patógenos del Fríjol. CIAT.
- Castro, M. & Gonzáles, R. (2003). Comparación del contenido de compuestos fenólicos en la corteza de ocho especies de pino. *Madera y Bosques*, 9(2), 41-49.
- Catalogue of life, (2019). *Colletotrichum lindemuthianum* (Sacc. & Magnus) Briosi & Cavara, 1889. Annual checklist. En línea: <http://www.catalogueoflife.org/annualchecklist/2019/details/species/>.
- Cavaliere, C., Rea, P., Lynch, M., & Blumenthal, M. (2009). Herbal supplement sales experience slight increase in 2008. *Herbal-Gram* 82: 58-61.
- Cell Culture Manual (2008). 3rd Edition. Sigma Life Science, pp 230-231.
- Ceyhan, N., Keskin, D., & Uğur, A. (2012). Antimicrobial activities of different extracts of eight plant species from four different family against some pathogenic microorganisms.
- Chen, Y., Conner, R., Gillard, C., Boland, G., Babcock, C., Chang, K., Hwang, S., & Balasubramanian, P. (2007). A specific and sensitive method for detection of *Colletotrichum lindemuthianum* in dry bean tissue. *Plant Disease*, 91 (10): 1271-1276.
- CIAT. (2016). Guía de enfermedades y plagas del frijol en Colombia. Programa de Investigación de CGIAR en Cambio Climático, Agricultura y Seguridad Alimentaria.

- Contreras, S., Rodríguez, M., & Ruiz, J. (2015). Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* en condiciones de Laboratorio.
- Corrales, L., Ligia S., Jairo C., Julie J., & Katherine, M. (2012). «Efecto Biocontrolador de “*Bacillus*” spp., Frente a “*Fusarium*” sp., Bajo Condiciones de Invernadero en Plantas de Tomillo (“*Thymus Vulgaris l.*»)». Nova 10(17):64-82.
- Cowan, M. (1999). Plant products as an antimicrobial agents. Clinica Microbiological. Rev. 10: 564-582.
- DGSV-CNRF. (2020). *Colletotrichum lindemuthianum*. Sader-Senasica. Dirección General de Sanidad Vegetal-Centro Nacional de Referencia Fitosanitaria. Ficha técnica. Tecámac, Estado de México, 13 p.
- Faiguenbaum & Mouat, (2015). Manual de fríjol. Programa de apoyo agrícola y agroindustria vicepresidencia de fortalecimiento empresarial Cámara de Comercio Bogotá.
- FAO. (2018). Legumbres. Pequeñas semillas, grandes soluciones. Ciudad de Panamá. 292 páginas.
- FENALCE. (2011). Sensibilidades del sector cerealista y de leguminosas: fríjol. Administrador del: Fondo Nacional Cerealista y Fondo Nacional de Leguminosas.
- Fernández, J., Bernal, S., & Celis, M. (2015). Catálogo de plantas y líquenes de Colombia. Instituto de Ciencias Naturales, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá.
- Flamini, G., Cioni, P., Morelli, I., Maccioni, S., & Monti, G. (2001). Composition of the essential oil of *Teucrium fruticans L.* from the Maremma Regional Park (Tuscany, Italy). Flavour Frag J. 16: 367–369.

- Gallo, J., & Sarria, R. (2014). Obtención de colofonia y trementina a partir de la resina de *Pinus oocarpa* extraída de un bosque industrial en Cauca-Colombia. *Jou.Cie.Ing.* 6 (1): 65-69, 2014. ISSN 2145-2628.
- García, T. (2014). Métodos de control más eficientes para la Antracnosis (*Colletotrichum lindemuthianum*) en la producción de cultivo de fríjol (*Phaseolus vulgaris L.*).
- García, V., Martínez, M., Rodríguez, R., Guerra, R., Pacheco, I., Chavira, M., Anaya, J., Guevara, L., Pérez, F., Piña, G., & González, G. (2010). Antimicrobial activities of cascalote (*Caesalpinia cacalaco*) phenolics-containing extract against fungus *Colletotrichum lindemuthianum*. *Industrial Crops and Products*, 31: 134-138.
- Gil, M., Soto, A., Usma, J., & Gutiérrez, O. (2012). Contaminantes emergentes en aguas, efectos y posibles tratamientos. *Producción + Limpia - Julio - Diciembre de 2012. Vol.7, No.2 - 52-73.*
- Hernández, Y., & González, M. (2010). Efectos de la contaminación microbiana y oxidación fenólica en el establecimiento *in vitro* de frutales perennes. *Cultivos Tropicales*, 31(4), 00.
- Hollomon, D. (2015). Fungicide Resistance: 40 Years on and Still a Major Problem. In: Ishii, H. y Hollomon D. W. (eds). *Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to Practical Management.* Japan. Springer. ISBN 978-4-431-55641-1 (Print) 978-4-431-55642-8 (Online). pp 3-11.
- ICA, (2004). RESOLUCIÓN No. 00375 (27 de febrero de 2004) Por la cual se dictan las disposiciones sobre Registro y Control de los Bioinsumos y Extractos Vegetales de uso agrícola en Colombia.
- ICA, (2022). Listado de Registros nacionales de plaguicidas químicos de uso agrícola. Instituto Colombiano Agropecuario.

- Kagale, S., Marimuthu, T., Thayumanavan, B., Nandakuman, R., & Samiyappan, R. (2004). Antimicrobial activity and induction of systemic resistance in rice by leaf extract of *Datura metel* against *Rhizoctonia solani* and *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 65(2):91-100.
- Kavitha, H.; & Satish, S. (2011). Gestión ecológica de patógenos vegetales por parte de algunos extractos de plantas medicinales. *Revista de Tecnología Agrícola*. 7(2): 449-461.
- Kisiel, W., Stojakowska, A., Piozzi, F., & Rosselli, S. (2001). Flavonoids from *Teucrium fruticans* L. Department of Phytochemistry, Institute of Pharmacology Polish Academy of Sciences.
- Kumar, A. (2016). Enfermedades de la Antracnosis de algunas plantas medicinales frutales comunes. *Journal of Medicinal Plants Studies*, 233-236.
- León, I. (2009). La Antracnosis y la mancha angular del frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) Instituto de Investigaciones Hortícolas "Liliana Dimitrova". La Habana, Cuba.
- López, A., Vélez, M., Sánchez, S., Bonilla C., & Gallo, P. (2006). Evaluación de extractos vegetales para manejo de hongos patógenos en banano y fresa almacenados. *Acta Agronómica*, vol. 55, núm. 4, 2006, pp. 39-44.
- Maccioni, S., Baldini, R., Tebano, M., Cioni, PL y Flamini, G. (2007). Aceite esencial de *Teucrium scorodonia* L. ssp. *escorodonia* de Italia. *Química de los alimentos*, 104 (4), 1393-1395.
- Martínez, P., Vanegas, B., Mauricio, S., Pablo, G., & Marín, M. (2014). Detección por PCR de *Colletotrichum lindemuthianum* en cultivos y semillas de frijol en Antioquia, Colombia. *Acta Agronómica*. 63 (4): 377-387
- Mesa, A., Marín, P., Ocampo, O., Calle, J., & Monsalve, Z. (2019). Fungicidas a partir de extractos vegetales: una alternativa en el manejo integrado de hongos fitopatógenos RIA. *Revista de Investigaciones Agropecuarias*, vol. 45, núm. 1, pp. 23-30.

- Mesa, A., Zapata, S., Arana, L., Zapata, C., Monsalve Z., & Rojano, B. (2015). Antioxidant activity of different polarity extracts from *Ageratum conyzoides* L. Boletín latinoamericano del caribe de plantas medicinales y aromáticas, 14(1): 1-10.
- Mikaberidze, A., & McDonald, B. (2015). Fitness Cost of Resistance: Impact on Management. In: Ishii, H. y Hollomon D. W. (eds). Fungicide Resistance in Plant Pathogens. Principles and a Guide to Practical Management. Japan. Springer. ISBN 978-4-431-55641-1 (Print) 978-4-431-55642-8 (Online). pp 77-89.
- Minagricultura, Ministerio de agricultura y desarrollo rural. (2020). Cifras sectoriales Frijol, dirección de cadenas agrícolas y forestales.
- Minsalud, Ministerio de salud y protección social. (2015). Calidad e inocuidad en alimentos. Obtenido de: <http://www.minsalud.gov.co/salud/Paginas/inocuidad-alimentos.aspx>
- Montes, C., Ibagón, A., & Perafán, F. (2013). Manejo integrado vs. Manejo Tradicional de Antracnosis en Cultivos de frijol en Timbío, Cauca.
- Moo-Koh, A., Cristóbal, A., Ramírez, A., Suárez, M., Luna, R., & Ramírez, A. (2014). Actividad in vitro del extracto acuoso del *Bonellia flammaea* contra hongos fitopatógenos. Agrociencia, 48(8), 833-845.
- Navarro, R., Puerta, O., & Pérez, O. (1981). Resistencia de *Phytophthora infestans* al fungicida sistémico Metalaxil. Ascolfi Informa 7(1), 2.
- Núcleo Ambiental. (2015). Manual frijol. Programa de apoyo agrícola y agroindustrial vicepresidencia de fortalecimiento empresarial cámara de comercio de Bogotá.
- Ochoa, Y., Chávez, E., Landeros, J., Hernández, S., & Delgado, J. (2011). Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de cuatro extractos vegetales metanólicos para el control de tres especies de *Fusarium spp.*

- Ospina, J. (2002). Características físico mecanizadas y Análisis de calidad en granos. Publicaciones Universidad Nacional de Colombia. 115p.
- Pandey, D., Tripathi, N., Tripathi, D., & Dixit, S. (1982). Fungitoxic and phytotoxic properties of essential oil of *Hyptis suaveolens*. *Z. Pfl. Krankh. Pfl. Schutz* 89, 344-349.
- Pardo, A., Arenas, J., Gómez, M., Lora, F., & Gómez, J. (2011). Determinación de la actividad antifúngica de extractos de *Lantana camara* frente a *Candida* spp. *Infectio*, 15(4): 235-242.
- Pérez, A., Rojas, J., Chamorro, L., & Pérez, K. (2011). Evaluación in vitro de la actividad inhibitoria de extractos vegetales sobre aislados de *Colletotrichum* spp. *Acta Agronómica*, 60(2), 158-164.
- Pérez, E. (2012). «Plaguicidas Botánicos: Una Alternativa A Tener En Cuenta». *Fitosanidad* 16:51-59.
- Pérez, E., Campa, N., & Ferreira, F. (2010). Control de la Antracnosis en el cultivo de faba granja asturiana. *Tecnología Agroalimentaria*.
- Philogene, B., Regnault, C. & Vincent, C. (2004). Productos fitosanitarios insecticidas de origen vegetal: promesas de ayer y de hoy. En: Regnault-Roger, C.; Philogene, B. y Vincent, C, (Ed). *Biopesticidas de Origen Vegetal*. Ediciones Mundi Prensa, Madrid, pl-18.
- Piozzi, F., Bruno, M., Rosselli, S., Maggio, A. (2005). Advances on the chemistry of furano-diterpenoids from *Teucrium* genus. *Heterocycles*. 65: 1221–1234.
- Ramírez, J. & Ulloa, J. (2011). El fríjol (*Phaseolus vulgaris*): su importancia nutricional y como fuente de fitoquímicos. Centro de Tecnología de Alimentos, Universidad Autónoma de Nayarit.
- Rodríguez, A., Fung, Y., Ochoa, A., Ortiz, E., & Diaz, U. (2018). Parámetros físicos, físicos-químicos y químicos de extractos de *Origanum majorana* l. cultivado utilizando agua magnetizada. *Revista Cubana de Química*, vol. 30, núm. 3, pp. 470-482.

- Rodríguez, A., Ramírez, M., Bautista, S., Cruz, A., & Rivero, D. (2012). Actividad antifúngica de extractos de *Acacia farnesiana* sobre el crecimiento in vitro de *Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*.
- Rojas, J., García, A., & López, A. (2005). Evaluación de dos metodologías para determinar la actividad antimicrobiana de plantas medicinales. Boletín latinoamericano del caribe de las plantas medicinales y aromáticas, 4(2): 28-35.
- Rutala, W., & Werber, D. (2004). The benefits of surface disinfection. American Journal Infection Control. 32:pp. 226-231.
- SARH. (1992). Guía Fitosanitaria del Cultivo del Fríjol. Dirección General de Sanidad Vegetal. Serie Sanidad Vegetal. México.
- Sepúlveda, G., Porta, H., & Rocha, M. (2004). La Participación de los Metabolitos Secundarios en la Defensa de las Plantas. Apdo. Postal 510-3, Cuernavaca, Morelos, México CP 62250.
- Sharma, N., & Tripathi, A. (2006). Fungitoxicity of the essential oil of *Citrus sinensis* on post-harvest pathogen. W. J. Microbiol. Biotechnol. 22:587-593.
- Sharma, N., & Tripathi, A. (2008). Effects of *Citrus sinensis* (L.) Osbeck epicarp essential oil on growth and morphogenesis of *Aspergillus niger* (L.) Van Tieghem. Microbiological Research 163 (3): 337–344.
- Tamayo, P. (1995). Manejo y control de las enfermedades del fríjol voluble (*Phaseolus vulgaris* L.) Guía Ilustrada, Boletín de Divulgación. (CORPOICA) Regional 4, 1995, 40 p.
- Tripathi, P., & Dubey, N. (2004). Exploitation of natural products as an alternative strategy to control postharvest fungal rotting of fruit and vegetables. Postharvest Biol Tec; 32 (3): 235-245.

- Velásquez, M., Álvarez, R., Tamayo, P., & Carvalho, C. (2014). «Evaluación in Vitro De La Actividad fungistática Del Aceite Esencial De Mandarina Sobre El Crecimiento De *Penicillium Sp*». *Ciencia & Tecnología Agropecuaria*, vol. 15, n.º 1, diciembre de 2015, pp. 7-14.
- Viuda, M., Ruiz, Y., Fernández, J., & Pérez, J. (2008). Antifungal activity of lemon (*Citrus lemon L.*), mandarin (*Citrus reticulata L.*), grapefruit (*Citrus paradisi L.*) and orange (*Citrus sinensis L.*) essential oils. *Food Control* 19 (12): 1130–1138.

Anexos

Anexo 1

Registro y estadística de la prueba de la acción inhibitoria de los extractos vegetales de Salvia

Amarga

A.

CRM (cm)	R1	R2	R3	R4	R5	R6
TT1	2	2	2,2	2,1	2	2,2
TT2	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
TT3	2,8	2,7	2,8	2,6	2,7	2,6
TT4	2,8	2,7	2,9	2,9	2,8	3

B.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro micelio (cm)	24	0,99	0,99	4,16

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	20,79	3	6,93	966,98	<0,0001
Tratamientos	20,79	3	6,93	966,98	<0,0001
Error	0,14	20	0,01		
Total	20,93	23			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,13680

Error: 0,0072 gl: 20

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TT2	0,50	6	0,03	A
TT1	2,08	6	0,03	B
TT3	2,70	6	0,03	C
TT4	2,85	6	0,03	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fuente: (Miranda, 2022), InfoStat versión 2020, A). Tabla de registro de datos; B). Análisis de varianza,

Anexo 2

Registro y estadística de la prueba de dosis mínima inhibitoria del extracto etanólico de *Salvia*

Amarga

A.

CRM (cm)	R1	R2	R3	R4	R5	R6
TT1	4,9	5,1	5	5,2	5,1	5
TT2	3,5	3,7	3,9	3,8	3,7	3,7
TT3	3	3,1	2,9	2,9	3	2,8
TT4	2,1	2,3	2,5	2,2	2,1	2,1
TT5	1,9	1,9	1,9	1,8	1,8	1,7
TT6	1,1	1,3	1,4	1,2	1,1	1,3
TT7	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
TT8	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5

B.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² A _j	CV
Diametro micelio (cm)	48	1,00	1,00	4,63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	106,89	7	15,27	1409,49	<0,0001
Tratamientos	106,89	7	15,27	1409,49	<0,0001
Error	0,43	40	0,01		
Total	107,32	47			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,19209

Error: 0,0108 gl: 40

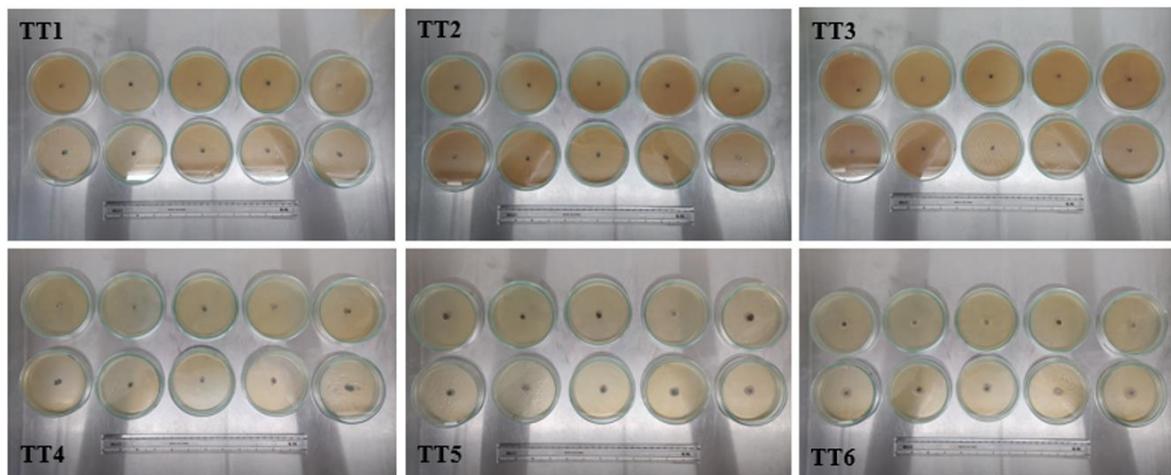
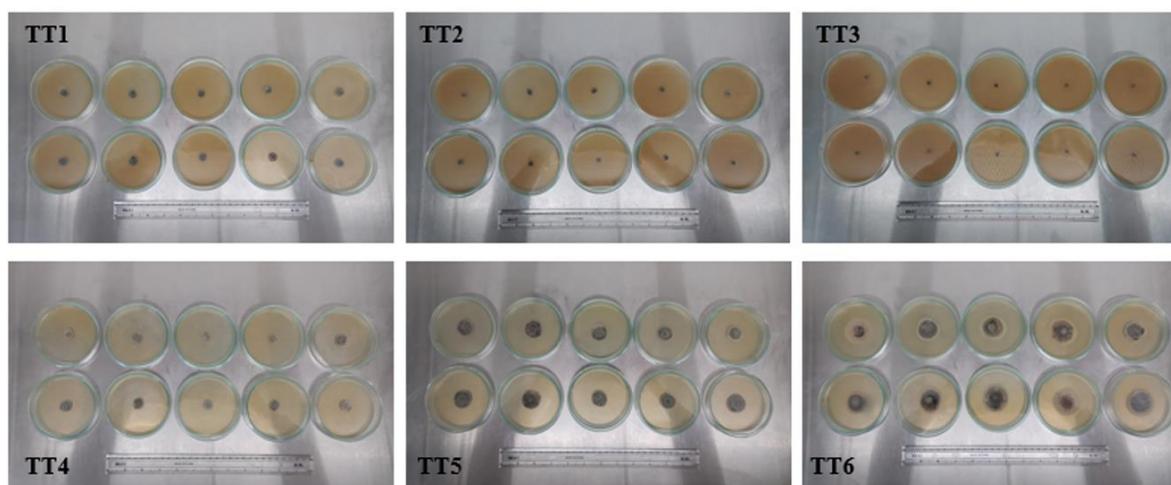
Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TT7	0,50	6	0,04	A
TT8	0,50	6	0,04	A
TT6	1,23	6	0,04	B
TT5	1,83	6	0,04	C
TT4	2,22	6	0,04	D
TT3	2,95	6	0,04	E
TT2	3,72	6	0,04	F
TT1	5,05	6	0,04	G

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

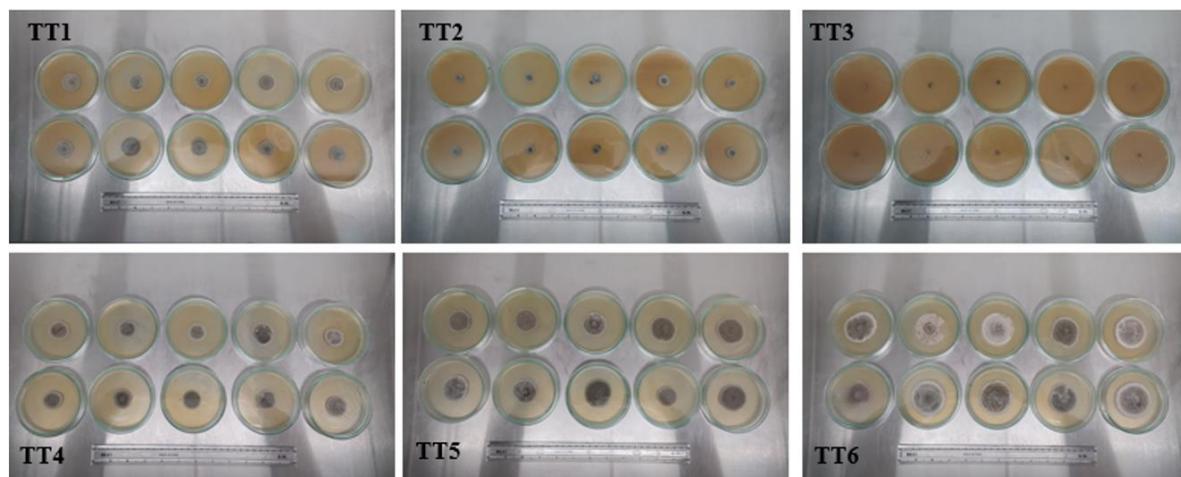
Fuente: (Miranda, 2022), InfoStat versión 2020, A). Tabla de registro de datos; B). Análisis de varianza,

Anexo 3

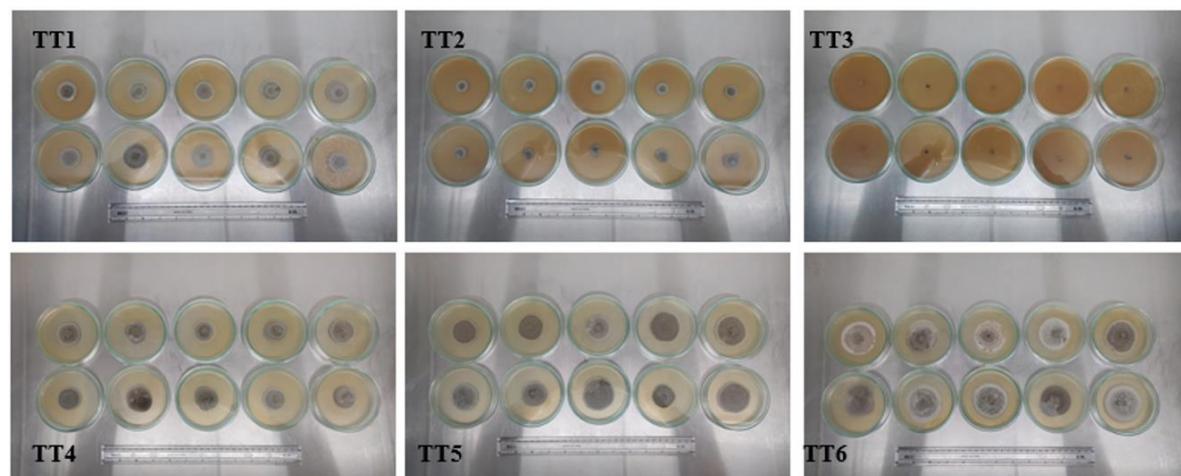
Registro fotográfico del crecimiento del micelio durante el transcurso de la prueba

A.**B.**

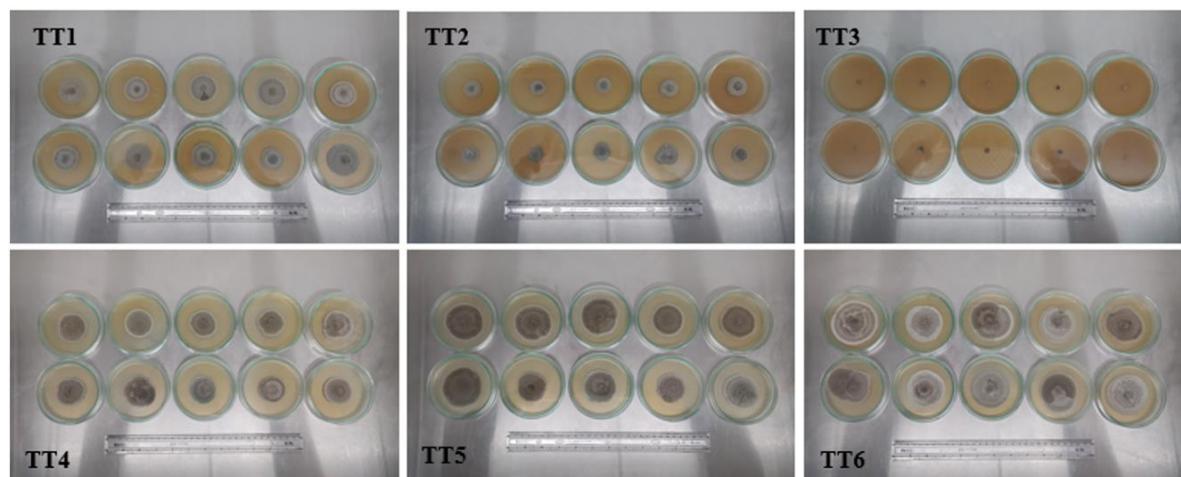
C.



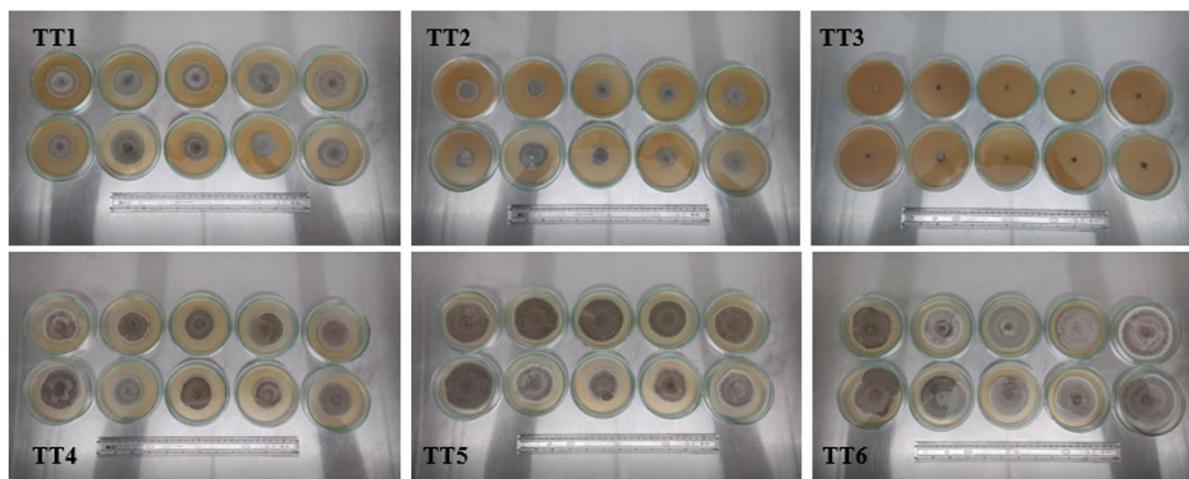
D.



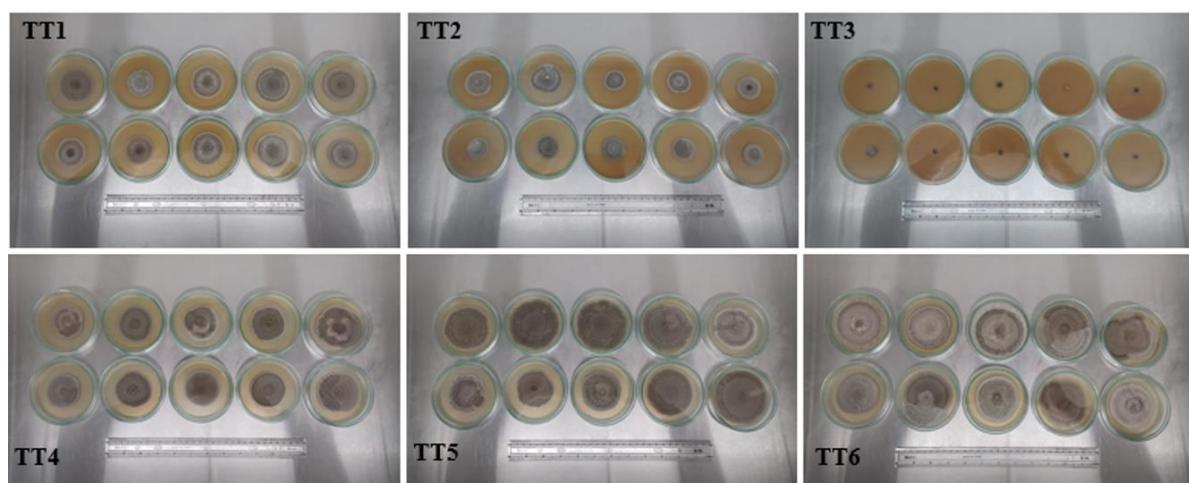
E.



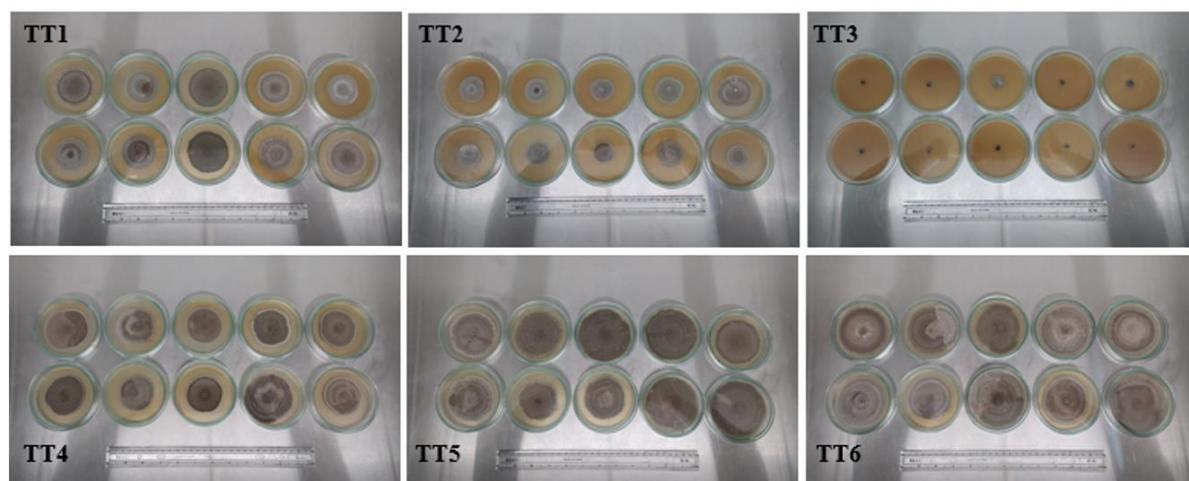
F.



G.



H.



Fuente: (Miranda, 2022), A). 1^{ra} observación; B). 2^{da} observación; C). 3^{ra} observación; D). 4^{ta} observación; E). 5^{ta} observación; F). 6^{ta} observación; G). 7^{ma} observación. H). 8^{va} observación.

Anexo 4

Registro de las mediciones del diámetro en (cm) de los inóculos, por cada tratamiento prueba de crecimiento en difusión agar

A.

23/11/2022	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
TT1	0,6	0,6	0,7	0,6	0,7	0,6	0,7	0,6	0,6	0,6
TT2	0,5	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,7	0,6	0,5
TT3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
TT4	1	0,6	0,6	0,6	0,5	0,6	0,6	0,7	0,7	0,6
TT5	1,1	1,2	1,2	1,2	1,1	1	1,1	1	1	1,1
TT6	2	1,8	1,6	2	1,9	1,6	1,6	1,6	1,4	1,7

B.

25/11/2022	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
TT1	1,3	1,3	1,4	1,4	1,4	1,3	1,2	1,2	1,3	1,3
TT2	0,6	0,6	0,7	0,7	0,7	0,9	0,9	0,8	0,7	0,7
TT3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
TT4	1,3	1,5	1,1	1,4	1,5	1,1	1,5	1,4	1,4	1,4
TT5	2,3	2,3	2,5	2,6	2,6	2,6	2,4	2,8	2,2	2,3
TT6	4	4	3,6	3,5	3,9	3,5	3,3	3,9	4	4

C.

28/11/2022	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
TT1	2,3	2,5	2,5	2,7	2,6	2,6	2,7	2,3	2,5	2,6
TT2	1,3	1,3	1,3	1,5	1,1	1,6	1,6	1,6	1,3	1,3
TT3	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
TT4	2,3	2,6	2,5	2,7	2,7	3	2,3	3	2,3	2,6
TT5	3,5	3,7	4	3	4	4,2	4	3,5	3,5	3,1
TT6	5,5	5	4	5	4,5	4	4,7	4,5	4,7	4,7

D.

30/11/2022	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
TT1	3	3,3	3,6	3,3	3	3,3	3,1	2,9	3,1	2,9
TT2	1,5	1,5	1,9	2	2,5	1,7	2	2	2,1	1,9
TT3	0,5	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
TT4	3,5	4	3,1	3	3	3,1	3,1	3,4	3,5	3,5
TT5	4	4	4,7	4,7	4,2	3,1	4,7	4	3,7	3,7
TT6	6	4,5	5,5	5,6	5	5	5	4,5	5,2	5

E.

2/12/2022	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
TT1	4	4	4	3,4	5	3,6	3,8	4,2	4,4	3,9
TT2	2,2	2	2,7	3,1	2	2,5	2,2	2,5	2,9	2,9
TT3	0,7	0,6	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
TT4	4,3	4,1	4,5	3,9	4,2	4,2	4,2	4,1	4,1	4,1
TT5	4,3	5,3	5,1	5	5,8	4,3	5	6	6	5,7
TT6	5,7	5,9	6,8	6	5,9	6	6,2	6	7	5,9

F.

5/12/2022	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
TT1	4,1	5,1	4,1	3,8	4,3	5	5,3	4,6	4,5	4,5
TT2	3,1	2,9	3	3	3,5	3,3	3	2,9	4,2	2,9
TT3	0,6	0,5	0,5	0,5	0,6	1	0,5	0,5	0,5	0,5
TT4	5,9	4,6	4,5	4,6	5	5	5,5	4,5	5	5
TT5	7	6	5	4,9	6	6	6	7	7	7
TT6	6,5	6,2	7,5	7,5	8,2	8,2	6,8	7	6,5	7

G.

7/12/2022	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
TT1	5	5,3	4,5	4,2	5	5,5	5,3	4,5	4	5,3
TT2	3,5	3,5	3,8	3,5	3,5	3	5	4	3,2	3
TT3	0,8	1,3	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5	0,5
TT4	4,7	5,5	5,3	5,1	6	4,9	5	5,4	5,2	7
TT5	5,8	5,5	6	6,8	7,8	6,6	7,8	8	8	7
TT6	6,2	6,5	8	7,5	6,5	8,7	8,7	8,5	7,2	8,1

H.

9/12/2022	R1	R2	R3	R4	R5	R6	R7	R8	R9	R10
TT1	5	5	6	5,5	4,6	5,5	6	5,1	4,9	6
TT2	4	3,9	3,4	5,1	3,3	4,5	3,7	3,8	3,9	3,5
TT3	0,9	1,6	0,5	0,5	0,5	0,6	0,5	0,5	0,5	0,5
TT4	5,4	5,1	5,3	7	5,5	6,5	5,8	5,8	5,5	5,5
TT5	6,9	5,9	7	8	6	7	7,5	8	8,5	8,5
TT6	7,5	7	9	7	9	9	8,5	9	8,5	9

Fuente: (Miranda, 2022), A). 1^{ra} observación; B). 2^{da} observación; C). 3^{ra} observación; D). 4^{ta} observación; E). 5^{ta} observación; F). 6^{ta} observación; G). 7^{ma} observación. H). 8^{va} observación.

Anexo 5

Análisis de varianza y comparación de medias, prueba de crecimiento en difusión agar

A.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro micelio (cm)	60	0,95	0,94	12,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	11,02	5	2,20	186,57	<0,0001
Tratamientos	11,02	5	2,20	186,57	<0,0001
Error	0,64	54	0,01		
Total	11,66	59			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,14362

Error: 0,0118 gl: 54

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TT3	0,50	10	0,03	A
TT2	0,58	10	0,03	A B
TT1	0,63	10	0,03	A B
TT4	0,65	10	0,03	B
TT5	1,10	10	0,03	C
TT6	1,72	10	0,03	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

B.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro micelio (cm)	60	0,98	0,98	9,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	75,10	5	15,02	614,94	<0,0001
Tratamientos	75,10	5	15,02	614,94	<0,0001
Error	1,32	54	0,02		
Total	76,42	59			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,20650

Error: 0,0244 gl: 54

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TT3	0,50	10	0,05	A
TT2	0,73	10	0,05	B
TT1	1,31	10	0,05	C
TT4	1,36	10	0,05	C
TT5	2,46	10	0,05	D
TT6	3,77	10	0,05	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

C.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro micelio (cm)	60	0,96	0,96	11,17

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	112,13	5	22,43	275,29	<0,0001
Tratamientos	112,13	5	22,43	275,29	<0,0001
Error	4,40	54	0,08		
Total	116,53	59			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,37712

Error: 0,0815 gl: 54

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TT3	0,50	10	0,09	A
TT2	1,39	10	0,09	B
TT1	2,53	10	0,09	C
TT4	2,60	10	0,09	C
TT5	3,65	10	0,09	D
TT6	4,66	10	0,09	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

D.

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro micelio (cm)	60	0,95	0,95	11,57

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	131,65	5	26,33	215,98	<0,0001
Tratamientos	131,65	5	26,33	215,98	<0,0001
Error	6,58	54	0,12		
Total	138,23	59			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,46133

Error: 0,1219 gl: 54

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TT3	0,52	10	0,11	A
TT2	1,91	10	0,11	B
TT1	3,15	10	0,11	C
TT4	3,32	10	0,11	C
TT5	4,08	10	0,11	D
TT6	5,13	10	0,11	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)**E.**

Análisis de la varianza

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro micelio (cm)	60	0,96	0,96	10,59

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	200,81	5	40,16	251,74	<0,0001
Tratamientos	200,81	5	40,16	251,74	<0,0001
Error	8,61	54	0,16		
Total	209,42	59			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,52775

Error: 0,1595 gl: 54

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TT3	0,54	10	0,13	A
TT2	2,50	10	0,13	B
TT1	4,03	10	0,13	C
TT4	4,17	10	0,13	C
TT5	5,25	10	0,13	D
TT6	6,14	10	0,13	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

F.**Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro micelio (cm)	60	0,94	0,94	12,25

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	271,95	5	54,39	184,78	<0,0001
Tratamientos	271,95	5	54,39	184,78	<0,0001
Error	15,89	54	0,29		
Total	287,84	59			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,71685

Error: 0,2944 gl: 54

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TT3	0,57	10	0,17	A
TT2	3,18	10	0,17	B
TT1	4,53	10	0,17	C
TT4	4,96	10	0,17	C
TT5	6,19	10	0,17	D
TT6	7,14	10	0,17	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

G.**Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro micelio (cm)	60	0,92	0,92	14,47

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	316,02	5	63,20	129,19	<0,0001
Tratamientos	316,02	5	63,20	129,19	<0,0001
Error	26,42	54	0,49		
Total	342,44	59			

Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,92418

Error: 0,4892 gl: 54

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TT3	0,62	10	0,22	A
TT2	3,60	10	0,22	B
TT1	4,86	10	0,22	C
TT4	5,41	10	0,22	C
TT5	6,93	10	0,22	D
TT6	7,59	10	0,22	D

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

H.**Análisis de la varianza**

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Diametro micelio (cm)	60	0,94	0,93	12,65

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo	370,49	5	74,10	169,49	<0,0001
Tratamientos	370,49	5	74,10	169,49	<0,0001
Error	23,61	54	0,44		
Total	394,09	59			

Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,87361

Error: 0,4372 gl: 54

Tratamientos	Medias	n	E.E.	
TT3	0,66	10	0,21	A
TT2	3,91	10	0,21	B
TT1	5,36	10	0,21	C
TT4	5,74	10	0,21	C
TT5	7,33	10	0,21	D
TT6	8,35	10	0,21	E

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Fuente: (Miranda, 2022), InfoStat versión 2020, A). Análisis de varianza, 1^{ra} observación; B). Análisis de varianza, 2^{da} observación; C). Análisis de varianza, 3^{ra} observación; D). Análisis de varianza, 4^{ta} observación; E). Análisis de varianza, 5^{ta} observación; F). Análisis de varianza, 6^{ta} observación; G). Análisis de varianza, 7^{ma} observación. H). Análisis de varianza, 8^{va} observación.