

**EVALUACIÓN *in vitro* DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
EXTRACTOS VEGETALES DE *Azadirachta indica* Y *Melia azedarach* CONTRA
Burkholderia glumae Y *Colletotrichum gloeosporioides*.**

JOSÉ DAVID VILLARREAL RODRÍGUEZ

UNIVERSIDAD DE SUCRE

FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS

SINCELEJO-SUCRE

2017

**EVALUACIÓN IN VITRO DE LA ACTIVIDAD ANTIMICROBIANA DE
EXTRACTOS VEGETALES DE *Azadirachta indica* Y *Melia azedarach* CONTRA
Burkholderia glumae Y *Colletotrichum gloeosporioides*.**

TRABAJO DE GRADO PARA OBTAR EL TÍTULO BIÓLOGO

JOSÉ DAVID VILLARREAL RODRÍGUEZ

DIRECTOR

Ph.D. ALEXANDER PÉREZ CORDERO

CODIRECTOR

BIOL. DEIMER C. VITOLA ROMERO

UNIVERSIDAD DE SUCRE

FACULTAD DE EDUCACIÓN Y CIENCIAS

SINCELEJO-SUCRE

2017

Notas de Aceptación

Firma de presidente del jurado

Firma del jurado 2

Sincelejo, octubre de 2017

Agradecimientos

Primeramente a Dios que me ha iluminado, me ha dado sabiduría y salud para desarrollar y culminar este trabajo de investigación.

A mis padres, Marisol Rodríguez Tovar y José Luis Villarreal Mora, por el apoyo incondicional en toda la etapa de mi vida universitaria y en cada uno de los pasos que estoy afrontando para el alcance de mis propósitos en la vida.

A la Universidad de Sucre por ser la impulsora de mi formación profesional y desarrollo personal.

Al director Alexander Pérez Cordero y codirector Deimer Vitola Romero, por los aportes y los consejos para el progreso de este trabajo investigativo.

A todos los integrantes del grupo de investigación en Bioprospección Agropecuaria por el apoyo incondicional.

A mis amigos de carrera, en especial a Yornei Pérez, Deimer Aguilera y Rodrigo Durango que me estuvieron motivando para alcanzar este sueño.

A los equipos de fútbol Atlético Juanma y la selección de la Universidad, por la amistad y por la buena energía que me brindaron.

Contenido

Resumen.....	16
Abstract	18
1. Introducción.....	20
2. Planteamiento del problema.....	22
3. Justificación	26
4. Marco teórico.....	28
4.1 Cultivo de ñame (<i>Dioscorea</i> spp)	28
4.1.1 Descripción de la planta de ñame (<i>Dioscorea</i> spp).....	29
4.2 <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	29
4.2.1 Etiología de <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>	29
4.2.2 Epidemiología	30
4.2.3 Antracnosis.....	31
4.2.4 Ciclo de la antracnosis.....	31
4.2.5 Sintomatología de la antracnosis.....	32
4.2.6 Control de la antracnosis	32
4.3 Cultivo de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	33
4.3.1 Descripción de la planta de arroz (<i>Oryza sativa</i>)	33
4.4 <i>Burkholderia glumae</i>	33
4.4.1 Etiología de <i>Burkholderia glumae</i>	34
4.4.2 Epidemiología	35
4.4.3 Añublo bacterial	35
4.4.4 Ciclo del añublo bacterial.....	36
4.4.5 Sintomatología del añublo bacterial	36
4.4.6 Control del añublo bacterial	37
4.5 Extractos vegetales.....	37
4.6 <i>Azadirachta indica</i> A. Juss.	38
4.7 <i>Melia azederach</i> L.	38
5. Objetivos	39
6. Metodología	40
6.1 Sitios de muestreo.....	40

6.1.2 Material recolectado	40
6.1.3 Secado y molienda	40
6.1.4 Obtención de los extractos vegetales.....	40
6.1.5 Determinación del rendimiento del extracto	40
6.2 Fitopatógenos.....	41
6.3 Actividad antibacteriana de los extractos contra <i>B. glumae</i>	41
6.3.1 Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) ..	42
6.4 Curva de germinación de conidias de <i>C. gloeosporioides</i>	42
6.4.1 Inhibición de la germinación de conidias de <i>C. gloeosporioides</i>	43
6.4.2 Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (MFC), de germinación de conidias.....	43
6.5 Inhibición del crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i>	44
6.5.1 Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (MFC).	45
6.6 Análisis por cromatografía de gases/ espectrómetro de masa (GC/MS).....	45
6.7 Análisis estadístico	45
7. Resultados	47
7.1 Clasificación científica del material vegetal	47
7.2 Obtención de los extractos vegetales	47
7.3 Determinación del rendimiento de la extracción	48
7.4 Fitopatógenos.....	49
7.5 Actividad antibacteriana de extractos vegetales de diferentes tejidos de <i>A. indica</i> y <i>M. azedarach</i> contra <i>B. glumae</i>	50
7.5.1 Actividad antibacteriana de los extractos de diferentes tejidos de <i>A. indica</i> contra <i>B. glumae</i>	50
7.5.2 Actividad antibacteriana de los extractos de diferentes tejidos de <i>M. azedarach</i> contra <i>B. glumae</i>	51
7.5.3 MIC Y MBC de los extractos de diferentes tejidos de <i>A. indica</i> contra <i>B. glumae</i>	52
7.5.4 MIC Y MBC de los extractos de diferentes tejidos de <i>M. azedarach</i> contra <i>B. glumae</i> . ..	53
7.6 Actividad antifúngica de extractos vegetales de diferentes tejidos de <i>A. indica</i> y <i>M. azedarach</i> contra la germinación de conidias de <i>C. gloeosporioides</i>	54
7.6.1 Curva de germinación de conidias de <i>C. gloeosporioides</i>	54
7.6.2 Actividad antifúngica de los extractos vegetales de diferentes tejidos de <i>A. indica</i> contra la germinación de conidias de <i>C. gloeosporioides</i>	55

7.6.3 Actividad antifungica de los extractos vegetales de diferentes tejidos de <i>M. azedarach</i> contrala germinación de conidias de <i>C. gloeosporioides</i> .	56
7.6.4 MIC Y MFC de los extractos de diferentes tejidos de <i>A. indica</i> contra la germinacion de conidias de <i>C. gloeosporioides</i> .	57
7.6.5 MIC Y MFC de los extractos de diferentes tejidos de <i>M. azedarach</i> contra la germinacion de conidias de <i>C. gloeosporioides</i> .	58
7.7 Actividad antifungica de extractos vegetales de diferentes tejidos de <i>A. indica</i> y <i>M. azedarach</i> contra el crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> .	59
7.7.1 Actividad antifungica de los extractos vegetales de diferentes tejidos de <i>A. indica</i> contra <i>C. gloeosporioides</i> .	59
7.7.2 Actividad antifungica de los extractos vegetales de diferentes tejidos de <i>M. azedarach</i> contra el crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> .	60
7.7.3 MIC Y MFC de los extractos de diferentes tejidos de <i>A. indica</i> contra el crecimiento micelial de <i>C. gloeosporioides</i> .	61
7.8 Caracterización química de los extractos vegetales por la técnica cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (GC/MS).	62
7.8.1 Cromatografía de extracto de hojas de Neem	63
7.8.2 Cromatografía de extracto de frutos de Neem.	63
7.8.3 Cromatografía de extracto de hojas de Melia.	64
7.8.4 Cromatografía de extracto de frutos de Melia	65
7.8.5 Cromatografía de extracto de semillas de Melia	65
7.9 Análisis estadístico	66
8. Análisis de resultados	72
9. Conclusiones	79
10. Bibliografía	80
11. Anexos	90

Índice de figuras

Figura 1. Síntomas en el arroz causados por *B. glumae*. A: Panículas afectadas. B: Grados de decoloración de los granos de arroz.

Figura 2. Identificación taxonómica del material vegetal. A: muestra identificada como *A. indica*, voucher 000041. B: muestra identificada como *M. azedarach*, voucher 000566. Fuente: Laboratorio de Conservación Biológica, herbario de la universidad de Sucre 2017.

Figura 3. Obtención de extractos etanólicos de diferentes tejidos de *A. indica* y *M. azedarach* utilizando equipo Soxhlet.

Figura 4. Cepa de *C. gloeosporioides* aislada por el grupo de Investigación de Bioprospección Agropecuaria del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de Sucre.

Figura 5. *B. glumae* cedida por el Centro de Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

Figura 6. Ensayo *in vitro* de actividad inhibitoria de los diferentes tejidos de *A. indica* (Neem) contra *B. glumae*. (HN-hojas de Neem; FN-frutos de Neem).

Figura 7. Ensayo *in vitro* de actividad inhibitoria de los diferentes tejidos de *M. azedarach* (Melia) contra *B. glumae*. (HM-hojas de Melia; FM-frutos de Melia y SM-semillas de Melia).

Figura 8. MIC y MBC de los extractos de HN y FN de *A. indica* contra *B. glumae*. (HN-hojas de Neem; FN-frutos de Neem).

Figura 9. MIC y MBC de los extractos de HM, FM y SM de *M. azedarach* contra *B. glumae*. (HM-hojas de Melia; FM-frutos de Melia y SM-semillas de Melia).

Figura 10. Etapas del proceso de germinación de las conidias de *C. gloeosporioides* utilizando una solución de Tween 20 al 1% y NaCl al 0,85%.

Figura 11. Ensayo *in vitro* de actividad inhibitoria de los extractos de diferentes tejidos de *A. indica* (Neem) contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides* (conidias). (HN-hojas de Neem; FN-frutos de Neem)

Figura 12. Ensayo *in vitro* de actividad inhibitoria de los diferentes tejidos de *M. azedarach* (Melia) contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides* (conidias). (HN-hojas de Melia; FN-frutos de Melia y SM-semillas de Melia).

Figura 13. MIC y MFC de los extractos de HN y FN de *A. indica* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides* (conidias). (HN-hojas de Neem; FN-frutos de Neem).

Figura 14. MIC y MFC de los extractos de HM, FM y SM de *M. azedarach* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides* (conidias). (HM-hojas de Melia; FM-frutos de Melia y SM-semillas de Melia).

Figura 15. Ensayo *in vitro* de actividad inhibitoria de los diferentes tejidos de *A. indica* (Neem) contra *C. gloeosporioides* (micelio). (HN-hojas de Neem; FN-frutos de Neem).

Figura 16. Ensayo *in vitro* de actividad inhibitoria de los diferentes tejidos de *M. azedarach* (Melia) contra *C. gloeosporioides* (micelio). (HN-hojas de Melia; FN-frutos de Melia y SM-semillas de Melia).

Figura 17. MIC y MFC de los extractos de HN y FN de *A. indica* contra *C. gloeosporioides* (micelio). (HN-hojas de Neem; FN-frutos de Neem).

Índice de tablas

Tabla 1. Rendimientos de los extractos de Neem y Melia

Tabla 2. Prueba general de Porcentaje de índice antibacteriano de extractos vegetales de *A. indica* contra *B. glumae*.

Tabla 3. Prueba general del porcentaje de índice antibacteriano contra de extractos vegetales de *M. azedarach* *B. glumae*.

Tabla 4. MIC y MBC de extracto de HN contra *B. glumae*.

Tabla 5. MIC y MBC de extracto de FN contra *B. glumae*.

Tabla 6. MIC y MBC de extracto de HM contra *B. glumae*.

Tabla 7. MIC y MBC de extractos de FM y SM contra *B. glumae*.

Tabla 8. Prueba general de porcentaje de índice antifúngico de extractos vegetales de *A. indica* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*

Tabla 9. Prueba general de porcentaje de índice antifúngico de extractos vegetales de *M. azedarach* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*.

Tabla 10. MIC y MFC de extractos de HN y FN contra la germinación de conidias *C. gloeosporioides*.

Tabla 11. MIC y MFC de extractos de HM y FM contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*.

Tabla 12. MIC y MFC de extracto de SM contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*.

Tabla 13. Prueba general de porcentaje de índice antifúngico de extractos vegetales de *A. indica* contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Tabla 14. Prueba general de porcentaje de índice antifúngico de extractos vegetales de *M. azedarach* contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Tabla 15. MIC Y MFC de extracto de HN contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Tabla 16. MIC Y MFC de extracto de FN contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Tabla 17. Análisis de varianza (ANOVA) para los factores A, B y C y sus interacciones.

Tabla 18. Pruebas de múltiple de rangos para porcentaje de inhibición por bioproductos.

Tabla 19. Pruebas de múltiple de rangos para Porcentaje de Inhibición por bacteria y estructuras fúngicas.

Tabla 20. Pruebas de múltiple de rangos para Porcentaje de Inhibición por concentración.

Índice de gráficos

Gráfico 1. Curva de germinación de conidias de *C. gloeosporioides* mostrando máxima germinación de 85,7% a las 18 horas de incubación.

Gráfico 2. Metabolitos Secundarios (MS) de los extractos totales etanólicos de hojas de Neem. El extracto mostró como MS mayoritarios al octadecametilciclononasilo xano con un porcentaje de área del 12,59%.

Gráfico 3. MS de los extractos totales etanólicos de frutos de Neem. El extracto mostró como MS mayoritarios al Hexadecanoato de metilo con un porcentaje de área del 16,38%.

Gráfico 4. MS de los extractos totales etanólicos de hojas de Melia. El extracto mostró como MS mayoritarios al acrilato de dodecilo con un porcentaje de área del 19,67%

Gráfico 5. MS de los extractos totales etanólicos de frutos de Melia. El extracto mostró como MS mayoritarios 2-Isopropil-5-metil-1-heptanol con un porcentaje de área del 14,82%.

Gráfico 6. MS de los extractos totales etanólicos de semillas de Melia. El extracto mostró como MS mayoritarios al 1,1,3,3,5,5,7,7,9,9,11,11,13,13,15,15-hexadecametiloctasiloxano con un porcentaje de área del 16,31%.

Grafico 7. Residuos vs los predichos.

Grafico 8. Residuos vs número de filas.

Grafico 9. Bacteria y estructuras fúngicas vs bioproductos.

Grafico 10. Bacteria y estructuras fúngicas vs concentraciones.

Grafico 11. Bioproductos vs concentraciones.

Índice de anexos

Anexo 1. Rotaevaporador compacto con vidriería diagonal, MODEL: N-1200B MARCA: EYELA, para la concentración de extractos.

Anexo 2. Prueba de Inhibición de la germinación de conidias de extractos de hojas y frutos de Melia y Neem en concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20% por triplicado (azul: extractos de hojas de Neem; rojo: extracto de frutos de Neem; verde: extracto de hojas de Melia; amarillo: extracto de frutos de Melia).

Anexo 3. Prueba Inhibición de la germinación de conidias del extracto de semillas de Melia en concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20% (naranja: extracto de semillas de Melia; violeta: testigo; café: control positivo).

Anexo 4. Prueba de Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (MGC) de germinación de las conidias, de extractos de hojas y frutos de Melia y Neem en concentraciones de 5, 6, 7, 8, 9% por triplicado (azul: extractos de hojas de Neem; rojo: extracto de frutos de Neem; verde: extracto de hojas de Melia; amarillo: extracto de frutos de Melia).

Anexo 5. Prueba de Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (MGC) de germinación de las conidias, de extracto de semillas de Melia en concentraciones de 10, 11, 12, 13 y 14% por triplicado (naranja: extracto de semillas de Melia; violeta: testigo; café: control positivo).

Anexo 6. Prueba de actividad antibacteriana de extractos de hojas y frutos de Melia y Neem en concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20% por triplicado (azul: extractos de hojas de Melia; rojo: extracto de hojas de Neem; verde: extracto de frutos de Melia; amarillo: extracto de frutos de Neem).

Anexo 7. Prueba de actividad antibacteriana del extracto de semillas de Melia en concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20% (naranja: extracto de semillas de Melia; violeta: testigo; café: control positivo; negro: control negativo).

Anexo 8. Prueba de Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de extractos de hojas y frutos de Melia y Neem, en concentraciones de 15, 16, 17, 18, 19% para los extractos de hojas de Neem y Melia por triplicado y en concentraciones de 10, 11, 12, 13, 14, 15% para frutos de Neem y Melia por triplicado (azul: extractos de hojas de Neem; rojo: extracto de frutos de Neem; verde: extracto de hojas de Melia; amarillo: extracto de frutos de Melia).

Anexo 9. Prueba de Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de extracto de semillas de Melia en concentraciones de 10, 11, 12, 13, 14 y 15 % por triplicado (naranja: extracto de semillas de Melia; violeta: testigo; café: control positivo; negro: control negativo).

Anexo 10. Cromatograma del extracto de hojas de Neem.

Anexo 11. Compuestos identificados del extracto de hojas de Neem por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.

Anexo 12. Cromatograma del extracto de frutos Neem.

Anexo 13. Compuestos identificados del extracto de frutos de Neem por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.

Anexo 14. Cromatograma del extracto de hojas de Melia.

Anexo 15. Compuestos identificados del extracto de hojas de Melia por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.

Anexo 16. Cromatograma del extracto de frutos de Melia.

Anexo 17. Compuestos identificados del extracto de frutos de Melia por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.

Anexo 18. Cromatograma del extracto de semillas de Melia.

Anexo 19. Compuestos identificados del extracto de semillas de Melia por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.

Abreviaturas

HN: hojas de Neem.

FN: frutos de Neem.

HM: hojas de Melia.

FM: frutos de Melia.

SM: semillas de Melia.

UFC: unidades formadoras de colonias.

%I.B: porcentaje de índice bactericida.

%I.A: porcentaje de índice antifúngico.

%I.G: porcentaje de inhibición de la germinación.

MIC: Concentración mínima inhibitoria.

MBC: Concentración mínima bactericida.

MFC: Concentración mínima fungicida.

MS: metabolitos secundarios.

GC/MS: cromatografía de gases/ espectrómetro de masa.

Resumen

El Ñame (*Dioscorea* spp.) y el arroz (*Oryza sativa*) son productos que tienen diversos beneficio, debido a que exhiben propiedades alimenticias importantes para la población a nivel mundial, pero además de la importancia alimentaria estos cultivos agrícolas son vulnerables a problemas fitosanitarios como las enfermedades, para el caso del cultivo del ñame, una de las enfermedades de mayor importancia por la pérdidas económicas según lo demuestran los diferentes estudios es la producida por *Colletotrichum gloeosporioides* y para el cultivo del arroz, el añublo bacterial en el arroz ocasionada por *Burkholderia glumae*, quien en lo últimos años ha dispuesto la atención a nivel mundial por la pérdidas económicas y el impacto en la producción de este cultivo.

Teniendo en cuenta la problemática que las enfermedades ocasionan en los cultivos de ñame y de arroz, se planteó el presente trabajo cuyo objetivo fue evaluar in vitro el efecto inhibitorio de extractos vegetales de diferentes tejidos de *Azadirachta indica* y *Melia azedarach* contra los fitopatógenos *B. glumae* y *C. gloeosporioides*. El material vegetal para la obtención de los extractos fue recolectado en el municipio de Sincelejo, el cual fue sometido a procesos de obtención de los extractos mediante la técnica de extracción, utilizando equipo Soxhlet. La actividad antimicrobiana de los extractos y sus diferentes concentraciones fueron evaluadas in vitro mediante la técnica de placas de lisa y siembra directa. Los resultados obtenidos indican que el extracto que presento mayor eficiencia de inhibición contra *B. glumae* fue FN (frutos de Neem) con un 100% de inhibición a una concentración del 11%, mientras que los extractos de hojas presentaron la misma efectividad pero a concentración del 20%. Con respecto a la germinación de conidias el FN inhibió el 100% al 8% de concentración y el extracto de SM (semillas de *Melia*) fue el menos eficiente debido a que provocó la misma actividad pero a concentración de 12%. Por

último, la inhibición del 100% sobre el crecimiento micelial la mostró el extracto de HN (hojas de Neem) a concentración del 3%, mientras que los demás extractos mostraron el mismo porcentaje de inhibición a concentración superior del 10%.

Palabras claves: extractos vegetales, bioproducto, fitopatógenos, antracnosis, añublo bacterial.

Abstract

Yams (*Dioscorea* spp.) And rice (*Oryza sativa*) are products that have different benefits, because they exhibit important food properties for the population worldwide, but in addition to the importance of food these agricultural crops are vulnerable to phytosanitary problems such as diseases, for the case of the cultivation of yam, one of the most important diseases by economic losses as shown by the different studies is the one produced by *Colletotrichum gloeosporioides* and for rice cultivation, the bacterial blight in rice caused by *Burkholderia glumae*, who in recent years has provided worldwide attention for the economic losses and the impact on the production of this crop.

Taking into account the problems caused by diseases in yam and rice crops, the present work was aimed at evaluating in vitro the inhibitory effect of plant extracts of different tissues of *Azadirachta indica* and *Melia azedarach* against phytopathogens *B. glumae* and *C. gloeosporioides*. The vegetal material for obtaining the extracts was collected in the municipality of Sincelejo, which was subjected to processes to obtain the extracts using the extraction technique, using Soxhlet equipment. The antimicrobial activity of the extracts and their different concentrations were evaluated in vitro by the technique of smooth plates and direct seeding. The results obtained indicate that the extract that showed the highest efficiency of inhibition against *B. glumae* was FN (fruits of Neem) with 100% inhibition at a concentration of 11%, while the leaf extracts presented the same effectiveness but at a concentration of 20%. Concerning the germination of conidia the FN inhibited 100% at 8% concentration and the extract of SM (Melia seeds) was the least efficient because it caused the same activity but at a concentration of 12%. Finally, the inhibition of 100% on mycelial growth was shown by the HN extract (Neem leaves) at a

concentration of 3%, while the other extracts showed the same percentage of inhibition at a concentration higher than 10%.

Keywords: plant extracts, bioproduct, phytopathogens, anthracnose, bacterial blight.

1. Introducción

El cultivo de ñame es un pilar económico en las regiones tropicales y subtropicales del planeta, ya que es considerado un producto básico en el consumo de millones de personas en África, Asia y América latina (Perea y Buitrago, 2000). En Colombia, *Dioscorea alata* y *Dioscorea rotundata* son las especies de ñame de mayor importancia tanto por el área sembrada, como por la demanda del tubérculo (Mendez, Palencia, Hernandez, Hernandez, & Beltrán, 2013). De este producto, se sostienen al menos 20 mil familias de los departamentos de Sucre, Córdoba y Bolívar (Osorio, Bustamante, Macareno, Hernandez, & Beltrán, 2010). A su vez, el arroz (*Oryza sativa* L.), es el principal cultivo alimenticio consumido por la mitad de la población mundial (Cottyn, Debode, Regalado, Mew & Swings, 2009). Este es un alimento básico predominante para 17 países de Asia y el Pacífico, nueve países de América del Norte y del Sur y ocho países de África (FAO, 2004).

La pérdida de las cosechas y la disminución de su calidad por la acción de agentes biológicos, es uno de los principales problemas que enfrenta la agricultura (Opara y Obani, 2010). A nivel mundial los fitopatógenos son los responsables de las enfermedades de pre y pos cosecha, causando grandes pérdidas económicas, por la alteración en el desarrollo y crecimiento de las especies vegetales donde estos hospedan (Agrios, 2005). Las bacterias y hongos fitopatógenos son los que presentan mayor importancia en cuanto a daño a cultivos (Juárez, 2010), estos daños suelen ser una limitante en el desarrollo productivo del sistema, por esta razón, se debe conocer bien al agente fitopatológico y considerarlo como un elemento importante a tener en cuenta para su manejo y control (investigación y desarrollo, 2010).

El acelerado aumento de enfermedades en las plantas ha generado la utilización de un mayor número de agroquímicos en pro de contrarrestar los efectos colaterales de los fitopatógenos en los agroecosistemas. Así mismo, el mal uso de bactericidas y fungicidas por parte de los agricultores ha generado la aparición de cepas resistentes, y por tanto, un aumento en la demanda de más agroquímicos (Aduramigba-Modupe, Asiedu & Odebode, 2008). En este orden de ideas, se precisa identificar nuevos productos más eficaces, más económicos y menos agresivos con el medio ambiente, que permitan controlar el desarrollo de patógenos de plantas (Quintero, 2001).

Es por ello que los productos naturales con su amplia diversidad estructural se han convertido en una opción en el diseño de técnicas en el manejo de enfermedades de una manera efectiva y ecológica (Opara y Obani, 2010). La utilización de extractos vegetales para uso agrícola es una alternativa viable y conveniente para el manejo integrado de fitopatógenos desde muchos puntos de vista (técnico, económico y ambiental), que beneficia la eficiencia del sistema productivo (Pulgarín, 2000; Duque, 2006).

Por lo tanto, esta investigación plantea evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria de los extractos de hojas, frutos y semillas de *A. indica* y *M. azederach* contra los fitopatógenos *B. glumae* y *C. gloeosporioides*.

2. Planteamiento del problema

En la actualidad, Colombia se ubica en el tercer lugar como mayor productor de arroz en América latina y el Caribe (FAO, 2016). A nivel nacional este producto agrícola se sitúa en un segundo puesto en extensión, solo superado por el café (FINAGRO, 2014), ya que el 14% del área cosechada y el 43% de los cultivos transitorios están representado por esta gramínea (DANE-ENA, 2015). Según datos arrojados por el DANE-Fedearroz, en el año 2015 se sembraron 478.878 Ha, con un rendimiento de 2.067.389 Ton (DANE-Fedearroz, 2015), Sin embargo la productividad del arroz está siendo limitada por distintos factores (Pérez, 2010), debido a que entre el año 2005 y 2015, el rendimiento ha venido disminuyendo considerablemente (DANE-Fedearroz, 2015). Uno de los factores que ha traído esta consecuencia, es la presencia de enfermedades que se asocian a los cultivos de arroz, las cuales han incrementado a causa del efecto del cambio climático (Pérez, 2010), debido que *B. glumae* una de las bacterias que afecta al arroz y provoca la enfermedad conocida como añublo bacterial, depende de las condiciones de temperatura, ya que está desarrolla la enfermedad en rangos que oscilan entre los 30 y 37°C (Nandakumar *et al.*, 2009). Esta y muchas otras enfermedades que son originadas por bacterias, anteriormente no presentaban tanta importancia como en la actualidad (Pérez, 2010).

Existen muchos factores bióticos que afectan al cultivo de arroz, entre los cuales se encuentran virus, bacterias, hongos y plagas de diversas especies de artrópodos. La bacteria Gram-negativa *B. glumae* es la que afecta la panícula del arroz, y provoca la enfermedad llamada añublo bacterial. Esta patología ha traído como consecuencia grandes pérdidas económicas en los países productores del grano (Quesada y García, 2014). Tales déficit están representados por un 40% y un 75% en cultivos severamente afectados (Nandakumar

et al., 2009). Además, este fitopatógeno no solo afecta al arroz, sino también a otras especies vegetales, como el tomate, ají, berenjena, ajonjolí, papa y girasol (Jeong *et al.*, 2003).

La presencia del añublo bacterial en las áreas productoras de arroz es un problema muy prevalente. Este ha sido registrado en varios países de América, como Colombia, Estados Unidos, Panamá, Nicaragua, Costa Rica y en algunas naciones del sureste de Asia, como Japón, Tailandia, Vietnam, Corea del Sur, Malasia, Filipinas entre otros. La enfermedad en los últimos años ha tomado mayor fuerza, lo que ha incrementado el interés científico sobre la búsqueda de métodos de control para este fitopatógeno (Zhu *et al.*, 2008; Lim *et al.*, 2009; Ham, Melanson & Rush., 2011).

En Colombia, Fedearroz ha realizado inspecciones fitosanitarias confirmando la existencia de *B. glumae* en distintas zonas arroceras del país (Pérez y Saavedra, 2011). Entre las zonas relacionadas con el patógeno se encuentran la región Caribe, en los departamentos de Córdoba y Bolívar (Pérez, 2009; Pérez y Saavedra, 2011); así mismo en la región andina están involucrados los departamentos del Huila y Tolima (Pérez, 2009). Además, la bacteria ha sido detectada con la técnica de PCR, a partir de estudios realizados con plantas provenientes de los departamentos de Cesar, Meta, Santander, Sucre y Valle del Cauca, indicando así, que este patógeno se encuentra ampliamente distribuido en nuestro país (Mosquera, 2010).

B. glumae está calificado como un fitopatógeno importante, a razón de su incidencia y severidad en los cultivos de arroz (Correa Pérez y Saavedra, 2007). Uno de los principales inconvenientes que presenta esta bacteria para su control es su alta resistencia a

agentes químicos utilizados comercialmente (Maeda, Kiba, Ohnishi, & Hikichi, 2004; Ospina y Beltrán, 2010), sin embargo, existen algunos controles químicos que han demostrado una alta efectividad de inhibición contra la bacteria, como es el caso de ácido oxolínico (Correa *et al.*, 2007; Ospina y Beltrán, 2010), pero así mismo, el aumento de cepas ácido oxolínico resistentes a traído consigo un problema importante para el control definitivo de la bacteria, además de que aún no se han encontrado medidas eficaces para prevenir o combatir las cepas ácido oxolínico resistentes (Ham *et al.*, 2011), por lo que se está incursionando en la solución de este problema con nuevas medidas de control más efectivas (Correa *et al.*, 2007; Pérez y Cristo, 2011).

En los cultivos de ñame se han encontrado problemas fitosanitarios entre los cuales se recalcan su vulnerabilidad en presencia de hongos y virus (Amusa, Adigbite, Muhammed & Baiyewu, 2003; Egesi, Onyeka & Asiedu, 2007; ICA, 2009), cabe resaltar que las enfermedades que son originadas por hongos son las que en Colombia han ocasionado mayores pérdidas, siendo la antracnosis originada por *C. gloeosporioides* la que más lo afecta (Cerón-Rincón, Higuera, Sánchez, Bustamante & Buitrago 2006).

Colletotrihum spp., presenta amplia distribución en las zonas cálidas y templadas del mundo (Pinzon, Bustamante & Buitrago, 2013) y es el responsable de causar un sin número de pérdidas económicas en muchos cultivos (Afanador-Kafuri, Minz, Maymon & Freeman, 2003). A nivel mundial, la antracnosis es la enfermedad más devastadora del cultivo de ñame. En cultivos presentes en el occidente de África, el Caribe, la India y el Pacífico sur, se han registrado Pérdidas de productividad de un 80% de la totalidad de las cosechas (Amusa *et al.*, 2003; Agrios, 2005; Abang *et al.*, 2006). En los cultivos de ñame duramente afectados con este agente fúngico en la región caribe colombiana, ha ocasionado

altas pérdidas que han sido valoradas de hasta un 85% de la producción (Green, Abang & Iloba, 2000).

La antracnosis en primera instancia, fue reportada como un problema que no tenía ninguna importancia desde el punto de vista económico, pero con el paso del tiempo esta enfermedad ha venido aumentando, afectando severamente los cultivos de ñame, hasta el punto que ha llegado a conocerse como una epidemia, que ha acabado con más del 80% de los cultivos en muchas zonas (Reina, 2012). En Colombia este problema fitosanitario registró las mayores pérdidas, con una alta reducción del área cultivada, que pasó de 25.000 ha en 1989 a 4.547 ha en 1990; afectando gravemente a más de 5.000 familias productoras de ñame en muchas zonas de la región caribe como córdoba, bolívar y sucre (Cerón-Rincón *et al.*, 2006; Reina, 2012).

Teniendo en cuenta la problemática presentada en los cultivos de ñame y arroz en Colombia y a nivel mundial debido a la presencia de *C. gloeosporioides* y *B. glumae* y las pérdidas económicas originadas por esta enfermedad, así como el difícil manejo de estos fitopatógenos en campo por la resistencia que han venido mostrando al control químico y los efectos de estos químicos en el ambiente y para la salud de humanos, animales y plantas se planteó como pregunta la siguiente ¿los extractos de diferentes tejidos vegetales de *M. azedarach* y *A. indica* son bioinsumos con actividad inhibitoria contra *C. gloeosporioides* y *B. glumae*?

3. Justificación

Según datos de Corporación Nacional Arrocera (CONARROZ) en el 2012, El arroz ocupa el segundo puesto en cuanto a importancia económica y nutricional para los seres humanos, solo superado por el trigo. Además El arroz es considerado el principal cereal utilizado como fuente de alimentación, debido a que más del 50% de los habitantes del planeta lo tienen como uno de los productos básicos de la canasta familiar (Cristo y Saavedra, 2011). Asimismo el arroz suministra el 20% en cuanto a energía alimentaria para la población mundial. Además el arroz no es solo fuente de energía, si no también representa una alta fuente de vitaminas como tiamina, riboflavina y niacina. El perfil de aminoácidos del arroz muestra que presenta altos contenidos de aminoácidos como ácido glutámico y aspártico (FAO, 2004).

En Colombia el arroz se ubica en el tercer puesto, en cuanto a extensión, estando por delante, el café y el maíz (FAO, 2013). Según el DANE-Fedearroz, entre el año 2000 y 2010 se cultivaron aproximadamente 457.934 ha, con un rendimiento en cada año de 2'224.219 toneladas (DANE-Fedearroz, 2010). Además el cultivo de arroz, está representado en Colombia por un 6 y 10% del valor de la producción agropecuaria y de la actividad agrícola respectivamente, indicando así una gran importancia en la cadena productiva para el sector agrícola nacional (Espinal, Martínez y Acevedo, 2005).

El ñame es un tubérculo que se ha establecido como uno de los productos alimenticios con mayor interés, debido a que es una fuente importante de carbohidratos para una alta demanda de personas que habitan en muchas regiones del planeta, como África, América Central, Sur América, partes de Asia, el Caribe e islas del Pacífico.

Implicando así una extensa comercialización y por ende un papel importante en la economía a nivel mundial (Amusa *et al.*, 2003). Además, a pesar de que el ñame tenga un mayor índice de importancia en regiones tropical y subtropical (Peixoto, Caetano y Lopes, 2000), las evidencias indican que los cultivos de esta especie vegetal se siembran en todo el mundo (Vega, 2012).

Colombia se encuentra entre los primeros 12 países que presentan mayor producción de ñame en todo el planeta, debido que para el año 2010 mostro una producción de 395.374 ton y además ocupo el primer puesto en cuanto a rendimiento con un total de 28,3 ton/ha (Reina, 2012). Su área cultivada se concentra en la región caribe, en los departamentos de Córdoba, Sucre, Bolívar, Cesar y Atlántico, donde se considera un alimento fundamental en el consumo de las comunidades (Bustamante y Buitrago, 2006). Aproximadamente el 92 % de la producción nacional de este producto lo aportan estos departamentos, además beneficia cerca de 18.500 familias de pequeños productores (Álvarez, 2000).

4. Marco teórico

Las enfermedades en los cultivos que son ocasionadas por fitopatógenos, alteran las funciones fisiológicas de las plantas, reduciendo generalmente los rendimientos y en casos extremos provocando la muerte a la misma. Los agentes bióticos causantes de enfermedades son conocidos como patógenos (ejemplo bacterias, hongos, virus, nematodos y fitoplasmas). Desde el punto de vista agrícola, un patógeno está considerado como un organismo que daña los cultivos, disminuyendo su rendimientos y la calidad del producto cosechado (Lastres y Soza, 2009).

4.1 Cultivo de ñame (*Dioscorea spp*)

El ñame se encuentra distribuido en las zonas tropicales y subtropicales que presentan altos índices de lluvia, se encuentra calificado como uno de los tubérculos con mayor importancia agroeconómica a nivel mundial, siendo superado por los cultivos de papa, yuca y batata, además constituye la principal fuente de ingreso y trabajo en muchas zonas rurales del planeta (Vega, 2012; Botanical, 2013). La importancia agroeconómica radica principalmente en los países en desarrollo situados en las zonas tropicales. Este producto es difundido y cultivado en mayores proporciones en el Caribe, África, Asia y Oceanía (Mendes, 2005). De las aproximadamente 600 especies que existen, solo 12 especies son las que se cultivan para el consumo humano, el resto se cultivan con fines medicinales (FAO, 2003).

Entre los problemas fitosanitarios que presentan los cultivos de ñame se resaltan su susceptibilidad a microorganismos patógenos como hongos y virus, sin embargo, las enfermedades producidas por agentes fúngicos son las que en Colombia han ocasionado las

mayores pérdidas, siendo la antracnosis causada por *Colletotrichum* spp. una de las fitopatologías que más lo afecta (Green *et al.*, 2000).

4.1.1 Descripción de la planta de ñame (*Dioscorea* spp)

Las características de la planta pueden cambiar según la variedad de ñame cultivado. Generalmente la planta se presenta en forma de enredadera, puede tener tubérculos aéreos que se denominan bulbillos y tubérculos subterráneos (Hata, Reguero, de García, Buitrago y Álvarez, 2003). Las hojas presentan forma acorazonada con peciolo largos y su disposición es alterna u opuesta; sus tallos son alados o de sección transversal ovalada y flores pequeñas en racimos o en panículas con tres sépalos y tres estambres, aunque las especies comestibles se caracterizan por tener poca floración (Montaldo, 1991). La planta forma un tallo en forma de espiral, siendo posible, la identificación del tipo de ñame a partir de la dirección en la que se forma el espiral. El ñame criollo se enrolla hacia el lado derecho y el ñame espino hacia el izquierdo (Perea y Buitrago, 2000).

4.2 *Colletotrichum gloeosporioides*

Es un parásito facultativo que taxonómicamente se encuentra en el orden Melanconiales. Este microorganismo produce conidias unicelulares que presentan forma ovoide y parcialmente curvadas; la agrupación de conidias muestran un color rosa. Los acérvulos cerosos, que se crean a partir de la infección en los diferentes tejidos son subepidérmicos, típicamente con setas simples, conidióforos cortos y erguidos (Davis, 1993).

4.2.1 Etiología de *Colletotrichum gloeosporioides*

C. gloeosporioides es el agente etiológico de la antracnosis en el ñame. Esta enfermedad es la que más afecta y limita a estos cultivos en todo el planeta. La antracnosis

puede afectar muchos órganos de la planta, como son hojas, peciolo y tallos, que trae como resultado necrosis en el follaje.

C. gloeosporioides cuando penetra los tejidos de la planta, presenta habilidad de patogenicidad hemibiótrofa, la cual empieza por una biotrofia que es asintomática, seguidamente viene una fase necrótropa destructiva donde se expresan los síntomas de la enfermedad, además de la producción de esporas desarrolladas por el patógeno (Bailey, Koronakis, Schmoll & Hughes, 1992). El microorganismo infecta las hojas de las variedades susceptibles de ñame, formando puntos de color negro o marrón, los cuales se unen y se expanden por la hoja generando manchas que reducen notablemente el área fotosintética (Abang, Winter, Mignouna, Green & Asiedu, 2003)

4.2.2 Epidemiología

La transmisión de la enfermedad se da por la dispersión de las conidias del hongo a través de lluvia (Abang *et al.*, 2003). Pero también se pueden esparcir por el viento o por insectos presentes en los cultivos. Asimismo las conidias concurren a muchas formas de ingreso o penetración a la planta a enfermar, una de ellas es aprovechar la abertura que realizan los estomas y lenticelas naturalmente; otra puede ser por alguna herida que presente la planta a causa de picaduras de insectos, o por la penetración directa del hongo por parte del apresorio. Al comienzo de la enfermedad, cuando afecta a los diferentes órganos de la planta, ésta es originada por las conidias y micelios, y a medida que la planta crece y se desarrolla, de igual manera aumenta la cantidad de conidias por parte del hongo que seguirá afectando a la especie vegetal (Tous, 2008).

4.2.3 Antracnosis

La antracnosis es una enfermedad ocasionada por hongos del género *Colletotrichum* spp, (Agrios, 2005). Este género presenta gran importancia científica y económica, a razón de que se encuentra entre los 10 principales patógenos de especies vegetales (Dean *et al.*, 2012).

La antracnosis provoca muerte celular al tejido foliar, generando así, una disminución de la capacidad fotosintética por la disminución de la superficie del área foliar, lo cual trae consigo reducción en la producción del tubérculo, y en ocasiones la muerte de la planta (Abang *et al.*, 2003). La antracnosis se desarrolla en casi todos los tejidos de la planta. Cuando el patógeno ingresa en algún tejido, la enfermedad evoluciona de dos maneras: la primera forma se denomina hemiotrofica intracelular, en el cual el microorganismo se establece en los tejidos, pero sin hacerle ningún daño a la célula (Agrios, 2005) y la otra forma se conoce como necrotrofia subcuticular e intramural, donde el patógeno si es destructivo, creciendo entre la cutícula y la epidermis, afectando las células de la epidermis disolviendo su matriz peptídica (Parra, 2008), provocando hinchazón y disolución de las paredes celulares (O'Connell, 2000).

4.2.4 Ciclo de la antracnosis

Cuando el fitopatógeno está por fuera de la planta, el desarrollo de la enfermedad está limitado por la necesidad de la obtención de agua durante cada una de las fases del ciclo de la antracnosis, debido a que la conidias requieren que haya en la superficie del hospedero una película húmeda, para que estas puedan germinar y penetrar la cutícula y la epidermis (Baquero, 2010). Generalmente cuando los conidios se encuentran en la superficie del hospedero forman un tubo germinativo corto, y luego se diferencian en un apresorio transcurridas de 12 a 24 horas. Esta parte del ciclo es desencadenada por la

producción de determinadas proteínas, que son estimuladas por señalización del hospedero. (Cano, Guarro & Gené, 2004; Agrios, 2005; Munch *et al.*, 2008).

4.2.5 Sintomatología de la antracnosis

Generalmente las heridas que produce la enfermedad son marrones o parcialmente negras, con tamaños de 0,2 a 2cm de diámetro, estas marcas se pueden unir entre sí, formando manchas muy prolongadas que reducen el área fotosintética (Abang *et al.*, 2003; Amusa *et al.*, 2003).

En pruebas de laboratorio, se han señalado básicamente dos síntomas que presenta la planta en presencia de la enfermedad. La primera se distingue como lesiones necróticas circulares, con colores que van de café oscuras a negras que no se unen entre sí, y que presentan un halo clorótico brillante, que predice el efecto de una toxina que es producida por el microorganismo. El segundo síntoma se identificó como manchas de color café e irregulares, con halos cloróticos diversos, en las hojas de la planta (Abang *et al.*, 2003; Abang *et al.*, 2009).

4.2.6 Control de la antracnosis

La siembra de semillas sanas, la poda y quema de material contaminado, el uso de fungicidas (benomyl, manzeb, mancozeb, clorotalonil, captafol y folpet) y biocontroles, hacen parte de los controles de la antracnosis. El uso del control a utilizar es dependiente en gran medida de su disponibilidad (Abang *et al.*, 2003; Agrios, 2005; Aduramigba-Modupe *et al.*, 2008).

La opción más rápida y accesible es el uso de materiales químicos. Estos materiales se están utilizando de una forma excesiva, a razón de la severidad del problema. Con esto se ha logrado en principio, un control de los inóculos, pero en muchos casos no se ha

presentado un control radical. Así mismo el uso extensivo y abusado de estos fungicidas ha aumentado la contaminación ambiental y ha generado cepas resistentes por parte del microorganismo (Abang *et al.*, 2003; Pérez, Saquero y Beltrán, 2003; Agrios, 2005; Aduramigba-Modupe *et al.*, 2008).

4.3 Cultivo de arroz (*Oryza sativa*)

La importancia socioeconómica que muestra la especie *Oryza sativa*, radica principalmente en la extensa área de cosecha que presenta su cultivo. La zona de mayor producción de este alimento se halla en Asia, específicamente en India, China, Indonesia, Tailandia y Bangladesh, con un total del 77% de la producción de todo el planeta (FAO, 2005).

4.3.1 Descripción de la planta de arroz (*Oryza sativa*)

El arroz es una planta muy variable, se han registrado más de 100.000 ejemplares, que también presentan estructuras morfológicas muy variables (León, 2000). Generalmente planta de arroz es una gramínea anual, su tamaño puede ir de 0.4 a 7 m de altura, sus tallos son redondos y huecos compuestos por nudos y entrenudos, las láminas fóliales son largas y planas, las cuales se adhieren al tallo por la vaina. Presenta flores compuestas (inflorescencia) en panícula que se encuentra en la cima del tallo, donde esta resguardada por una hoja terminal más ancha y corta que el resto de láminas fóliales (Arregoces, Rosero y González., 2005).

4.4 *Burkholderia glumae*

B. glumae (Kurita & Tabei) esta reportada como una bacteria fitopatógena, que es el agente responsable de producir la enfermedad del añublo bacteriano de la panícula del arroz (Urakami, Ito-Yoshida & Araki, 1994). *B. glumae* es un bacilo Gram negativo aerobio, que presenta de 2 a 4 flagelos y ausente de esporas, su tamaño es variado, puede medir de 1,5-

2,5 μm de largo y 0,5-0,7 μm de diámetro. Tiene la capacidad de crecer entre una temperatura de 11-4°C, pero su temperatura optima esta entre 30-35°C (Brenner, Krieg, Staley & Garrity, 2005). La bacteria sobre el medio King B no produce pigmentos luminiscentes. Además el desarrollo de las colonias es lento y presentan forma circular, engrandecida y con bordes lisos (Saddler, 1994).

4.4.1 Etiología de *Burkholderia glumae*

La bacteria *B. glumae* ataca principalmente las semillas germinadas, incapacita a las raíces y las vainas de las hojas inferiores y de esta forma empieza a desarrollarse sobre la especie vegetal como un organismo epífita. Los síntomas se presentan cuando la planta comienza a florecer. Cuando la bacteria se reproduce activamente empieza a invadir las espigas a través de los estomas o a través de las glumas cuando estas presentan heridas en su epidermis (Sayler, Cartwright & Yang, 2006; Zhou *et al.*, 2011), luego la bacteria rápidamente coloniza las espigas y se alimenta de los azucares producidos por la planta para el desarrollo del grano (Hikichi, Okuno & Furusawa, 1994). De hecho, la bacteria muestra mayor virulencia en panícula que en el resto de la planta (Nandakumar *et al.*, 2009), que puede ser, debido a que en esta parte de la planta hay mayor densidad bacteriana (Quesada y García, 2014).

La formación de altas densidades por la multiplicación de *B. glumae* genera la producción de la toxoflavina, la cual, mediante generación de peróxido de hidrógeno, trae como consecuencia daño en las hojas y el taponamiento de los haces vasculares, imposibilitando que los azucares como monosacáridos y disacáridos sean transportados para la síntesis del almidón en la panícula (Mahenthiralingam, Urban & Goldberg, 2005).

4.4.2 Epidemiología

B. glumae es una bacteria que se transfiere normalmente mediante semilla que se encuentren infectadas, y es por esa causa, que esta se esparce a diferentes regiones en la exportación e importación de semilla (Sayler *et al.*, 2006).

La propagación de *B. glumae* se puede presentar de diferentes maneras, una de ella es por salpicadura, otra puede ser por el viento, por la lluvia, también por el acercamiento y contacto entre panículas, provocando así un foco de infección. Además de esto las temperaturas altas, la alta humedad y las precipitaciones frecuentes ayudan a la evolución del brote (Zhou *et al.*, 2011)

4.4.3 Añublo bacterial

El cultivo de arroz es muy sensible a la presencia de enfermedades y especialmente a las que son provocadas por bacterias, estas últimas no presentaban mucha importancia hace algún tiempo. *B. glumae* es una bacteria aeróbica, Gram negativa, y hace parte del subfilum beta-proteobacteria, esta es una de las bacterias responsables de causar la enfermedad conocida como el añublo de la panícula del arroz. La sintomatología de del añublo se puede presentar en distintas partes de la especie vegetal, por ejemplo en la plántula, en la lámina foliar que protege la panícula y en las espiguillas. En las panículas afectadas, las espiguillas muestran una coloración rojiza y los granos presentan decoloración. En la planta la bacteria se multiplica rápidamente y las señales de los síntomas emergen cuando la bacteria entra en contacto con la panícula. Algunos estudios indican que cuando la bacteria es inoculada sobre la panícula de arroz, los síntomas comienzan a expresarse después de tres días de la inoculación y a partir de esta, se afectan el resto de panículas de forma consecutiva, mostrando así una mayor gravedad en cuanto a la incidencia de la enfermedad a los diez días (Nandakumar *et al.*, 2009).

4.4.4 Ciclo del añublo bacterial

El ciclo de la enfermedad aún está en discusión (Ham *et al.*, 2011). La semilla es la encargada de transmitir la bacteria (Sayler *et al.*, 2006; Zhu *et al.*, 2008), esta se encuentra al interior de la lema del grano de arroz (Tsushima, 2011).

La pudrición es originada por el aumento de la densidad de *B. glumae* en las plúmulas (Hikichi, Tsujiguchi, Maeda & Okuno, 2001). Cuando las plántulas son sembradas, la bacteria puede ser aislada normalmente de láminas foliares inferiores, donde crece de forma epífita en la etapa de macollamiento (Sayler *et al.*, 2006). Aunque la sintomatología se presenta primero en las panículas antes que en las láminas foliares, la bacteria también puede ser hallada en las láminas foliares inferiores y hoja bandera (Hikichi *et al.*, 2001). El patógeno que se encuentra en las láminas foliares, cumple una función importante como fuente de inóculo primario de la pudrición del grano, puesto que la parte crítica de la enfermedad se manifiesta en formación de la panícula (Zhang, 2004). Luego de que el patógeno se establece en las espiguillas, este aumenta sus poblaciones y finalmente ocasiona la pudrición del grano (Sayler *et al.*, 2006)

4.4.5 Sintomatología del añublo bacterial

El añublo se caracteriza por la presencia de manchas café o decoloración de la panícula a causa del proceso de clorosis. Al inicio de la enfermedad algunos órganos de la planta como ramas y panículas se conservan verdes, sin heridas ni de decoloración y las flores afectadas suspenden su crecimiento o son abortadas por la planta. Las panículas pueden tener pocas o todas las flores enfermas (Yang, 2004), y los granos pueden presentar diferentes estados de decoloración, lo cual estará relacionado con la intensidad de la infección (Zhou *et al.*, 2011).



Figura 1. Síntomas en el arroz causados por *B. glumae*. A: Panículas afectadas. B: Grados de decoloración de los granos de arroz. Fuente: Zhou *et al.*, 2011

4.4.6 Control del añublo bacterial

Gómez, Cardozo y Echeverri, (2010) evaluaron el efecto sobre el crecimiento de *B. glumae* con distintos materiales químicos, como kasugamicina, oxitetraciclina, óxido cúprico, ácido oxolínico, validacin A, entre otros, y llegaron a la conclusión que el control químico contra la bacteria es poco efectivo. No obstante, se ha demostrado en otras investigaciones que el ácido oxolínico (AO) es un tratamiento positivo, el cual inhibe el crecimiento bacterial en las plúmulas y las espiguillas, y por ende evita la pudrición de la planta y la del grano de arroz con alta eficacia (Hikichi, Okuno & Furusawa, 1994).

4.5 Extractos vegetales

Están definidos como bioinsumos agrícolas, compuestos por sustancias de origen vegetal, que se obtienen a partir de una o más especies de plantas con propiedades repelentes o biocidas (Cock y Jiménez, 2006). Los extractos vegetales pueden ser repelentes, o pueden ser directamente tóxicos (Lampkin, 2001). El uso de extractos vegetales en contra de plagas es una práctica muy antigua, la cual ha mostrado resultados tanto positivos, como negativos, pero el desarrollo de insecticidas sintéticos con alto grado de eficiencia, ocasiono que estas prácticas fueran dejadas de usar (Salazar y Betancourth,

2009). Los científicos han evaluado diferentes extractos de origen vegetal, con la finalidad de que su trabajo sea más eficaz, su espectro de actividad más amplio, que no ocasionen efectos desfavorables y que no permitan la evolución de cepas resistentes (Bernal, Zamora, Virgen & Nuño, 2005).

4.6 *Azadirachta indica* A. Juss.

A. indica más conocido en Latinoamérica como Nim o Neem, y en la India como margosa, es un árbol perteneciente a la familia Meliaceae originario de la India y de Birmania, que sólo vive en regiones tropicales y subtropicales.

Los extractos de *A. indica* (Neem) se han usado en tratamientos médicos en la antigüedad, desde hace unos 4.500 años aproximadamente. Las propiedades terapéuticas de esta planta son numerosas y se conocen desde hace mucho tiempo. Quizás mucho antes de que se descubriera las cualidades analgésicas del árbol del sauce, del cual extraen la aspirina, ya que los fitoterapeutas de la India antigua ya habían descrito las aplicaciones del Neem (Gualtieri *et al.*, 2008)

4.7 *Melia azederach* L.

Es una especie vegetal conocida popularmente como árbol del Paraíso pertenece a la familia Meliaceae, del orden de las Sapindales. Una de sus características principales es que produce hojas y frutos en gran cantidad (Do Vale, 2004). Comúnmente esta familia produce una variedad de compuestos como lo son los terpenoides y los limonoides (tetraterpenos), los cuales están considerados unos de los metabolitos secundarios más bioactivos (Judd, Campbell, Stevens & Donoghue, 2008). Estos árboles son nativos de Asia y Australia meridional. Esta especie es cultivada ampliamente con propósitos ornamentales

y presenta una buena adaptación en zonas tropicales y subtropicales (Huertas, Chiffelle, Lizana & Araya, 2008).

5. Objetivos

General

Evaluar *in vitro* el efecto inhibitorio de extractos vegetales de diferentes tejidos de *A. indica* y *M. azedarach* contra los fitopatógenos *B. glumae* y *C. gloeosporioides* causantes del añublo bacterial de la panícula del cultivo de arroz y de la antracnosis del cultivo del ñame, respectivamente.

Específicos

Obtener extractos a partir de diferentes tejidos de *A. indica* y *M. azedarach*, utilizando como técnica de extracción, equipo soxhlet.

Determinar el periodo de máxima germinación de *C. gloeosporioides*.

Evaluar *in vitro* la actividad inhibitoria de los extractos vegetales de *A. indica* y *M. azedarach* a diferentes concentraciones contra *B. glumae*, y contra la germinación de conidias y crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Caracterizar químicamente mediante la técnica cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa los extractos de los diferentes tejidos de *A. indica* y *M. azedarach*.

6. Metodología

6.1 Sitios de muestreo

Las muestras de las especies de *A. indica* y *M. azedarach* se recolectaron en la ciudad de Sincelejo. Las pruebas de laboratorio y procesamiento de las muestras se realizaron en el laboratorio de investigaciones microbiológicas de la Universidad de Sucre.

6.1.2 Material recolectado

Del material recolectado de *A. indica* y *M. azedarach*, una parte se utilizó para la obtención de extractos; la otra parte del material vegetal se llevó al laboratorio de Conservación de la Universidad de Sucre, para su respectiva confirmación taxonómica.

6.1.3 Secado y molienda

Las hojas y semillas de *A. indica* y *M. azedarach* se deshidrataron en un horno a temperatura de 45°C por 24 horas, posterior a este tiempo se pulverizaron en una licuadora industrial.

6.1.4 Obtención de los extractos vegetales

Los diferentes tejidos de *A. indica* y *M. azedarach* (hojas, frutos y semillas) una vez deshidratadas y molidas, se pesaron aproximadamente 100 gramos para la obtención de los extractos vegetales. Se utilizó como solvente etanol analítico empleando un equipo Soxhlet con cartuchos de celulosa (Vitola y Pérez, 2016). Una vez obtenidos los extractos se concentraron en un rotaevaporadora presión y temperatura reducida teniendo en cuenta el solvente a usar (Anexo 1).

6.1.5 Determinación del rendimiento del extracto

El rendimiento del extracto se calculó mediante método propuesto por Dellavalle *et al.* (2011), a partir de la siguiente ecuación:

$$\text{Rendimiento (\%)} = ((W_a/W_b) \times 100) - 5\%$$

Donde W_a corresponde al peso del extracto seco, W_b al peso del material vegetal seco y molido, además el 5% del error del proceso.

6.2 Fitopatógenos

El hongo que se utilizó para los ensayos antifúngico, fue una cepa aislada por el grupo de Investigación de Bioprospección Agropecuaria del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de Sucre, a partir de hojas de ñame variedad espino (*Dioscorea rotundata*) (figura 4).

La bacteria *B. glumae* causante de la enfermedad del añublo bacterial de la panícula del cultivo de arroz, fue cedida por el Centro de Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) (figura 5)

6.3 Actividad antibacteriana de los extractos contra *B. glumae*

Se utilizaron placas de Elisa de 96 pozos, en cada pozo se adiciono 100µL de una suspensión de bacterias ajusta con concentración equivalente a una absorbancia de 0,1 a 0,08 a 625nm y el mismo volumen de los tratamientos, los cuales fueron extractos a concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20% (Anexo 6 y 7). En cada placa se incluyó un testigo, un control positivo (ácido oxolínico) y un control negativo (tween 20 al 1%). El ensayo se realizó por triplicado. La prueba se incubo a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 20 horas a 160 rpm.

Pasado este tiempo de incubación, se tomaron 5µL de cada pozo y se agregaron en 15ml de agua destilada estéril, luego se inocularon 10µL de la disolución sobre la superficie de agar King B para determinar el porcentaje de inhibición por unidades formadoras de colonias (UFC) y se incubo por 3 días a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Porcentaje de Índice Bactericida (%I.B)= $100 - (\text{UFC experimental/control}) \times 100$.

6.3.1 Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC)

Se utilizaron placas de Elisa de 96 pozos, en cada pozo se adiciono 100 μ L de una suspensión de bacterias ajusta con concentración equivalente a una absorbancia de 0,1 a 0,08 a 625nm y el mismo volumen de los tratamientos (Anexo 8 y 9). En cada placa se incluyeron los respectivos controles. El ensayo se realizó por triplicado. Luego se incubo por 3 días a $35\pm 2^{\circ}\text{C}$.

Luego del tiempo de incubación, se usaron diluciones seriadas para los tratamientos que mostraron inhibición cercanas al 100%, aplicando la metodología de unidades formadoras de colonias (UFC) anteriormente descrita.

La MIC de los extractos se definió como la concentración más baja de los tratamientos que mostrara inhibición del crecimiento bacteriano $\geq 90\%$ a los 2-3 días de incubación (Consentino *et al.*, 1999). La MBC de los extractos se definió como la concentración más baja de los tratamientos que no mostraron crecimiento bacteriano o provocaron la inhibición del crecimiento alrededor del 100% a los 5 días de incubación.

6.4 Curva de germinación de conidias de *C. gloeosporioides*

Esta prueba se realizó con el objetivo de determinar el período de máxima germinación de la cepa de *C. gloeosporioides* donde se utilizó como sustrato Tween 20 al 1% y 0.85% de NaCl. Para el desarrollo de esta prueba se utilizó la cepa del hongo incubado durante 16 días en medio PDA con intervalos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. Al día 16 se realizó la extracción de conidias por adición de 20ml de Tween 20 al 1% y 0.85% de NaCl. Se realizaron lecturas cada dos horas en cámara de Neubauer hasta un período de 24 horas. Se tuvo en cuentas las siguientes variables:

Espora germinada: cuando el tubo germinativo alcanza el doble del diámetro de la conidia (Alzate, Mier, Afanador, Durango & García, 2008).

Espora no germinada: no hay crecimiento del tubo germinativo (Alzate *et al.*, 2008).

6.4.1 Inhibición de la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*

Adicionalmente a la curva de germinación se realizó la prueba de inhibición de la germinación utilizando placas de Elisa de 96 pozos, en cada pozo se adiciono 100µL de una suspensión de conidias ajustada a 1×10^6 conidias/ml y el mismo volumen de los tratamientos, los cuales fueron extractos a concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20% (Anexo 2 y 3), además de un testigo, un control positivo (benomil 2%) y un control negativo (tween 20 al 1% y 0.85% DE NaCl). El ensayo se realizó por triplicado. La prueba se incubo a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ hasta el periodo de máxima germinación, determinado en la curva de germinación durante 24 horas. Después se siguió la metodología propuesta por Conti *et al.* (2013) con leves modificaciones, donde se tomaron 50µL de cada tratamiento y se inocularon en cajas de Petri con medio Sabouraud, y se incubo durante 3 días a $30 \pm 2^\circ\text{C}$. Luego se determinó el porcentaje de inhibición en la germinación por unidades formadoras de colonias (UFC)

Inhibición de la Germinación (%I.G) = $100 - ((\text{UFC experimental}) / \text{control} \times 100)$.

6.4.2 Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (MFC), de germinación de conidias.

Para esta prueba se usaron concentraciones seriadas de los extractos que mostraron inhibición cercana al 100%. Los valores de la MIC y MFC se calcularon sobre la germinación de las conidias. Se usaron microplacas de 96 pozos en los cuales se mezclaron 100µL de una solución de conidias ajustada a 1×10^6 conidias/ml y 100µL de cada

tratamiento (Anexo 4 y 5). En cada placa se incluyeron los respectivos controles. El ensayo se realizó por triplicado. El ensayo se incubó a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 24 horas.

Después se siguió la metodología anterior propuesta por Conti *et al.* (2013) con modificaciones.

La MIC de los extractos se definió como la concentración más baja de los tratamientos que mostrara inhibición de la germinación $\geq 90\%$ a los 2-3 días de incubación (Consentino *et al.*, 1999). La MFC de los extractos se definió como la concentración más baja de los tratamientos que no mostraron germinación visible de las conidias o provocaron la inhibición de la germinación alrededor del 100% a los 5 días de incubación.

6.5 Inhibición del crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*

Para la prueba de inhibición del crecimiento micelial se siguió la metodología de siembra directa propuesta por Vitola y Hernández (2015) con modificaciones. En esta prueba se utilizaron aislados de aproximadamente 7 mm de diámetro de área de crecimiento de *C. gloeosporioides* los cuales se sembraron sobre la superficie del medio PDA enriquecido con cloranfenicol, rifampicina y ampicilina. A cada aislado sembrado se le adicionó 60 μL de cada tratamiento, los cuales fueron extractos a concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20%, con el objetivo de que el aislado quedara bien impregnado, además de un testigo, un control positivo (benomil 2%) y un control negativo (tween 20 al 1 %). El ensayo se realizó por triplicado. Los ensayos se incubaron a $30\pm 2^{\circ}\text{C}$ por 8 días en intervalos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad. La actividad antifúngica se evaluó midiendo el crecimiento radial de cada aislado con los diferentes tratamientos en el día octavo. El resultado se interpretó como porcentaje de índice antifúngico mediante la siguiente ecuación:

$$\text{Porcentaje de Índice antifúngico (\%I.A)} = [1 - (D_a/D_b)] \times 100$$

Donde D_a corresponde al crecimiento micelial de cada tratamiento y D_b al crecimiento del testigo absoluto (Guo *et al.*, 2008).

6.5.1 Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (MFC).

Los valores de la MIC y MFC se calcularon sobre el crecimiento micelial en PDA enriquecido con cloranfenicol, rifampicina y ampicilina e incubados a $30 \pm 2^\circ\text{C}$ teniendo en cuenta el testigo absoluto y el control negativo.

La MIC de los extractos se definió como la concentración más baja de los tratamientos que mostraron inhibición del crecimiento $\geq 90\%$ a los 8 días de incubación (Consentino *et al.*, 1999). La MFC de los extractos se definió como la concentración más baja de los tratamientos que no mostraron crecimiento visible del hongo o provocara la inhibición del crecimiento alrededor del 100% a los 14 días de incubación.

6.6 Análisis por cromatografía de gases/ espectrómetro de masa (GC/MS).

La determinación de los componentes químicos de los extractos etanólicos se efectuó mediante la técnica instrumental de Cromatografía de Gases con detector selectivo de Masa (GC/MS), utilizando un cromatógrafo de gases Agilent Technologies 7820A GC y espectrómetro de masas Agilent Technologies 5977E columna HP-5MS largo: 30 m; diámetro: 0.24 mm espesor de la fase estacionaria: 0.25m

6.7 Análisis estadístico

Se realizó un diseño de bloques completamente al azar con arreglo factorial. Se hizo un análisis de varianza para establecer la correlación de la actividad inhibitoria en función de la concentración y el tipo de extracto, además de una prueba múltiple de rango de

Tuckey. El análisis estadístico se desarrolló utilizando el programa Statgraphics Centurión XVI.

7. Resultados

7.1 Clasificación científica del material vegetal

El material vegetal fue identificado por el Herbario de la Universidad de Sucre como *Azadirachta indica* Y *Melia azedarach*, bajo voucher 000041 y 000566 respectivamente (Figura 2).

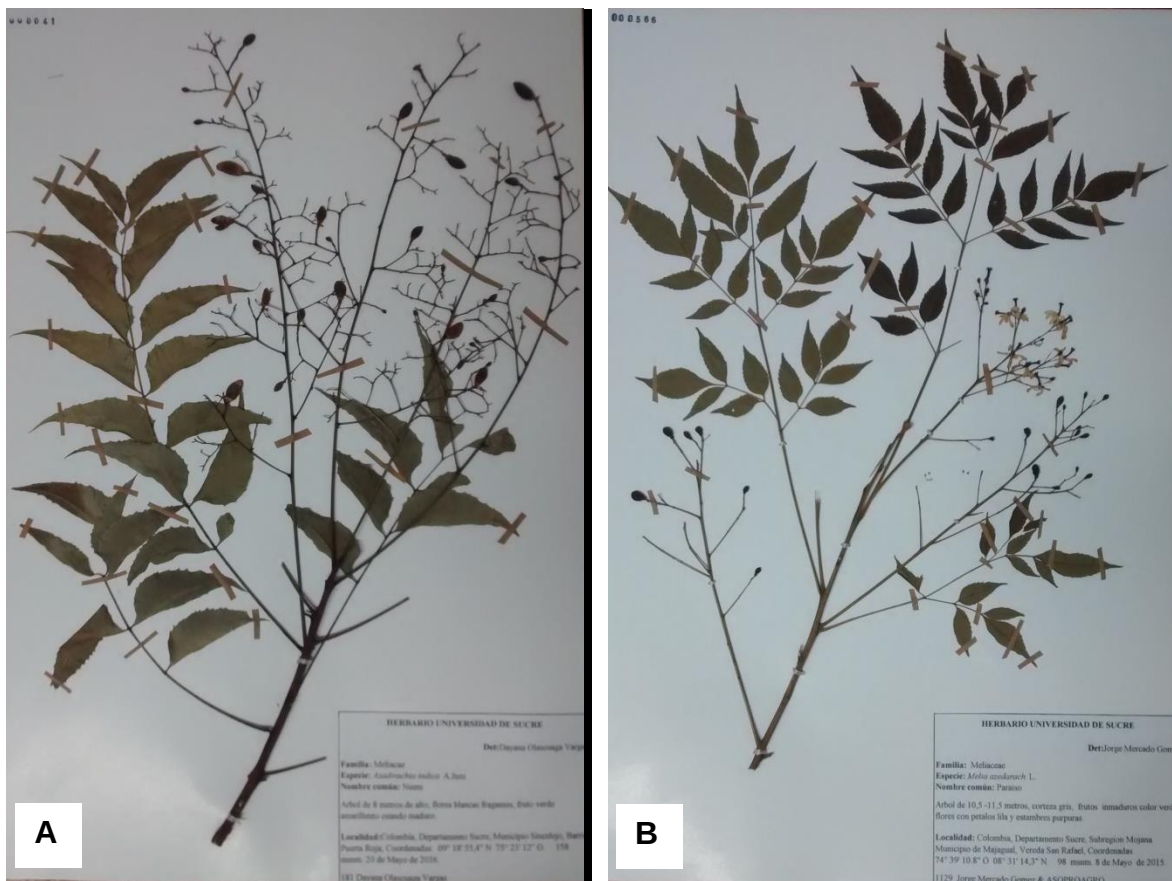


Figura 2. Identificación taxonómica del material vegetal. A: muestra identificada como *A. indica*, voucher 000041. B: muestra identificada como *M. azedarach*, voucher 000566. Fuente: Laboratorio de Conservación Biológica, herbario de la universidad de Sucre 2017.

7.2 Obtención de los extractos vegetales

Se obtuvieron 3 extractos totales etanólicos de *M. azedarach* (hojas, fruto y semilla) y 2 de *A. indica* (hojas y frutos) mediante la técnica de extracción, utilizando un equipo Soxhlet como se muestra en la Figura 2.

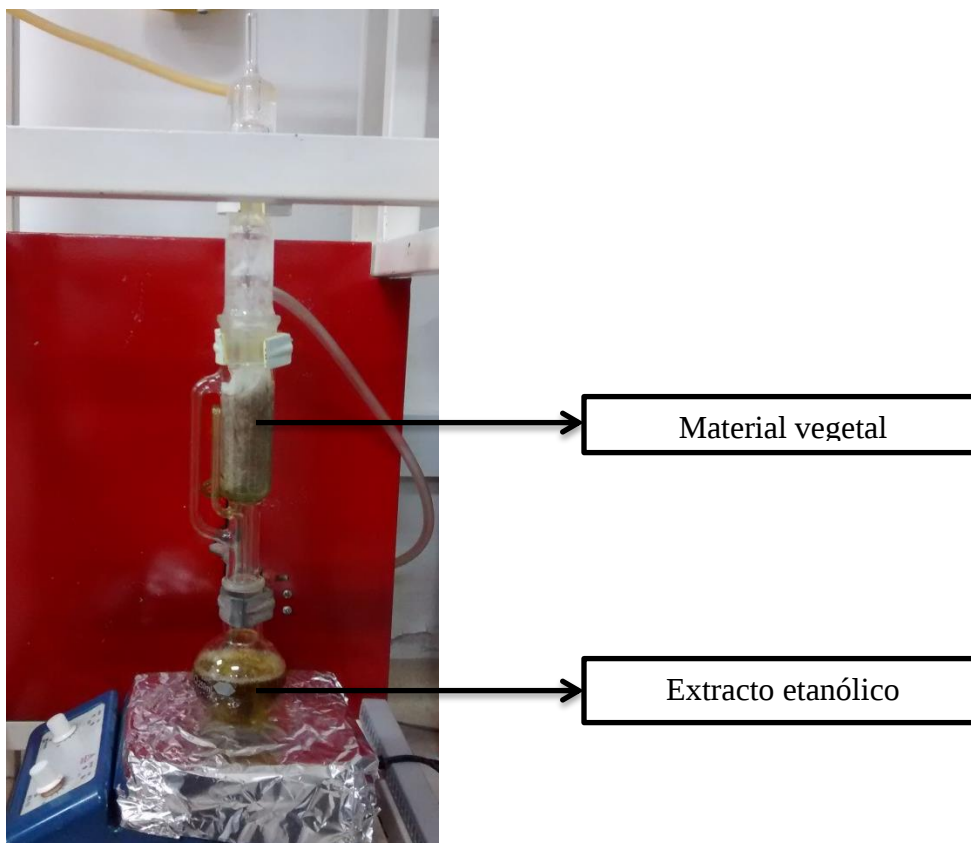


Figura 3. Obtención de extractos etanólicos de diferentes tejidos de *A. indica* y *M. azedarach* utilizando equipo Soxhlet.

7.3 Determinación del rendimiento de la extracción

En la tabla 1 se registra los rendimientos obtenidos de los extractos de Neem (*azadirachta indica*) y Melia (*Melia azedarach*). Los rendimientos obtenidos para cada uno de los extractos vegetales etanólicos se detallan en la tabla 1, en la cual se observa que los extractos de *A. indica* presentaron mejor rendimiento con un porcentaje del 10.19 y 7.84 para hoja y fruto respectivamente.

Tabla 1.

Rendimientos de los extractos de Neem y Melia

Extracto	Wa	Wb	Rendimiento
Hojas de Neem (HN)	10.8	100.6	10.19

Fruto de Neem (FN)	7.6	100.5	7.84
Hojas de Melia (HM)	8.5	100.3	7.75
Fruto de Melia (FM)	7	100.6	6.58
Semilla de Melia (SM)	7	100.8	6.63

7.4 Fitopatógenos

En la figura 4 se observa el crecimiento cultural de *C. gloeosporioides* en medio agar PDA y en la figura 5 las características de crecimiento de *B. glumae* en medio agar King B.



Figura 4. Cepa de *C. gloeosporioides* aislada por el grupo de Investigación de Bioprospección Agropecuaria del Laboratorio de Investigaciones Microbiológicas de la Universidad de Sucre



Figura 5. *B. glumae* cedida por el Centro de Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).

7.5 Actividad antibacteriana de extractos vegetales de diferentes tejidos de *A. indica* y *M. azedarach* contra *B. glumae*.

Los resultados de %I.B se presentan con base a cada especie vegetal trabajada, para mejor interpretación de las figuras 6, 7, 8 y 9.

7.5.1 Actividad antibacteriana de los extractos de diferentes tejidos de *A. indica* contra *B. glumae*

Los resultados obtenidos de la prueba *in vitro* de la actividad inhibitoria antibacteriana de los extractos de diferentes tejidos de *A. indica* contra la bacteria *B. glumae* como se evidencia en la tabla 2 y figura 6, indican que hubo inhibición del 100% , en hojas y frutos de Neem. Siendo el bioproducto más eficiente el de FN a una concentración del 15%

Tabla 2

Prueba general de Porcentaje de índice antibacteriano de extractos vegetales de *A. indica* contra *B. glumae*.

Extractos	1%	5%	10%	15%	20%
HN	15.278	74.781	91.594	97.040	100
FN	69.773	83.077	97.917	100	100

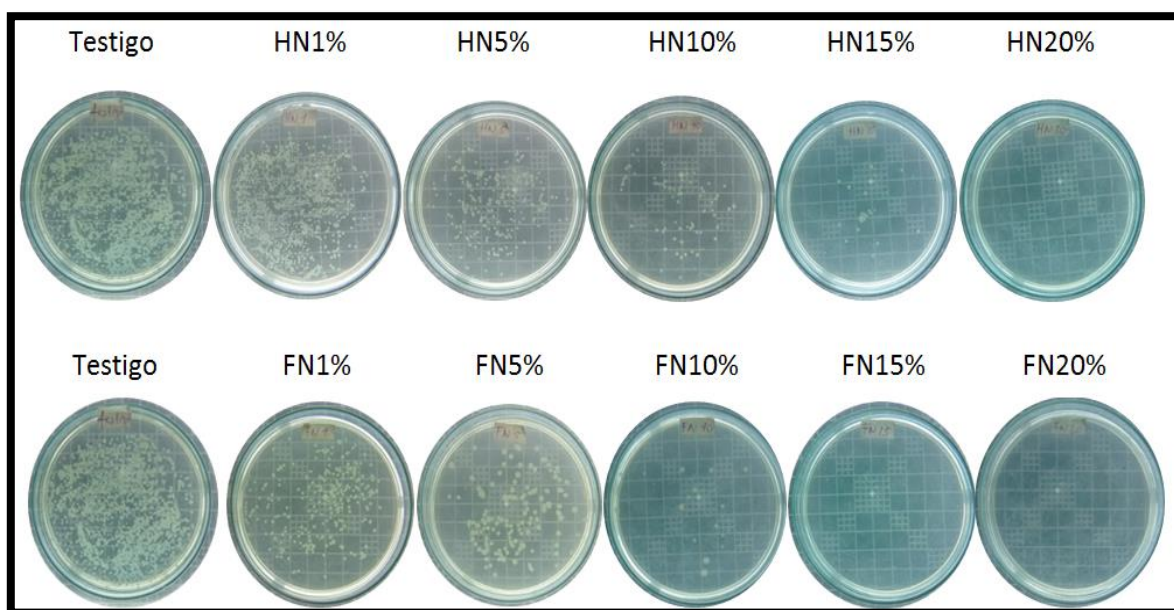


Figura 6. Ensayo *in vitro* de actividad inhibitoria de los diferentes tejidos de *A. indica* (Neem) contra *B. glumae*. (HN-hojas de Neem; FN-frutos de Neem)

7.5.2 Actividad antibacteriana de los extractos de diferentes tejidos de *M. azedarach* contra *B. glumae*

Los resultados obtenidos de la prueba *in vitro* de la actividad inhibitoria antibacteriana de los extractos de diferentes tejidos de *M. azedarach* contra *B. glumae* como se evidencia en la tabla 3 y figura 7, señalan que hubo inhibición completa tanto en hojas, frutos y semillas de Melia. Siendo el bioproducto más eficiente el de FM y SM a una concentración del 15%.

Tabla 3

Prueba general del porcentaje de índice antibacteriano contra de extractos vegetales de *M. azedarach* *B. glumae*.

Extractos	1%	5%	10%	15%	20%
HM	4.459	63.852	72.624	96.491	100
FM	59.247	72.514	77.083	100	100
SM	10.782	25.585	85.746	100	100

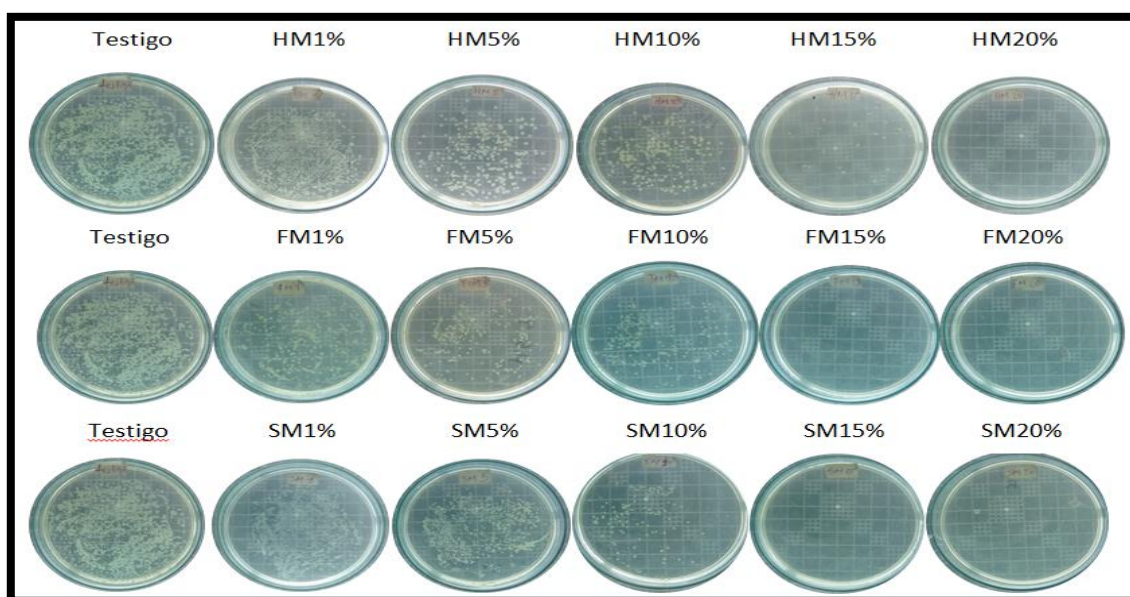


Figura7. Ensayo in vitro de actividad inhibitoria de los diferentes tejidos de *M. azedarach* (Melia) contra *B. glumae*. (HM-hojas de Melia; FM-frutos de Melia y SM-semillas de Melia)

7.5.3 MIC Y MBC de los extractos de diferentes tejidos de *A. indica* contra *B. glumae*.

Los resultados de MIC y MBC de los extractos de diferentes tejidos de *A. indica* (figura 8), indicaron que MIC para el bioproducto HN fue del 16% con un %I.B del 99.76% y el MBC fue del 17% (tabla 4). Para el bioproducto FN, la MIC fue del 10% con un %I.B del 98.17% y la MBC fue del 11% (tabla 5).

Tabla 4

MIC y MBC de extracto de HN contra *B. glumae*.

Extractos	15%	16%	17%	18%	19%	20%
HN	97.579	99.758	100	100	100	100

Tabla 5

MIC y MBC de extracto de FN contra *B. glumae*.

Extractos	10%	11%	12%	13%	14%	15%
FN	98.167	100	100	100	100	100

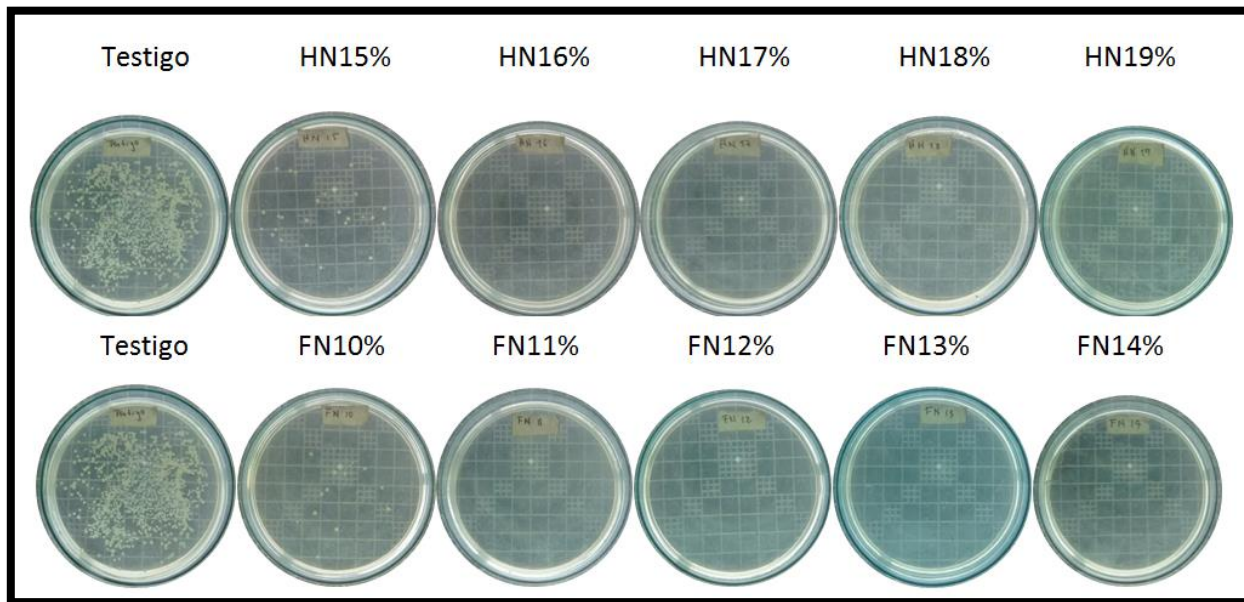


Figura 8. MIC y MBC de los extractos de HN y FN de *A. indica* contra *B. glumae*. (HN-hojas de Neem; FN-frutos de Neem).

7.5.4 MIC Y MBC de los extractos de diferentes tejidos de *M. azedarach* contra *B. glumae*.

Los resultados de MIC y MBC de los extractos de diferentes tejidos de *M. azedarach* (figura 9), indicaron que MIC para el bioproducto HM fue del 16% con un %I.B del 99.41 y el MBC fue del 17% (tabla 6). Para el bioproducto FM, la MIC fue del 14% con un %I.B del 99.62 y la MBC fue del 15%. Para el bioproducto SM, la MIC fue del 14% con un %I.B del 98.31 y la MBC fue del 15% (tabla 7).

Tabla 6

MIC y MBC de extracto de HM contra *B. glumae*.

Extractos	15%	16%	17%	18%	19%	20%
HM	95.987	99.412	100	100	100	100

Tabla 7

MIC y MBC de extractos de FM y SM contra *B. glumae*.

Extractos	10%	11%	12%	13%	14%	15%
FM	81.114	91.111	94.569	98.063	99.619	100
SM	83.916	87.928	91.214	93.186	98.305	100

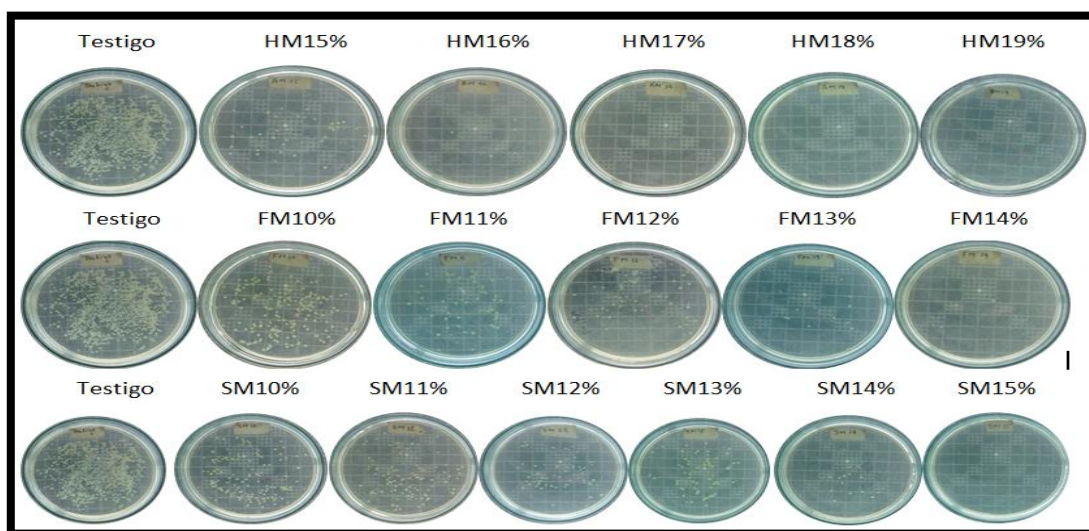


Figura 9. MIC y MBC de los extractos de HM, FM y SM de *M. azedarach* contra *B. glumae*. (HM-hojas de Melia; FM-frutos de Melia y SM-semillas de Melia).

7.6 Actividad antifúngica de extractos vegetales de diferentes tejidos de *A. indica* y *M. azedarach* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*.

Los resultados de %I.G se presentan con base a cada especie vegetal trabajada. Para mejor interpretación de las figuras 11, 12, 13 y 14.

7.6.1 Curva de germinación de conidias de *C. gloeosporioides*

En la figura 10, se observa las etapas del proceso de germinación de las conidias de *C. gloeosporioides* utilizando una solución de Tween 20 al 1% y NaCl al 0,85%. Las imágenes fueron observadas en el objetivo 40X. La curva de germinación de conidias de la cepa de *C. gloeosporioides* mostró el periodo de máxima germinación a las 18 horas de incubación a $28^{\circ}\pm 2^{\circ}\text{C}$, después de este periodo el porcentaje de germinación se mantuvo constante (grafica 1).

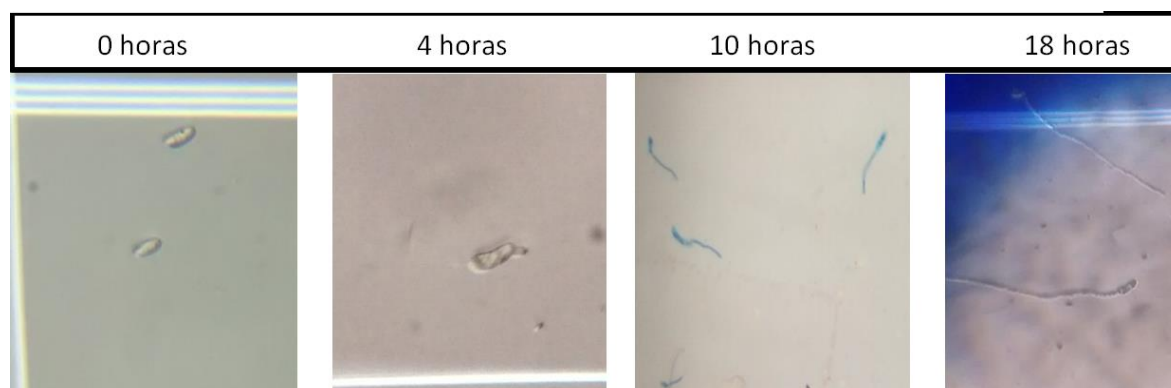


Figura 10. Etapas del proceso de germinación de las conidias de *C. gloeosporioides* utilizando una solución de Tween 20 al 1% y NaCl al 0,85%. Imágenes a 40X.

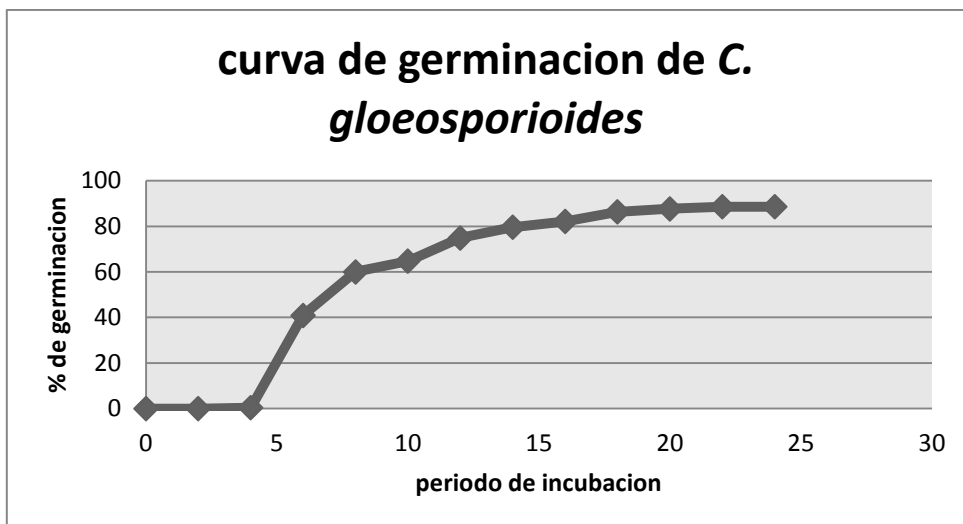


Gráfico 1. Curva de germinación de conidias de *C. gloeosporioides* mostrando máxima germinación de 85,7% a las 18 horas de incubación.

7.6.2 Actividad antifúngica de los extractos vegetales de diferentes tejidos de *A. indica* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*.

Los resultados obtenidos de la prueba *in vitro* de la actividad inhibitoria antifungica de los extractos de diferentes tejidos de *A. indica* contra *C. gloeosporioides* como se evidencia en la tabla 8 y figura 11, indican que hubo inhibición completa tanto en hojas como en frutos de Neem. Mostrando los dos bioproductos inhibición del 100% a concentración del 10%

Tabla 8

Prueba general de porcentaje de índice antifúngico de extractos vegetales de *A. indica* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*

Extractos	1%	5%	10%	15%	20%
HN	28.358	93.657	100	100	100
FN	62.220	91.138	100	100	100

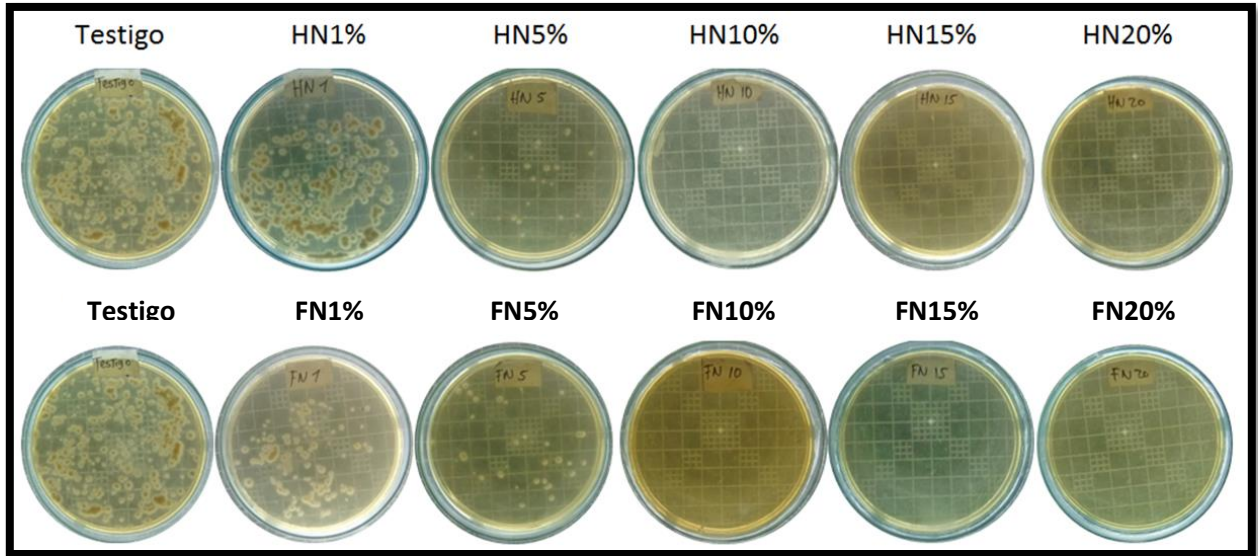


Figura 11. Ensayo in vitro de actividad inhibitoria de los extractos de diferentes tejidos de *A. indica* (Neem) contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides* (HN-hojas de Neem; FN-frutos de Neem)

7.6.3 Actividad antifúngica de los extractos vegetales de diferentes tejidos de *M. azedarach* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*.

Los resultados obtenidos de la prueba in vitro de la actividad inhibitoria antifungica de los extractos de diferentes tejidos de *M. azedarach* contra *C. gloeosporioides* como se evidencia en la tabla 9 y figura 12, indican que hubo inhibición del 100% en hojas, frutos y semillas de Melia. Siendo los bioproductos más eficientes los de HM Y FM, debido a que presentaron inhibición del 100% a concentración del 10%.

Tabla 9

Prueba general de porcentaje de índice antifúngico de extractos vegetales de *M. azedarach* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*.

Extractos	1%	5%	10%	15%	20%
HM	23.787	65.299	100	100	100
FM	79.384	97.388	100	100	100
SM	12.034	49.906	87.873	100	100

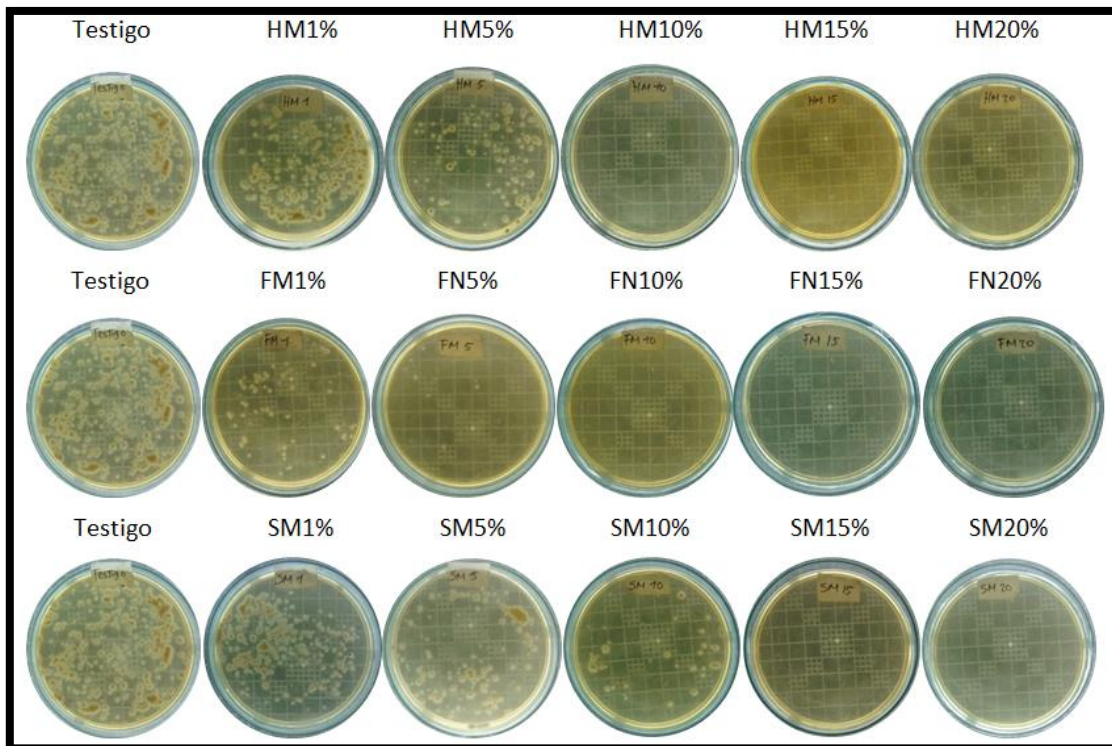


Figura 12. Ensayo in vitro de actividad inhibitoria de los diferentes tejidos de *M. azedarach* (Melia) contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides* (HN-hojas de Melia; FN-frutos de Melia y SM-semillas de Melia).

7.6.4 MIC Y MFC de los extractos de diferentes tejidos de *A. indica* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*.

Los resultados de MIC y MFC de los extractos de diferentes tejidos de *A. indica* (figura 13), indicaron que MIC para el bioproducto HN fue del 8% con un %I.A del 99.22% y el MBC fue del 9%. Para el bioproducto FN, la MIC fue del 7% con un %I.A del 99.51% y la MBC fue del 8% (tabla 10).

Tabla 10

MIC y MFC de extractos de HN y FN contra la germinación de conidias *C. gloeosporioides*.

Extractos	5%	6%	7%	8%	9%	10%
HN	88.748	92.759	94.423	99.217	100	100
FN	79.844	93.542	99.511	100	100	100

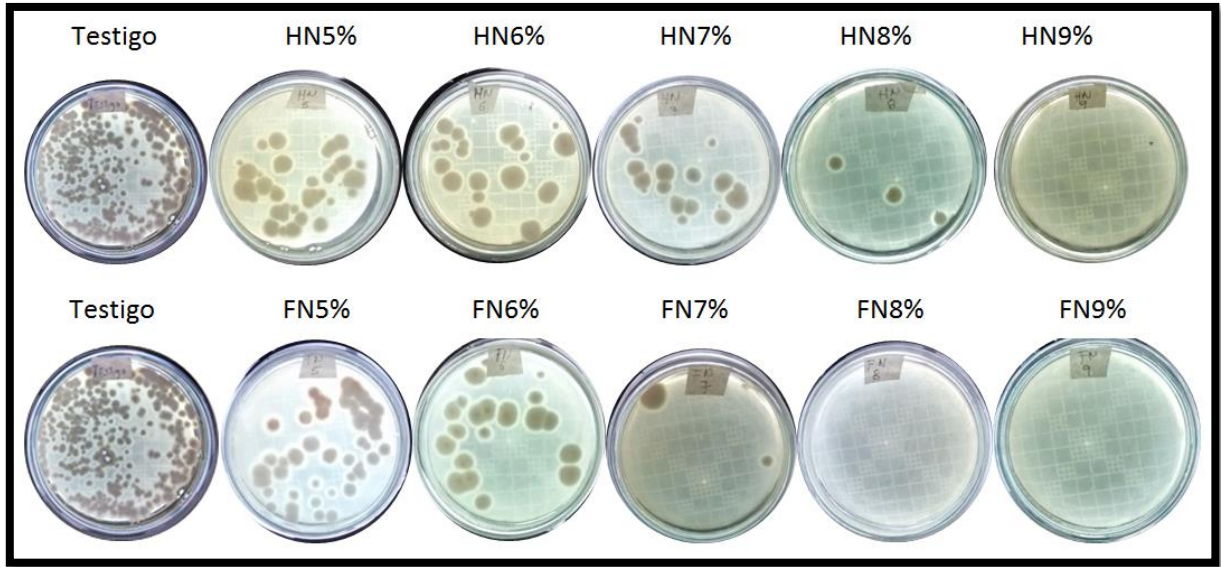


Figura 13. MIC y MFC de los extractos de HN y FN de *A. indica* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides* (HN-hojas de Neem; FN-frutos de Neem).

7.6.5 MIC Y MFC de los extractos de diferentes tejidos de *M. azedarach* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*.

Los resultados de MIC y MFC de los extractos de diferentes tejidos de *M. azedarach* (figura 14), indicaron que MIC para el bioproducto HM fue del 8% con un %I.A del 98.83% y el MFC fue del 9%. Para el bioproducto FN, la MIC fue del 8% con un %I.A del 99.61% y la MFC fue del 9% (tabla 11) . para el bioproducto SM, la MIC fue del 11% con un %I.A del 99.31 y la MFC fue del 12% (tabla 12).

Tabla 11

MIC y MFC de extractos de HM y FM contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*.

Extractos	5%	6%	7%	8%	9%	10%
HM	72.603	87.867	96.575	98.826	100	100
FM	95.890	97.162	99.315	99.608	100	100

Tabla 12

MIC y MFC de extracto de SM contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides*.

Extractos	10%	11%	12%	13%	14%	15%
-----------	-----	-----	-----	-----	-----	-----

SM	95.010	99.315	100	100	100	100
----	--------	--------	-----	-----	-----	-----

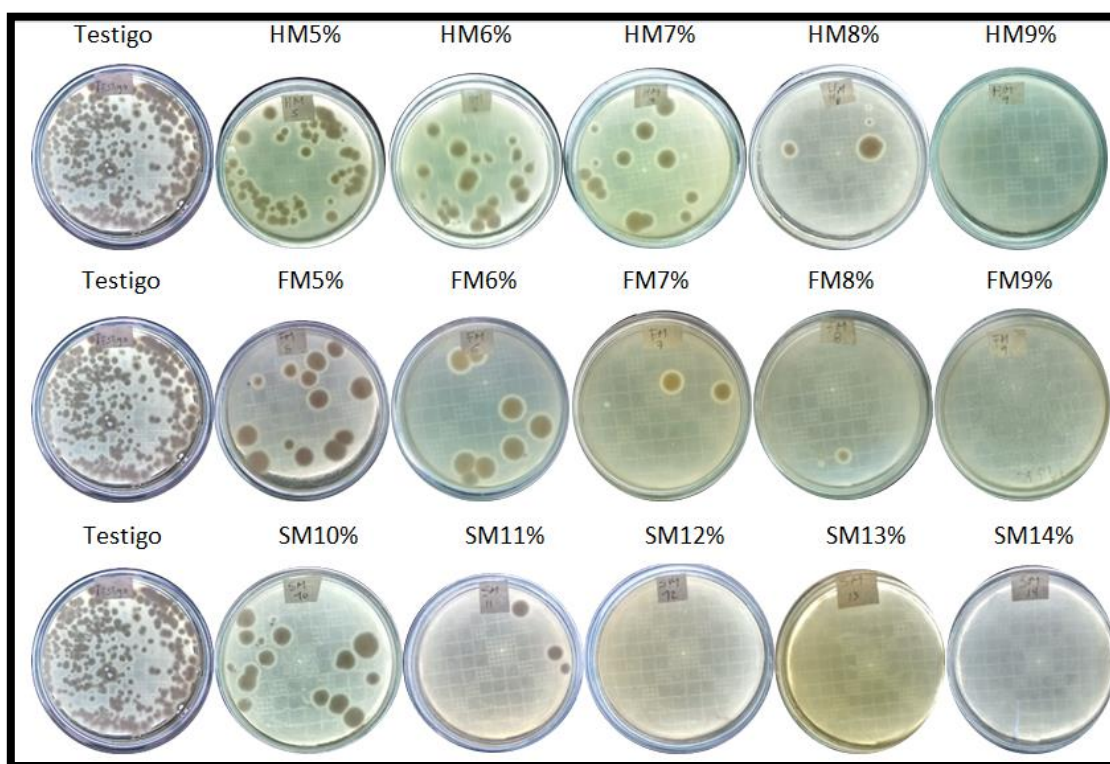


Figura 14. MIC y MFC de los extractos de HM, FM y SM de *M. azedarach* contra la germinación de conidias de *C. gloeosporioides* (HM-hojas de Melia; FM-frutos de Melia y SM-semillas de Melia).

7.7 Actividad antifúngica de extractos vegetales de diferentes tejidos de *A. indica* y *M. azedarach* contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Los resultados de %I.A se presentan en base a cada especie vegetal trabajada. Para mejor interpretación de las figuras 15, 16 y 17.

7.7.1 Actividad antifúngica de los extractos vegetales de diferentes tejidos de *A. indica* contra *C. gloeosporioides*.

Los resultados obtenidos de la prueba *in vitro* de la actividad inhibitoria antifúngica de los extractos de diferentes tejidos de *A. indica* contra *C. gloeosporioides* como se evidencia en la tabla 13 y figura 15, indican que hubo inhibición del 100% de los extractos

de hojas y frutos de Neem. Siendo el bioproducto más eficiente el HN a una concentración del 10%.

Tabla 13

Prueba general de porcentaje de índice antifúngico de extractos vegetales de *A. indica* contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Extractos	1%	5%	10%	15%	20%
HN	69.950	100	100	100	100
FN	27.043	31.147	38.613	100	100

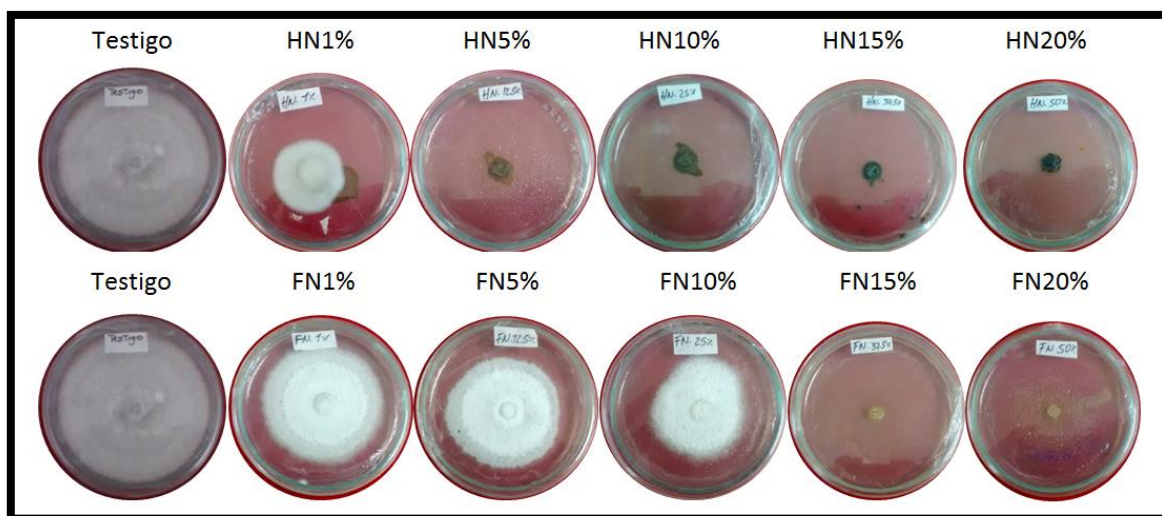


Figura 15. Ensayo in vitro de actividad inhibitoria de los diferentes tejidos de *A. indica* (Neem) contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (HN-hojas de Neem; FN-frutos de Neem).

7.7.2 Actividad antifungica de los extractos vegetales de diferentes tejidos de *M. azedarach* contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Los resultados obtenidos de la prueba in vitro de la actividad inhibitoria antifungica de los extractos de diferentes tejidos de *M. azedarach* contra *C. gloeosporioides* como se evidencia en la tabla 14 y figura 16, señalan que no hubo inhibición completa en ninguno de los diferentes extractos en las concentraciones trabajadas; pero si retraso en el crecimiento.

Tabla 14

Prueba general de porcentaje de índice antifúngico de extractos vegetales de *M. azedarach* contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Extractos	1%	5%	10%	15%	20%
HM	9.790	13.780	20.433	29.410	32.107
FM	3.987	6.870	16.007	24.683	31.187
SM	17.883	27.230	29.930	31.887	36.173

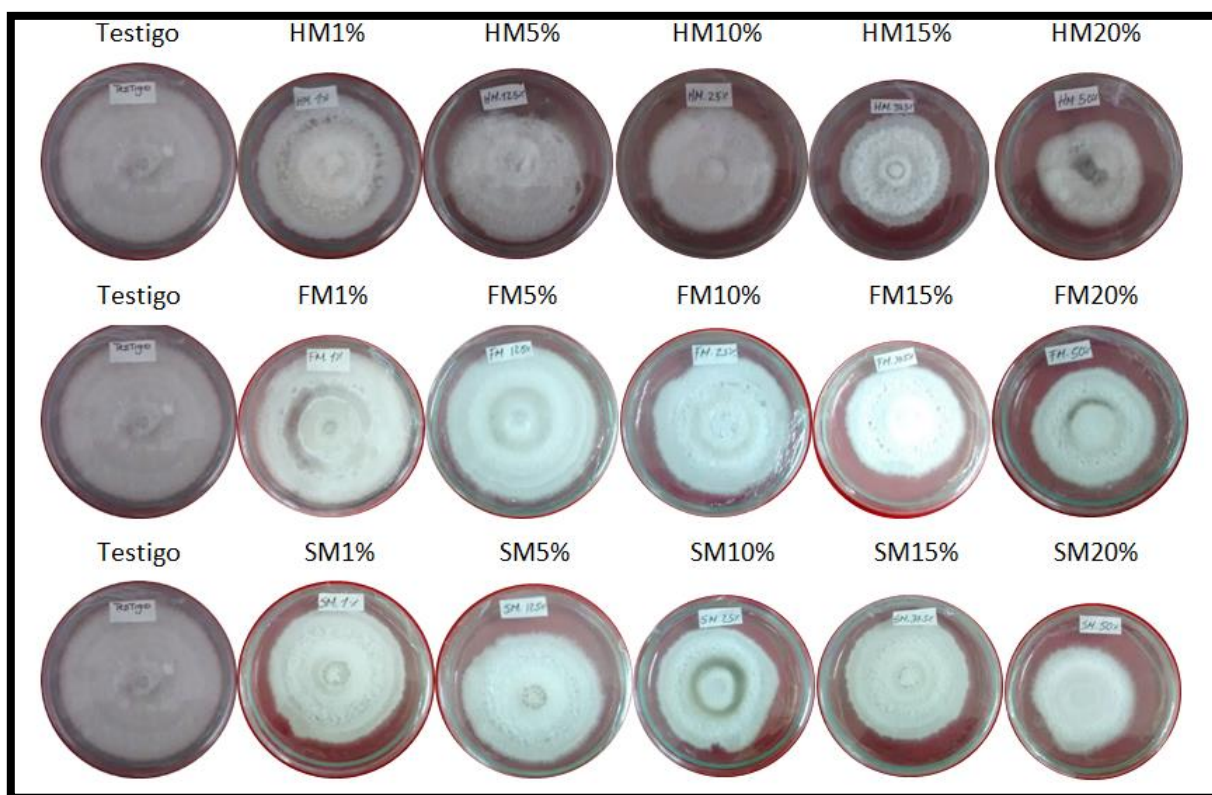


Figura 16. Ensayo in vitro de actividad inhibitoria de los diferentes tejidos de *M. azedarach* (Melia) contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (HN-hojas de Melia; FN-frutos de Melia y SM-semillas de Melia).

7.7.3 MIC Y MFC de los extractos de diferentes tejidos de *A. indica* contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Los resultados de MIC y MFC de los extractos de diferentes tejidos de *A. indica* (figura 17), indicaron que MIC para el bioproducto HN fue del 2% con un %I.A del 76.02% y el MBC fue del 3% (tabla 15). Para el bioproducto FN, la MIC fue del 12% con un %I.A del 60.79% y la MBC fue del 13% (tabla 16).

Tabla 15

MIC Y MFC de extracto de HN contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Extractos	1%	2%	3%	4%	5%
HN	71.357	76.053	100	100	100

Tabla 16

MIC Y MFC de extracto de FN contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides*.

Extractos	10%	11%	12%	13%	14%
FN	30.853	50.400	60.790	100	100

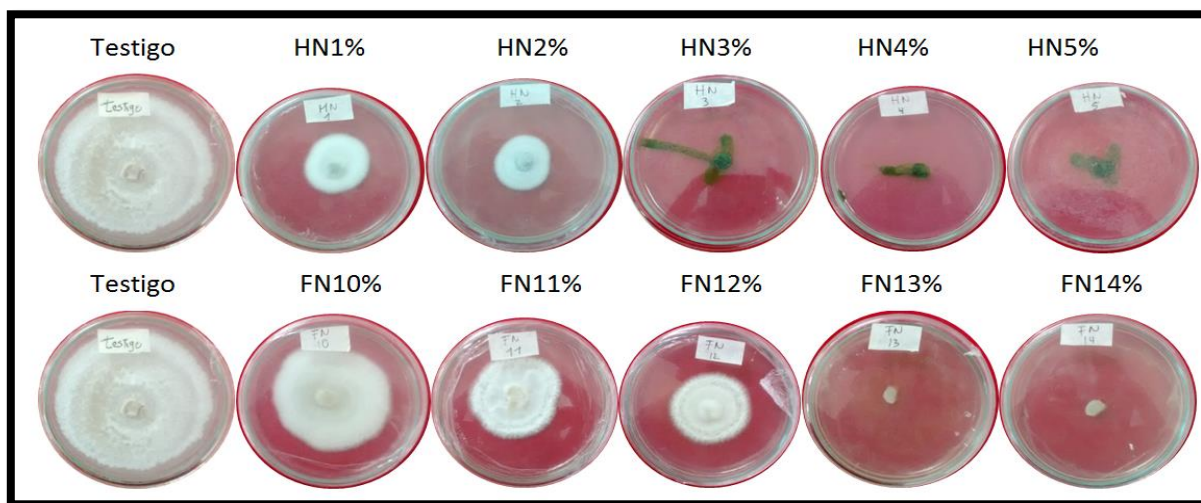


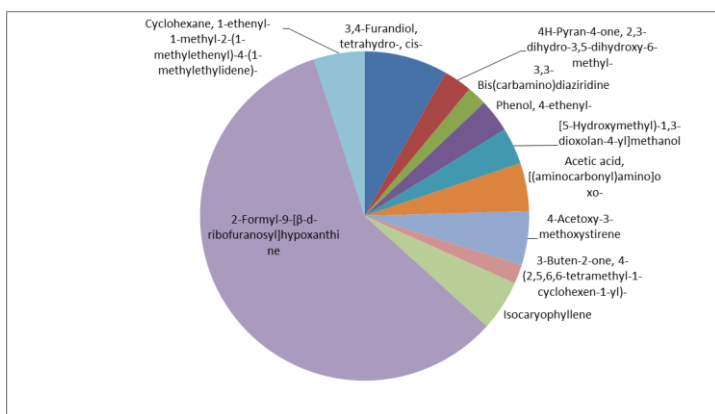
Figura 17. MIC y MFC de los extractos de HN y FN de *A. indica* contra el crecimiento micelial de *C. gloeosporioides* (HN-hojas de Neem; FN-frutos de Neem).

7.8 Caracterización química de los extractos vegetales por la técnica cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa (GC/MS).

La determinación de los componentes químicos de los extractos etanólicos se efectuó mediante la técnica instrumental de Cromatografía de Gases con detector selectivo de Masa (GC/MS).

7.8.1 Cromatografía de extracto de hojas de Neem

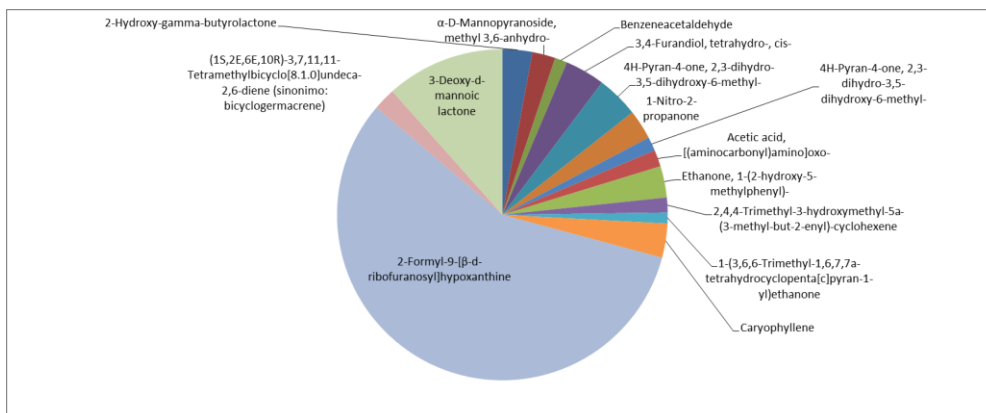
Los resultados obtenidos por la cromatografía muestran que el extracto de hojas de Neem presenta 16 compuestos químicos, los cuales se revelan en cada uno de los picos observados en el anexo 10. El compuesto químico mayoritario fue el numero 12 identificado como 2-Formyl-9-[β -d-ribofuranosyl]hypoxanthine con un porcentaje de área del 58,332% (anexo11).



Grafica 2. Metabolitos Secundarios (MS) de los extractos totales etanólicos de hojas de Neem. El extracto mostró como MS mayoritarios al 2-Formyl-9-[β -d-ribofuranosyl]hypoxanthine con un porcentaje de área del 58,332%.

7.8.2 Cromatografía de extracto de frutos de Neem

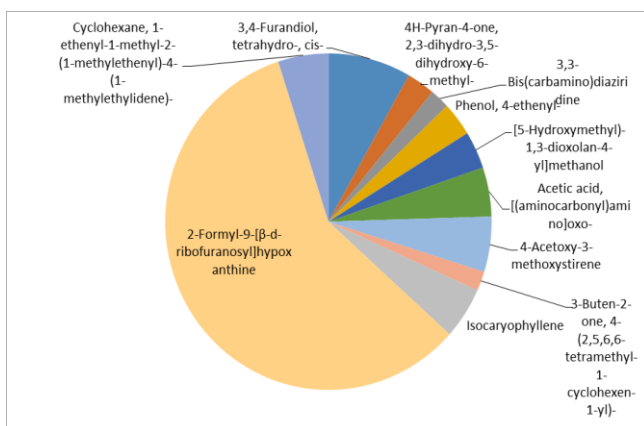
Los resultados obtenidos por la cromatografía muestran que el extracto de frutos de Neem presenta 15 compuestos químicos, los cuales se revelan en cada uno de los picos observados en el anexo 12. El compuesto mayoritario fue el numero 13 identificado como 2-Formyl-9-[β -d-ribofuranosyl]hypoxanthine con un porcentaje de área del 55,292% (anexo 13).



Grafica 3. MS de los extractos totales etanólicos de frutos de Neem. El extracto mostró como MS mayoritarios al 2-Formyl-9-[β-d-ribofuranosyl]hypoxanthine con un porcentaje de área del 55,292%%.

7.8.3 Cromatografía de extracto de hojas de Melia

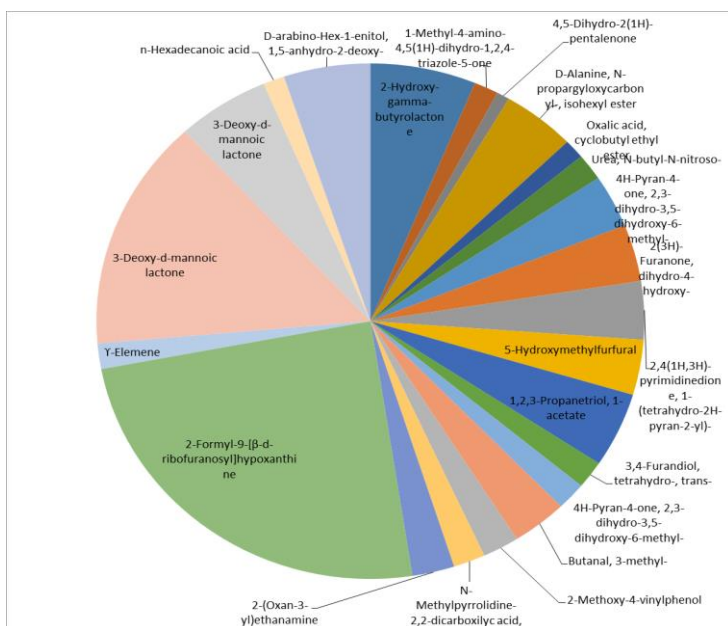
Los resultados obtenidos por la cromatografía muestran que el extracto de frutos de Neem presenta 11 compuestos químicos, los cuales se revelan en cada uno de los picos observados en el anexo 14. El compuesto mayoritario fue el numero 10 identificado como 2-Formyl-9-[β-d-ribofuranosyl]hypoxanthine con un porcentaje de área del 58,332% (anexo 15).



Grafica 4. MS de los extractos totales etanólicos de hojas de Melia. El extracto mostró como MS mayoritarios al 2-Formyl-9-[β-d-ribofuranosyl]hypoxanthine con un porcentaje de área del 58,332%.

7.8.4 Cromatografía de extracto de frutos de Melia

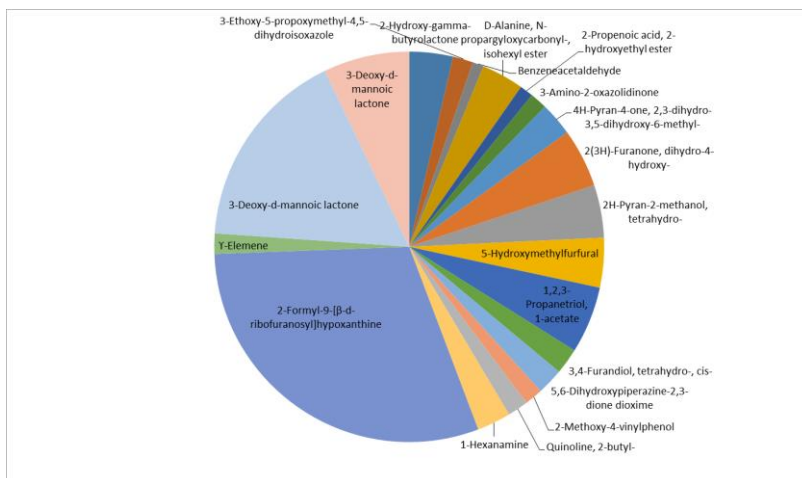
Los resultados obtenidos por la cromatografía muestran que el extracto de frutos de Neem presenta 23 compuestos químicos, los cuales se revelan en cada uno de los picos observados en el anexo 16. El compuesto mayoritario fue el numero 3 identificado como 2-Formyl-9-[β -d-ribofuranosyl]hypoxanthine con un porcentaje de área del 24,481% (anexo 17).



Grafica 5. MS de los extractos totales etanólicos de frutos de Melia. El extracto mostró como MS mayoritarios 2-Formyl-9-[β -d-ribofuranosyl]hypoxanthine con un porcentaje de área del 24,481%.

7.8.5 Cromatografía de extracto de semillas de Melia

Los resultados obtenidos por la cromatografía muestran que el extracto de frutos de Neem presenta 19 compuestos químicos, los cuales se revelan en cada uno de los picos observados en el anexo 18. El compuesto químico mayoritario fue el número 17, identificado como 2-Formyl-9-[β -d-ribofuranosyl]hypoxanthine con un porcentaje de área del 30,178 % (19).



Grafica 6. MS de los extractos totales etanólicos de semillas de Melia. El extracto mostró como MS mayoritarios al -Formyl-9-[β-d-ribofuranosyl]hypoxanthine con un porcentaje de área del 30,178 %.

7.9 Análisis estadístico

Para comprobar la normalidad de los datos obtenidos en los procedimientos de inhibición de *B. glumae* y *C. gloeosporioides* se realizó una prueba cualitativa donde se demostró con los gráficos de reducidos vs los predichos (grafico 2) y el de los residuos vs número de filas (grafico 3) la normalidad de los datos, debido a que los datos no forman ningún patrón curvilíneo indicando así la homocedasticidad de estos y por ende la normalidad de los mismos.

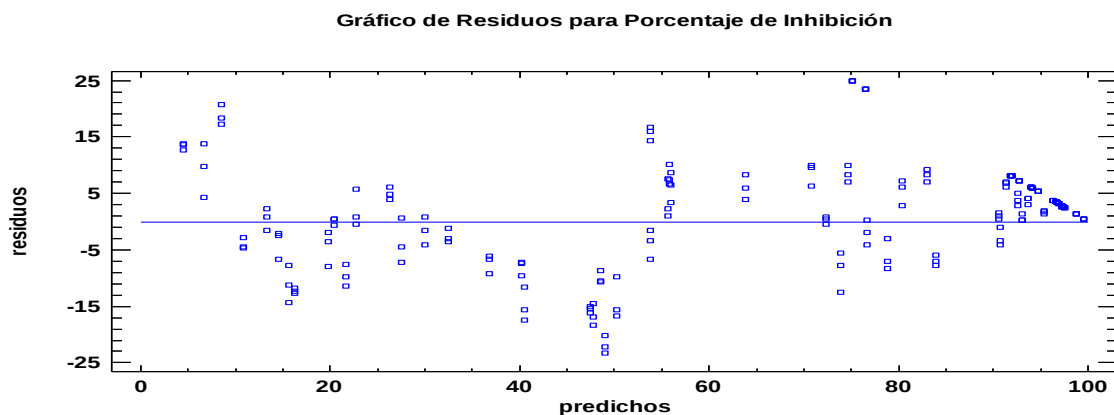


Grafico 7. Residuos vs los predichos

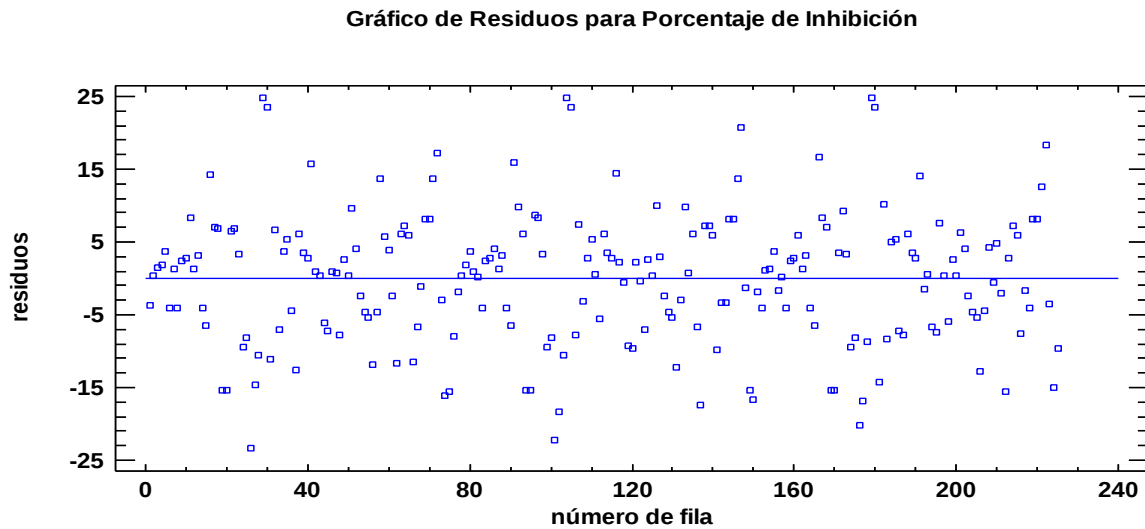


Gráfico 8. Residuos vs número de filas

Tabla 17

Análisis de varianza (ANOVA) para los factores A, B y C y sus interacciones

<i>Fuente</i>	<i>Suma de Cuadrados</i>	<i>Gl</i>	<i>Cuadrado Medio</i>	<i>Razón-F</i>	<i>Valor-P</i>
EFFECTOS PRINCIPALES					
A:Bioproductos	35089,3	4	8772,34	84,87	0,0000*
B:Bacteria y Estructuras Fúngicas	66502,3	2	33251,1	321,71	0,0000*
C:Concentración	89450,7	4	22362,7	216,36	0,0000*
INTERACCIONES					
AB	41354,9	8	5169,37	50,01	0,0000*
AC	12052,4	16	753,276	7,29	0,0000*
BC	10358,1	8	1294,76	12,53	0,0000*
RESIDUOS	18810,9	182	103,356		
TOTAL (CORREGIDO)	273619,	224			

Nota. Se evaluaron tres factores y las interacciones cada factor, para determinar diferencias estadísticas.

*. Existen diferencias estadísticas significativas.

Con la confirmación de la normalidad de los datos se realizó un análisis de varianza (ANOVA), donde se demostró que existían diferencias estadísticas significativas en cada uno de los factores estudiados (A: bioproductos, B: agentes biológicos y C:

concentraciones), debido a que el valor-p fue menor a 0.05, además de esto, también se encontró que existían diferencias significativas entre las interacciones de cada uno de estos factores (AB, AC y BC) a razón que cada uno de sus valores-p es menor a 0.05 como indica la tabla 17.

Tabla 18

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de Inhibición por Bioproductos

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Bioproductos</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
SM	45	54,336	1,51552	X*
HM	45	55,4693	1,51552	X*
FM	45	64,5567	1,51552	X*
FN	45	80,0458	1,51552	X*
HN	45	84,7104	1,51552	X*

Nota. Se determinó diferencias significativas para el factor bioproducto.

*. Existen diferencias estadísticas significativas.

Los resultados obtenidos en la prueba de múltiple de rango de Tukey para el factor A: bioproductos, demuestran que Se encontró diferencias estadísticas significativas del bioproducto FM con respecto a los demás; y no se encontró esta diferencia entre SM y HM, así como entre FN y HN, presentando este último los mayores promedios de inhibición, con una media del 84,7104, como indica la tabla 18

Tabla 19

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de Inhibición por bacteria y estructuras fúngicas

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Bacteria y Estructura Fúngica</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
Micelio C.g	75	43,9244	1,17392	X*
B. glumae	75	75,9044	1,17392	X*
Conidias C.g	75	83,6421	1,17392	X*

Nota. Se determinó diferencias significativas para el factor bacteria y estructura fúngica.

*. Existen diferencias estadísticas significativas.

La prueba de múltiple de rango de Tukey para el factor B: agentes biológicos, demuestran que se encontró diferencias estadísticas significativas en los tres agentes estudiados (Micelio *C.g.*, *B. glumae* Conidias *C.g.*), presentando las conidias *C.g.* los mayores valores de inhibición, con una media del 83,6421, seguido de *B. glumae*, como indica la tabla 19.

Tabla 20

Pruebas de Múltiple Rangos para Porcentaje de Inhibición por Concentración

Método: 95,0 porcentaje Tukey HSD

<i>Concentración</i>	<i>Casos</i>	<i>Media LS</i>	<i>Sigma LS</i>	<i>Grupos Homogéneos</i>
1	45	32,916	1,51552	X*
5	45	59,7484	1,51552	X*
10	45	74,5218	1,51552	X*
15	45	85,3009	1,51552	X*
20	45	86,6311	1,51552	X*

Nota. Se determinó diferencias significativas para el factor concentraciones.

*. Existen diferencias estadísticas significativas.

La prueba de múltiple de rango de Tukey para el factor C: concentraciones, demuestran que se encontró diferencias estadísticas significativas entre las concentraciones de 1%, 5%, 10% y 15%, aunque esta última no mostró diferencias con la del 20% siendo las dos concentraciones con los mayores promedios de inhibición de los patógenos evaluados, con medias del 85,3009 y 86,6311 respectivamente como indica la tabla 20.

El grafico de interacción entre los factores bioproductos y agentes biológicos (grafico 4) demuestran que para *B. glumae*, el bioproducto más eficiente fue de frutos de Neem (FN), para las conidias *C.g.* fue frutos de Melia (FM) y para el micelio *C.g.* fue hojas de Neem (HN). Además de esto, los bioproductos nombrados también presentan alta eficiencia para los otros agentes, ya que FN fue el segundo con mayor inhibición para las conidias *C.g.* y micelio *C.g.*; el bioproducto HN ocupó el tercer puesto para *B. glumae* y

conidias *C.g.* y HN fue el segundo con mayor eficiencia para *B. glumae*, pero fue el menor para micelio *C.g.*

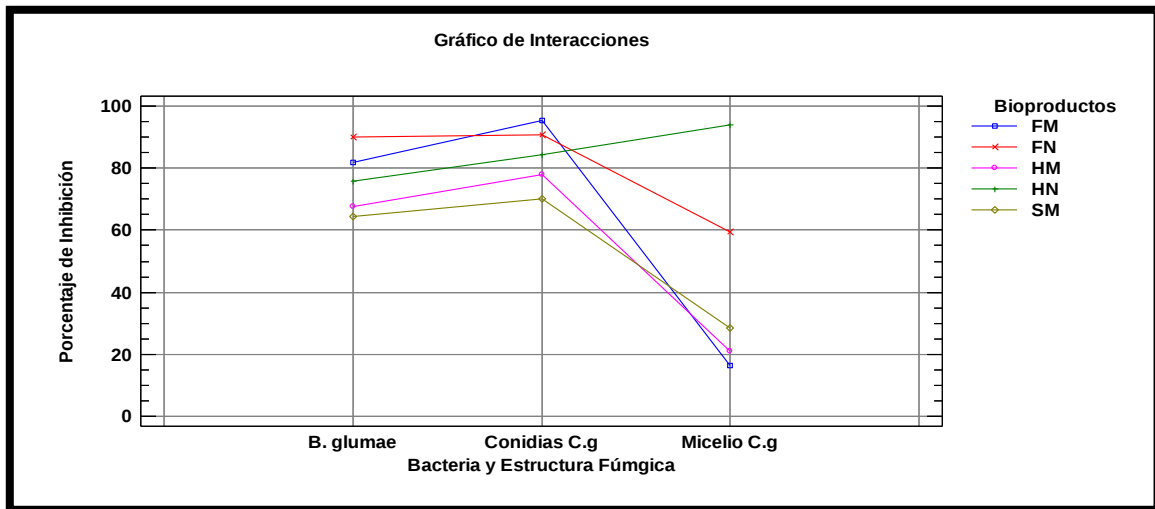


Grafico 9. Bacteria y estructuras fúngicas vs bioproductos

El grafico de interacción entre los factores agentes biológicos (bacteria y estructuras fúngicas) vs concentraciones (grafica 5), muestran que de las concentraciones trabajadas la que tuvo mayor porcentaje de inhibición para cada uno de los agentes biológicos, fue la del 20%, pero con respecto a conidias *C.g.* esta concentración no tuvo diferencia con la del 15%. Además de esto se puede ver también que el agente micelio *C.g.*, fue el más resistente comparando cada una de las concentraciones en cada uno de los agentes biológicos, debido que los porcentajes de inhibición son mucho menores.

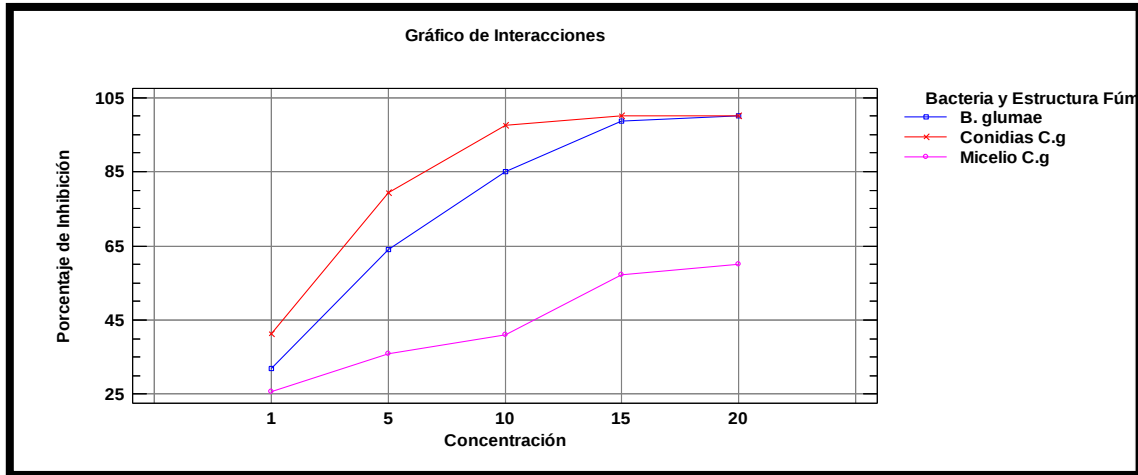


Grafico 10. Bacteria y estructuras fúngicas vs concentraciones

El grafico de interacción entre bioproductos vs concentraciones (grafica N°6) demuestra que los bioproductos HN y FN a las concentraciones de 15 y 20% fueron las que mayor porcentaje de inhibición con respecto al resto de interacciones

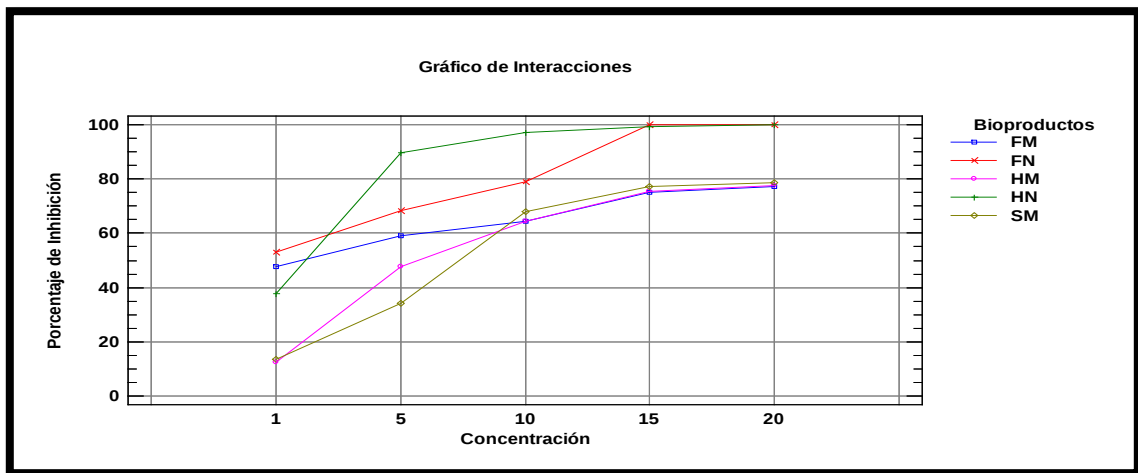


Grafico 11. Bioproductos vs concentraciones

8. Análisis de resultados

La actividad antimicrobiana de los productos naturales es atribuida posiblemente a la presencia de compuestos químicos como los terpenos (monoterpenos y sesquiterpenos), o atribuida a alcoholes y fenoles, debido al carácter hidrofóbico de su esqueleto hidrocarbonado y al carácter hidrofílico de sus grupos funcionales, los cuales poseen una alta actividad antibacteriana y antifúngica, como lo han demostrado estudios realizados por Koroch, Juliani, y Zygodlo (2007).

En este estudio se reportó la presencia de sesquiterpenos, como el cariofileno, isocariofileno, biciclogermacreno y gamma elemene; también la presencia de compuestos fenólicos como Ethanona,1- (2-hidroxi-5-metilfenil)-; 2-Metoxi-4-vinilfenol; y esterres cíclicos como el 3-desoxi-d-mannoico lactona. En cuanto al compuesto que presento mayor abundancia, fue el 2-Formyl-9-[β -d-ribofuranosil] hiposantina, el cual se encontraba en todos los extractos con altas concentraciones; HN (36,36%), FN (55,29%), HM (58,33%), FM (24,48%), SM (30,17%). Esto se asemeja a lo reportado por Okereke, Ijeh y Arunsi (2017), donde este mismo compuesto presento mayor porcentaje de área en extractos procedentes de hojas de *Rauwolfia vomitoria*, pero a este compuesto no le atribuyeron ninguna actividad antimicrobiana, con respecto a otros que estaban en menor concentración y si reportaron actividad biológica.

En cuanto a la actividad antibacteriana los resultados muestran que el FN, fue el extracto que mostro el mejor resultado de inhibición para bacteria, se puede inferir, a partir a los perfiles cromatograficos, que los sesquiterpenos fueron unos de los compuestos que permitieron tal actividad, debido a que este extracto fue el que presento un mayor número

de sesquiterpenos (2), mientras que los otros presentaron uno solo y en menor concentración. Así mismo, es conocido que la producción de sesquiterpenoides en *A. indica* presenta diferencias entre los órganos vegetales; estos compuestos se han encontrado principalmente en frutos, lo que indica que las estructuras sintetizadoras de sesquiterpenoides son más abundantes en este órgano vegetal (Dayanandan y Ponsamuel 2000).

Así mismo, el extracto de fruto de Neem fue el único que mostro la presencia del compuesto 2,4,4-Trimetil-3-hidroximetil-5a-(3-metil-but-2-enil)-ceclohexano, que según Balasundaram, *et al* (2016), es un ihibidor del Ubiquinol-citocromo-c reductasa, que es el tercer complejo de la cadena de transporte de electrones, que interviene en la respiración celular y la generación bioquímica de adenosín trifosfato (ATP) mediante fosforilación oxidativa, que se encuentra en muchas bacterias aerobicas y en las mitocondrias de los eucariotas (Mathews, Van Holde, Ahern, 2003). Además estudios realizados por Karthik, Saravanan, Ebenezar y Sivamalai (2015), le atribuyen actividad antibacteriana al compuesto 2,4,4-Trimetil-3-hidroximetil-5a-(3-metil-but-2-enil)-ceclohexano, debido a que mostro resultados positivos en contra bacterias de aves.

Los resultados también muestran la presencia del ester cíclico 3-desoxi-d-manoico lactona en frutos de Neem y Melia en concentraciones de 11,24% y 14,54% respectivamente, resaltando que el fruto de Melia fue el segundo extracto que presento mejor actividad antimicrobiana, y según estudios realizados por Shobana, Vidhya, Ramya, (2009) reportaron que este compuesto presenta un alto potencial para la actividad antimicrobiana, pero su mecanismo de acción es desconocido. Sin embargo el mecanismo de acción de los esteres en la inhibición del crecimiento microbiano parece estar

relacionado con el mantenimiento del equilibrio ácido-base, la donación de protones y la producción de energía por las células. Los sistemas biológicos y químicos dependen de la interacción entre los sistemas ácido-base. La célula microbiana normalmente refleja este equilibrio atendiendo al mantenimiento de un pH interno cercano a la neutralidad. La homeostasis es la tendencia de una célula a sostener un equilibrio químico a pesar de las fluctuaciones en el ambiente. Este balance se mantiene por medio de la interacción de una serie de mecanismos químicos, causando su alteración la destrucción de las células microbianas. Las proteínas, los ácidos nucleicos y fosfolípidos pueden ser alterados estructuralmente por los cambios de pH (Doores, 1993).

De igual manera Holley y Patel (2005), mencionan que los compuestos fenólicos son unos de los principales responsables de las propiedades antibacteriana. Fisher y Phillips (2008) reportan que estos compuestos aumentan la fluidez de la membrana y causa fugas de protones e iones potasio, lo que resulta en un colapso del potencial de membrana y la inhibición de la síntesis de ATP. Esto se refuerza por lo manifestado por Ultee, Bennik y Moezelaar (2002), en sus estudios quienes sostienen que la actividad antimicrobiana de muchos compuestos fenólicos es posiblemente debido a la presencia del grupo hidroxilo, ya que estos compuestos actúan como transportador transmembranal de cationes monovalentes por intercambio de los protones hidroxilo por otros tales como el ion potasio. Tales eventos podrían resultar en la falta de fuerza móvil de un protón, consecuentemente un decremento en la síntesis de ATP y, finalmente, la muerte celular (Busquet, Calsamiglia, Ferret, & Kamel, 2005). Esto se presenta de esta forma, debido a que aumentos en la fuga de K^+ indicaran, un aumento en la permeabilidad de la membrana, causando un desequilibrio homeostático y por ende en el metabolismo de la célula. Es importante

resaltar que el mantenimiento de la homeostasis de iones es integral para el mantenimiento del estado energético de la célula, así como los procesos dependientes de la energía y acoplados a la membrana como el transporte de soluto, la regulación del metabolismo, el control de la presión de turgencia y la motilidad (Trumpower & Gennis, 1994; Poolman, Driessen & Konings, 1987). Por lo tanto, incluso cambios relativamente pequeños en la integridad estructural de las membranas celulares pueden afectar negativamente al metabolismo celular y conducir a la muerte celular (Cox et al., 2001).

Trabajos sobre la actividad inhibitoria de extractos de Neem y Melia contra *B. glumae*, no se han reportado, sin embargo se han realizado trabajos del efecto antibacteriano de extractos de Neem sobre *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus*, donde los extractos de Neem a una concentración del 10% inhibieron considerablemente el crecimiento de *E. coli*, pero para *S. aureus* el extracto no logro una total reducción (López-Pantoja, Angulo-Escalante, Martínez-Rodríguez, Soto-Beltrán, y Chaidez-Quiroz, 2007).

Briceño, García, Maselli, y Rosales (2011) reportaron que el Neem presentó efecto inhibitorio sobre la bacteria *Erwinia* sp., aislada en plantas de berenjena, *Solanum melongena* L., siendo su efecto directamente proporcional a la concentración del extracto.

Para el caso de extractos de *M. azedarach*, Sen y Batra (2012) reportaron que los extractos etanólicos de Melia mostraron máxima actividad antibacteriana contra *Pseudomonas aeruginosa* y en *S. aureus*, con relación a otros solventes. Por otro lado Khan, Khan y Shukla (2008), donde demostró que los extractos acuosos de la *M. azedarach* mostraron una inhibición significativa frente a las bacterias ensayadas.

Con relación a la germinación de conidios, inferimos que los mismos compuestos que inhibieron el crecimiento de la bacteria fueron las que inhibieron la germinación de las conidias, debido que los resultados de bacterias y conidias son similares, donde el extracto de fruto de Neem fue el que presentó mejores resultados en ambos casos. Esto puede estar apoyado por lo reportado por Guerrero-Rodríguez *et al.* (2007), donde observaron que algunas fuentes de carbono afectan esporulación de ciertos hongos. Además cabe resaltar que estos compuestos con relación a la inhibición del micelio no pudieron presentar mucha influencia, ya que según los resultados indican que solo en hojas y frutos de Neem hubo inhibición, mientras que en los diferentes extractos de Melia, solo retrasó el crecimiento del hongo. Por lo que se infiere a partir de lo propuesto por Ramírez-González *et al.*, (2011), que muchos compuestos químicos presentes en los extractos pueden mostrar actividad antiesporulante pero no en el crecimiento micelial.

Con relación a los resultados de micelio, los resultados no evidenciaron una relación de algún compuesto específico con el crecimiento micelial, por esa razón inferimos que la actividad antifúngica de los extractos no se debió a un componente en particular, porque según Peroza (2016), cuando los extractos vegetales muestran semejanzas en los compuestos químicos así como en sus concentraciones, la cantidad en concentración de cada compuesto, como los tipos de especies químicas en la mezcla, tienen influencia sobre la eficacia antifúngica de los extractos contra *C. gloeosporioides*. Además nuestros resultados muestran que la mayoría de los componentes químicos presentan concentraciones semejantes.

Lo anterior está reforzado a que los mecanismos de acción de los agentes naturales no es atribuida a un único mecanismo sino a una sin número de reacciones (Burt, 2004).

Una posible explicación a este fenómeno es el sinergismo que existe entre diversos componentes presentes en una mezcla derivada de un producto natural (Edris. 2007), puesto que las propiedades físicas influyen significativamente sobre la acción de los componentes, ya sea para aumentar o disminuir su actividad (Koroch, Juliani, y Zygodlo. 2007).

Los resultados obtenidos, en el crecimiento micelial muestran que los extractos de hojas de Neem fueron los que mejores resultados de inhibición presentaron. Se puede inferir a partir de los perfiles cromatográficos que hubo una influencia importante de esta actividad del sesquiterpeno biciclogermacreno, ya que este extracto fue el único que mostró la presencia de este compuesto. Además, Constantin *et al.* (2001), Cysne *et al.* (2005) y Silva *et al.* 2007, demostraron actividad antifúngica de este sesquiterpeno.

Investigaciones sobre extractos de *M. azedarach* contra *Colletotrichum* spp. Indicaron actividad sobre algunos aislados como fue el caso de C040 y C853, pero otros presentaron resistencia a la actividad del extracto como las cepas C279 y C507 (Pérez, Rojas, Chamorro y Pérez, 2011).

Hernández, (2008), determinó la actividad de los extractos de hojas del árbol de Neem (*Azadirachta indica*) para la inhibición del crecimiento micelial *in vitro* de *Rhizoctonia solani*. Los resultados mostraron que en las tres dosis más altas (10%, 15% y 20%), el extracto inhibió completamente el crecimiento del micelio, en tanto que en las más bajas (el 1 y el 5%) el efecto fue fungistático: se detuvo el crecimiento del micelio.

Bolívar *et al.*, (2009), Evaluó el efecto fungicida de extractos vegetales de *Azadirachta indica* (Neem), *Phyllanthus niruri* (flor escondida), *Calotropis procera*

(algodón de seda); *Lippia origanoides* (orégano silvestre), *Gliricidia sepium* (mata ratón) y *Heliotropium indicum* (rabo de alacrán) en el desarrollo in vitro del hongo *C. gloeosporioides*. Los resultados indicaron el potencial de los extractos para el manejo de la antracnosis.

9. Conclusiones

Los extractos *A. indica* y *M. azedarach* mostraron diversidad estructural, en cuanto a la presencia de sesquiterpenos, fenoles, esteroides y otros que no fueron identificados.

Los resultados obtenidos permitieron demostrar la eficiencia de cada uno de los extractos de *A. indica* y *M. azedarach*, a razón de que cada uno presentaba actividad inhibitoria para cada organismo de estudio.

Los extractos de cada tejido de las dos especies, mostraron resultados iguales de inhibición, con relación a los controles positivos, que para el caso de *B. glumae* fue el ácido oxolínico y para *C. gloeosporioides* fue el benomil; Demostrando así la eficiencia de estos bioinsumos.

La actividad inhibitoria contra cada fitopatógeno o estructura fúngica, se observó que para bacteria *b. glumae*, el extracto que presento mayor efecto inhibitorio fue el de fruto de Neem, mientras que para la germinación de conidias fue el extracto de frutos de Melia y para el crecimiento micelial fue el de hojas de Neem. Demostrando de esa forma la existencia de diferentes fuentes bioactivas para el control de los diferentes fitopatógenos.

Los extractos vegetales revelan actividad antimicrobiana a bajas concentraciones, debido a que la actividad antimicrobiana generalmente se presentaba entre un 3 y 15%.

Aunque los extractos de *M. azedarach* solo retraso el crecimiento micelial del hongo en las concentraciones trabajadas, se infiere que a concentraciones más altas podría ejercer el mismo efecto de los extractos que inhibieron completamente el micelio, sin embargo estos extractos tuvieron excelentes resultados sobre la bacteria y las conidias.

10. Bibliografía

Abang, M. M., Winter, S., Mignouna, H. D., Green, K. R., & Asiedu, R. (2003). Molecular taxonomic, epidemiological and population genetic approaches to understanding yam anthracnose disease. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 486-496.

Abang, M. M., Asiedu, R., Hoffmann, P., Wolf, G. A., Mignouna, H. D., & Winter, S. (2006). Pathogenic and genetic variability among *Colletotrichum gloeosporioides* isolates from different yam hosts in the agroecological zones in Nigeria. *Journal of Phytopathology*, 154(1), 51-61.

Abang, M.M., Abraham, W.R., Asiedu, R., Hoffmann, P., Wolf, G., & Winter, S. (2009). Secondary metabolite profile and phytotoxic activity of genetically distinct forms of *Colletotrichum gloeosporioides* from yam (*Dioscorea* spp.). *Mycological research*, 113(1), 130-140.

Aduramigba-Modupe, A. O., Asiedu, R., & Odebode, A. C. (2008). Reaction of *Dioscorea alata* (water yam) to anthracnose disease in Nigeria. *J. Food Agric. Environ*, 6(3-4), 248-252.

Afanador-Kafuri, L., Minz, D., Maymon, M., & Freeman, S. (2003). Characterization of *Colletotrichum* isolates from tamarillo, passiflora, and mango in Colombia and identification of a unique species from the genus. *Phytopathology*, 93(5), 579-587.

Agrios, G.N. (2005). Plant Pathology Fifth edition. Estados Unidos de América: Elsevier Academic Press.

Alvarez Soto, A. A. (2000). Prácticas agronómicas para el cultivo del ñame.

Alzate, D. A., Mier, G. I., Afanador, L., Durango, D. L., & García, C. M. (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).

Amusa, N. A., Adigbite, A. A., Muhammed, S., & Baiyewu, R. A. (2003). Yam diseases and its management in Nigeria. *African Journal of Biotechnology*, 2(12), 497-502.

Arregoces, O., Rosero, M., & González, J. (2005). Guía de estudio: Morfología de la planta de arroz [En línea]. Cali, CO, CIAT. Recuperado de http://www.ciat.cgiar.org/riceweb/pdfs/morfologia_planta_arroz.pdf.

Balasundaram, A., Ragupathy, R., Sankar, S., Thiyagarajan, M., Ravi, L., Karuppasamy, R., & Veerappapillai, S. (2016). Investigation of Phytocompounds and Computational Approach for the Evaluation of Therapeutic Properties of Ethanolic Leaf Extract of *Callistemon citrinus*. *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*, 37(1), 20.

Baquero, M. J. (2010). Identificación y caracterización de *Colletotrichum* spp como agente causal de la antracnosis en *Dioscorea* spp (Doctoral dissertation).

Bailey, M. J., Koronakis, V., Schmoll, T., & Hughes, C. (1992). Escherichia coli HlyT protein, a transcriptional activator of haemolysin synthesis and secretion, is encoded by the rfaH (sfrB) locus required for expression of sex factor and lipopolysaccharide genes. *Molecular microbiology*, 6(8), 1003-1012.

Bernal-Alcocer, A., Zamora-Natera, J. F., Virgen-Calleros, G., & Nuño-Romero, R. (2005). Actividad biológica in vitro de extractos de Lupinus spp. sobre hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2).

Bernal-Alcocer, A., Zamora-Natera, J. F., Virgen-Calleros, G., & Nuño-Romero, R. (2005). Actividad biológica in vitro de extractos de Lupinus spp. sobre hongos fitopatógenos. *Revista Mexicana de Fitopatología*, 23(2).

Bolívar, K., Sanabria, M. E., Rodríguez, D., de Camacaro, M. P., Ulacio, D., Cumana, L., & Crescente, O. (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. *Rev. UDO Agrícola*, 9(1), 175-181.

Botanical-Online. (2013). Cultivo del Ñame (*Dioscorea* spp.). Recuperado de http://www.botanical-online.com/dioscorea_alata_cultivo.htm.

Brenner, D.J., Krieg, N.R., Staley, J.T. and Garrity, G.M. (2005). *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology*, 2nd edición. New York: Springer.

Briceño, G., García, J., Maselli, A., & Rosales, L. C. (2011). Efecto de extractos etanólicos de Ruda y Neem sobre el control de bacterias fitopatógenas del género erwinia. *Agronomía Trop*, 61(2), 141-148.

Burt, S. (2004). Essential oils: their antibacterial properties and potential applications in foods-A review. *Int. J. Food Microbiol.* 94, 223–253.

Busquet, M., Calsamiglia, S., Ferret, A., & Kamel, C. (2005). Screening for effects of plant extracts and active compounds of plants on dairy cattle rumen microbial fermentation in a continuous culture system. *Animal Feed Science and Technology*, 123, 597-613.

Bustamante, R., & Gustavo Buitrago, H. (2006). Molecular Characterization of Colombian Yam Germoplasm by Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci (SAMPL). *Revista colombiana de biotecnología*, 8(2), 60-66.

Cano, J., Guarro, J., & Gené, J. (2004). Molecular and morphological identification of Colletotrichum species of clinical interest. *Journal of clinical microbiology*, 42(6), 2450-2454.

Cerón Rincón, L. E., Higuera, B. L., Sánchez, J., Bustamante, S., & Buitrago, G. (2006). Crecimiento y desarrollo de Colletotrichum gloeosporioides f. alatae durante su cultivo en medios líquidos. *Acta biológica colombiana*, 11(1), 99-109.

Cock D.N. y Jiménez J.A. (2006). Cartilla técnica: Los extractos vegetales de uso agrícola. Programa nacional de buenas prácticas del SENA Colombia.

Costantin, M. B., Sartorelli, P., Limberger, R., Henriques, A. T., Steppe, M., Ferreira, M. J., ... & Kato, M. J. (2001). Essential oils from *Piper cernuum* and *Piper regnellii*: antimicrobial activities and analysis by GC/MS and ¹³C-NMR. *Planta medica*, 67(08), 771-773.

Cooperación Arrocería Nacional. (2012). Informe Anual Estadístico. Costa Rica. Recuperado de http://www.conarroz.com/UserFiles/File/INFORME_ANUAL_ESTADISTICO_2011-2012.pdf.

Cosentino, S., Tuberoso, C. I. G., Pisano, B., Satta, M. L., Mascia, V., Arzedi, E., & Palmas, F. (1999). In-vitro antimicrobial activity and chemical composition of Sardinian thymus essential oils. *Letters in applied microbiology*, 29(2), 130-135.

Conti, S., Radicioni, G., Ciociola, T., Longhi, R., Polonelli, L., Gatti, R.,... & Vitali, A. (2013). Structural and functional studies on a proline-rich peptide isolated from swine saliva endowed with antifungal activity towards *Cryptococcus neoformans*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes*, 1828(3), 1066-1074.

Correa, F., Pérez, C. R., & Saavedra, E. (2007). Añublo bacterial de la panícula del arroz. *Revista Arroz*, 57(468), 26-32.

Cottyn, B., Debode, J., Regalado, E., Mew, T. W., & Swings, J. (2009). Phenotypic and genetic diversity of rice seed-associated bacteria and their role in pathogenicity and biological control. *Journal of applied microbiology*, 107(3), 885-897.

Cox, S. D., Mann, C. M., Markham, J. L., Gustafson, J. E., Warmington, J. R., & Wyllie, S. G. (2001). Determining the antimicrobial actions of tea tree oil. *Molecules*, 6(2), 87-91.

Cristo, P., & Saavedra, E. (2011). Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en el Caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 3(1), 111-124.

Cysne, J. B., Canuto, K. M., Pessoa, O. D. L., Nunes, E. P., & Silveira, E. R. (2005). Leaf essential oils of four *Piper* species from the State of Ceará-Northeast of Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*, 16(6B), 1378-1381.

DANE-ENA. (2015). Encuesta nacional agropecuaria ENA 2015. Boletín técnico. Bogotá, 01 de Junio de 2016. pp. 1

DANE-Fedearroz. (2015). Producción y Rendimientos, http://www.fedearroz.com.co/apr_public.php.

DANE-Fedearroz. (2010). Producción y Rendimientos, http://www.fedearroz.com.co/apr_public.php.

Morgan, E. D. (2009). Azadirachtin, a scientific gold mine. *Bioorganic & medicinal chemistry*, 17(12), 4096-4105.

Davis, M. J. (1993). Papaya Bunchy Top, MLO. Recuperado de <http://www.extento.hawaii.edu/kbase/crop/type/papbunc.htm>.

Dayanandan, P. y Ponsamuel, J. (2000). Ultrastructure of terpenoid secretory cells of Neem (*Azadirachta indica* A. Juss). In electron microscopy in medicine and biology, P.D.Gupta and H. Yamamoto, eds. (New Delhi: Oxford & IBH Publishing Co. Pvt. Ltd), pp. 179-195

Dean, R., Van Kan, J. A., Pretorius, Z. A., Hammond-Kosack, K. E., Di Pietro, A., Spanu, P. D., ... & Foster, G. D. (2012). The Top 10 fungal pathogens in molecular plant pathology. *Molecular plant pathology*, 13(4), 414-430.

Dellavalle, P. D., Cabrera, A., Alem, D., Larrañaga, P., Ferreira, F., & Dalla Rizza, M. (2011). Antifungal activity of medicinal plant extracts against phytopathogenic fungus *Alternaria* spp. *Chilean Journal of Agricultural Research*, 71(2), 231.

Doores, S. 1993. Organic acids. In: Antimicrobials in Foods. Ed. A. L. Branene and P. M. Davidson. Marcel Dekker, Inc. pp. 75-108.

Do Vale, M. (2004). Atividade ovicida e larvica de extratos de *Melia azedarach* L. sobre *Haemonchus contortus*. (Tese de mestre em Medicina Veterinária). Universidade Estadual do Ceará, Ceará, Fortaleza.

Edris, A.E. (2007). Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review. *Phytother. Res.*; 21:308-323.

Egesi, C. N., Onyeka, T. J., & Asiedu, R. (2007). Severity of anthracnose and virus diseases of water yam (*Dioscorea alata* L.) in Nigeria I: effects of yam genotype and date of planting. *Crop protection*, 26(8), 1259-1265.

Espinal, C., Martínez, H., & Acevedo, X. (2005). La cadena del arroz en Colombia Una mirada global de su estructura y dinámica. *Ministerio de agricultura y desarrollo rural observatorio agro cadenas Colombia 1991-2005*, 1-5.

FAO. (2016). Seguimiento del mercado del arroz de la FAO. Volumen XIX edición no. 4: pp. 5

FAO. (2013). Estadísticas mundiales sobre cultivos. Recuperado de <http://www.faostat.org>.

FAO. (2010). Estadísticas mundiales sobre cultivos. Recuperado de <http://www.faostat.org>.

FAO. (2005). Producción de arroz. Recuperado de <http://www.fao.org/spanish/newsroom/news/2005/7538-es.html>.

FAO. (2004). El arroz es vida. <http://www.fao.org/rice2004/es/f-sheet/hoja3.pdf>.

FAO. (2003). Yams Post-harvest Operations. Recuperado de <http://www.fao.org/3/aax449e.pdf>.

FINAGRO. (2014). Perspectiva del sector agropecuario. Bogotá. pp10-11. Recuperado de

http://www.agronet.gov.co/www/docs_agronet/2005112141728_caracterizacion_arroz.pdf. 38 p.

Fisher, K. y Phillips, C. (2008). Potential antimicrobial uses of assential oils in food: is citrus the answer?. *Food science and technology*. 19(3): 156-164

Green, K. R., Abang, M. M., & Iloba, C. (2000). A rapid bioassay for screening yam germplasm for response to anthracnose. *Tropical Science*, 40(3), 132-138.

Gómez, L. F.; Cardozo, O. & Echeverri, J. (2010). Nuevos análisis lo confirman: Control químico poco efectivo contra la bacteria. Noticias Fedearroz. Recuperado de http://www.fedearroz.com.co/noticias-docs/control_quimico.pdf.

Gualtieri, M. J., González, M. C., Contreras, K. P., Noguera, M. C., Uzcátegui, E. E., Villasmil, S., & Villalta, C. (2008). Evaluación de la actividad antimicrobiana de los extractos etanólicos de *Azadirachta indica*. *Rev. Inst. Nac. Hig*, 39(2), 12-16.

Guerrero-Rodríguez, E., Solís-Gaona, S., Hernández-Castillo, F. D., Flores-Olivas, A., Sandoval-López, V., & Jasso-Cantú, D. (2007). Actividad Biológica in vitro de Extractos de *Flourensia cernua* DC en Patógenos de Postcosecha: *Alternaria alternata* (Fr.: Fr.) Keissl., *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc. y *Penicillium digitatum* (Pers.: Fr.) Sacc. *Revista mexicana de Fitopatología*, 25(1), 48-53.

Guo, Z., Xing, R., Liu, S., Zhong, Z., Ji, X., Wang, L., & Li, P. (2008). The influence of molecular weight of quaternized chitosan on antifungal activity. *Carbohydrate Polymers*, 71(4), 694-697.

Ham, J. H., Melanson, R. A., & Rush, M. C. (2011). *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice?. *Molecular plant pathology*, 12(4), 329-339.

Hikichi, Y., Tsujiguchi, K., Maeda, Y., & Okuno, T. (2001). Development of increased oxolinic acid-resistance in *Burkholderia glumae*. *Journal of General Plant Pathology*, 67(1), 58-62.

Hata, Y., Reguero, M. T., de García, L. A., Buitrago, G., & Álvarez, A. (2003). Evaluación del contenido de sapogeninas en variedades nativas de ñame (*Dioscorea* spp.), provenientes de la colección de la Universidad de Córdoba. *Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas*, 32(2).

Hernández, D. E. (2008). Uso del extracto de hojas del árbol de neem (*Azadirachta indica*) para la inhibición del crecimiento micelial in vitro de *Rhizoctonia solani*. *In Fitosanidad*. (No. 3194).

Hikichi, Y., Okuno, T., & Furusawa, I. (1994). Susceptibility of rice spikelets to infection with *Pseudomonas glumae* and its population dynamics. *J. Pesticide Sci*, 19, 11-17.

Holley, R. y Patel, D. (2005). Improvement in shelf-life and safety of perishable foods by plant essential oils and smoke antimicrobials. *Food microbiology*. 22(4): 273-292

Huerta, A., Chiffelle, I., Lizana, D., & Araya, J. E. (2008). Actividad insecticida de extractos del fruto de *Melia azedarach* en distintos estados de madurez sobre *Drosophila melanogaster*. *Bol. San. Veg. Plagas*, 34, 425-432.

ICA. (2009). Exportadores de ñame de la mano del ICA. Recuperado de <http://www.ica.gov.co/Noticias/Agricola/2009/Exportadores-de-name-de-la-mano-del-ICA.aspx>

Investigación y desarrollo (2010). Hongos entomopatogenos y su uso con plaguicidas.

Jeong, Y., Kim, J., Kim, S., Kang, Y., Nagamatsu, T., & Hwang, I. (2003). Toxoflavin produced by *Burkholderia glumae* causing rice grain rot is responsible for inducing bacterial wilt in many field crops. *Plant disease*, 87(8), 890-895.

Juárez-Becerra, G. P., Sosa-Morales, M. E., & López-Malo, A. (2010). Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas Selectos de Ingeniería de Alimentos*, 4(2), 14-23.

Judd, W., Campbell, C., Stevens, P., & Donoghue. (2008). *Plant systematic a phylogenetic approach*. Third ed. Sinauer associates. Massachusetts USA, Sunderland, MA.

Karthik, R., Saravanan, R., Ebenezar, K. K., & Sivamalai, T. (2015). Isolation, Purification, and Characterization of Avian Antimicrobial Glycopeptide from the Posterior Salivary Gland of *Sepia pharaonis*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 175(3), 1507-1518.

Khan, A. V., Khan, A. A., & Shukla, I. (2008). In vitro antibacterial potential of *Melia azedarach* crude leaf extracts against some human pathogenic bacterial strains. *Ethnobotanical Leaflets*, 2008(1), 53.

Koroch A, Juliani R, Zygodlo J. (2007) Bioactivity of Essential Oils and Their Components. In: Berger RG, editor. *Flavours and Fragrances*. Berlin Heidelberg: *Springer-Verlag*; p. 87-103.

Lampkin, N. (2001). *Agricultura ecológica*. Mundi-Prensa. Madrid, España, pp 217-271.

Lastres, L., Soza, F. (2009). Manual de Sanidad Vegetal. Programa para la Agricultura Sostenible en Laderas de América Central. Carrera de Ciencia y Producción Agropecuaria. Escuela Agrícola Panamericana, El Zamorano, Honduras. 75 p.

Leon, J. (2000). Botánica de los cultivos tropicales. (3era, ed). revisión aumentada. *Agroamerica-Instituto Interamericano de cooperación para la Agricultura*. Pp, 370(461), 475-477.

Lim, J., Lee, T. H., Nahm, B. H., Do Choi, Y., Kim, M., & Hwang, I. (2009). Complete genome sequence of *Burkholderia glumae* BGR1. *Journal of bacteriology*, 191(11), 3758-3759.

López-Pantoja, Y., Angulo-Escalante, M., Martínez-Rodríguez, C., Soto-Beltrán, J., & Chaidez-Quiroz, C. (2007). Efecto antimicrobiano de extractos crudos de neem (*Azadirachta indica* A. Juss) y venadillo (*Swietenia humilis* Zucc) contra *E. coli*, *S. aureus* y el bacteriófago P22. *Bioquímica*, 32(4), 117-125.

Maeda, Y., Kiba, A., Ohnishi, K., & Hikichi, Y. (2004). Implications of amino acid substitutions in GyrA at position 83 in terms of oxolinic acid resistance in field isolates of *Burkholderia glumae*, a causal agent of bacterial seedling rot and grain rot of rice. *Applied and environmental microbiology*, 70(9), 5613-5620.

Mahenthiralingam, E., Urban, T. A., & Goldberg, J. B. (2005). The multifarious, multireplicon *Burkholderia cepacia* complex. *Nature reviews. Microbiology*, 3(2), 144.

Mathews, C. K.; Van Holde, K.E Ahern, K.G (2003). *Bioquímica* (3 edición). ISBN 84-7892-053-2.

Mendes, R.A. (2005) Cultivando el inhame ou cara da Costa. Cruz das Almas: EMBRAPA. p. 26 (Circular Técnica no. 4).

Mendez, Y. P., Palencia, J. L., Hernandez, K. P., Hernandez, E. J., & Beltrán, J. D. (2013). Reacción de genotipos de ñame (*Dioscorea* spp) a la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*). *Temas Agrarios*, 18(1), 34-40.

Mosquera, G (2010). In: Panicle bacterial blight in Colombia: knowing the enemy as a first step in finding control alternatives, <http://www.slideshare.net/xescobar/005-panicle-bacterial-blight-in-colombia-gloria-mosquera>.

Montaldo, A. (1991). *Cultivo de raíces y tubérculos tropicales*. Segunda edición. Instituto Interamericano de Cooperación para la Agricultura, San José Costa Rica.

Münch, S., Lingner, U., Floss, D. S., Ludwig, N., Sauer, N., & Deising, H. B. (2008). The hemibiotrophic lifestyle of *Colletotrichum* species. *Journal of plant physiology*, 165(1), 41-51.

Nandakumar, R., Shahjahan, A. K. M., Yuan, X. L., Dickstein, E. R., Groth, D. E., Clark, C. A., ... & Rush, M. C. (2009). *Burkholderia glumae* and *B. gladioli* cause bacterial panicle blight in rice in the southern United States. *Plant Disease*, 93(9), 896-905.

O'Connel, R. J. (2000). Dissecting the cell biology of *colletotrichum* infection processes. En: *Colletotrichum: Host specificity, Pathology, and host pathogen interaction. Minnessota: The American phitopahological society*, 393p.

Okereke, S. C., Ijeh, I. I., & Arunsi, U. O. (2017). Determination of bioactive constituents of *Rauwolfia vomitoria* Afzel (Asofeyeje) roots using gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS) and Fourier transform infrared spectrometry (FT-IR). *African Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 11(2), 25-31.

Opara, E. U., & Obani, F. T. (2010). Performance of some plant extracts and pesticides in the control of bacterial spot diseases of *solanum*. *Agricultural Journal*, 5(2), 45-49.

Osorio, J. A., Bustamante, E. E., Macareno, M. M., Hernandez, E. J., & Beltrán, J. D. (2010). Aislamiento enzimático de protoplastos a partir de mesófilo de dioscorea alata cultivar “Pico de Botella”. *Temas Agrarios*, 15(1), 58-70.

Ospina, J., Beltrán, J. (2010). Primeros resultados del análisis al control de la bacteria *Burkholderia glumae*. *Revista Arroz*; 233:4-5.

Parra, L. (2008). Relación entre infecciones quiescentes de *Colletotrichum gloeosporioides* (penz) y los diferentes estados fenológicos del fruto de mango (*Mangifera indica*) variedad Hilacha. (Tesis de pregrado). Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas, Bogotá.

Peixoto, P. A.; Caetano L. C. y Lopes, J. (2000). Inhame: o nordeste fértil. *Maceió: EDUFAL, INCAPER*. 88 p.

Perea, M., & Buitrago, G. (2000). Aplicación de la biotecnología agrícola al cultivo de ñame. Ñame: producción de semillas por biotecnología. Ed.: M Guzmán y G Buitrago. Universidad Nacional de Colombia. *Editorial Unibiblos*. Bogotá, DC, 17-19.

Pérez, C., Rojas, s., Chamorro, A. y Pérez, P. (2011). Evaluación de la actividad antifúngica de *Melia azederach* sobre aislados de *Colletotrichum spp*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 3(2), 309-320.

Pérez, C. (2009). Un buen manejo del cultivo, verdadera barrera contra el añublo bacterial. *Revista Arroz*, 57(482), 30-38.

Perez C, Cristo E (2011). Avances en el Manejo Integrado de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en el Caribe Colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 3(1), 15-23.

Pérez, C.R (2010). *Avances en el manejo integrado de Burkholderia glumae*. *Revista Arroz*, 58(488), 4-8.

Pérez, C., & Saavedra, E. (2011). Avances en el manejo integrado de la bacteria *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en el Caribe colombiano. *Revista Colombiana de Ciencia Animal*, 3(1), 111-124.

Pérez, L. M., Saquero, M. J., & Beltrán Herrera, J. D. (2003). Caracterización morfológica y patogénica de *Colletotrichum sp*. como agente causal de la antracnosis en ñame *Dioscorea sp*. *Revista Colombiana de biotecnología*, (1).

Peroza, P. (2016). *Evaluación in vitro de la actividad antifúngica de extractos y fracciones de limoncillo Swinglea glutinosa contra Colletotrichum gloeosporioides agente causal de la antracnosis del cultivo de ñame en el departamento de sucre*. (Tesis de maestría). Universidad de Córdoba, Montería, cordoba

Pinzón, Y. A., Bustamante, S. L., & Buitrago Hurtado, G. (2013). Differential molecular diagnosis *Colletotrichum gloeosporioides* and *Fusarium oxysporum* in yam (*Dioscorea sp.*). *Revista Colombiana de Biotecnología*, 15(1), 52-60.

Poolman, B., Driessen, A. J., & Konings, W. N. (1987). Regulation of solute transport in streptococci by external and internal pH values. *Microbiological reviews*, 51(4), 498.

Pulgarín, J.M. (2000). Manejo integrado de plagas con énfasis en extractos de plantas. V simposio, *Avances en la floricultura*. Colombia.

Quesada, A., & García-Santamaría, F. (2014). *Burkholderia glumae* en el cultivo de arroz en Costa Rica. *Agronomía Mesoamericana*, 25(2), 371-381.

Quintero, S.R. (2001). Curso taller de agricultura orgánica. Universidad Autónoma De Chihuahua. CIDACOM, Chihuahua, Chihuahua, 227 p.

Ramírez-González, S. I., López-Báez, O., de Jesús Guzmán-Hernández, T., Munguía-Ulloa, S., & Espinosa-Zaragoza, S. (2011). Actividad antifúngica in vitro de extractos de *Origanum vulgare* L., *Tradescantia spathacea* Swartz y *Zingiber officinale* Roscoe sobre *Moniliophthora roreri* (Cif & Par) Evans et ál. *Revista Tecnología en Marcha*, 24(2), 3.

Reina, Y. (2012). El cultivo del ñame en el Caribe colombiano. Banco de la Republica. *Serie de documentos de trabajo sobre economía regional* No. 168. CEER Cartagena, Colombia. 31p.

Saddler, G. S. (1994). IMI Descriptions of fungi and bacteria. 1219. *Mycopathologia* 128(1), 59-60.

Salazar, C., & Betancourth, C. (2009). Evaluación de extractos de plantas para el manejo de polilla guatemalteca (*Tecia solanivora*) en cultivos de papa en Nariño, Colombia. *Agronomía Colombiana*, 27(2), 219.

Saylor, R. J., Cartwright, R. D., & Yang, Y. (2006). Genetic characterization and real-time PCR detection of *Burkholderia glumae*, a newly emerging bacterial pathogen of rice in the United States. *Plant disease*, 90(5), 603-610.

Sen, A., & Batra, A. (2012). Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extracts of medicinal plant: *Melia azedarach* L. *Int J Curr Pharm Res*, 4(2), 67-73.

Shobana, S., Vidhya, V. G., & Ramya, M. (2009). Antibacterial activity of garlic varieties (*ophioscordon* and *sativum*) on enteric pathogens. *Current Research Journal of Biological Sciences*, 1(3), 123-126.

Silva, L. D., Oniki, G. H., Agripino, D. G., Moreno, P. R., Young, M. C. M., Mayworm, M. A. S., & Ladeira, A. M. (2007). Biciclogermacreno, resveratrol e atividade antifúngica em extratos de folhas de *Cissus verticillata* (L.) Nicolson & Jarvis (Vitaceae). *Rev Bras Farmacogn*, 17, 361-367.

Togashi, N., Shiraishi, A., Nishizaka, M., Matsuoka, K., Endo, K., Hamashima, H., & Inoue, Y. (2007). Antibacterial activity of long-chain fatty alcohols against *Staphylococcus aureus*. *Molecules*, 12(2), 139-148.

Tous, J. (2008). *Caracterización Morfológica y Molecular del Hongo Colletotrichum spp, Agente causal de la Antracnosis en Ñame. (Dioscorea spp) en los Departamentos de Córdoba, Bolívar y Sucre.* (Tesis de grado). Universidad de Sucre. Facultad de Educación y Ciencias, Sincelejo, p. 73.

Trumpower, B. L., & Gennis, R. B. (1994). Energy transduction by cytochrome complexes in mitochondrial and bacterial respiration: the enzymology of coupling electron transfer reactions to transmembrane proton translocation. *Annual review of biochemistry*, 63(1), 675-716.

Tsushima, S. (2011). Study on control and epidemiology of bacterial grain rot of rice. *Journal of General Plant Pathology*, 77(6), 358.

Urakami, T, Ito Yoshida, C. & Araki H. (1994). Transfer of *Pseudomonas plantarii* and *Pseudomonas glumae* to *Burkholderia* as *Burkholderia* spp. and description of *Burkholderia vandii* sp. nov. *Int. J. Syst. Bacter.*, 44, 235–245.

Ultee, A., Bennik, M. H. J., & Moezelaar, R. (2002). The phenolic hydroxyl group of carvacrol is essential for action against the food-borne pathogen *Bacillus cereus*. *Applied and environmental microbiology*, 68(4), 1561-1568.

Vega, M. E. G. (2012). El ñame (*Dioscorea* spp.). Características, usos y valor medicinal. Aspectos de importancia en el desarrollo de su cultivo. *Cultivos Tropicales*, 33(4), 5-16.

Vega-Jarquín, C. (2016). Identificación de metabolitos bioactivos de Neem (*Azadirachta indica* Adr. Juss.). *La Calera*, 14(23).

Vitola, D., & Pérez, A. (2016). Bioactividad de extracto de *Annona muricata* y aceites esenciales de *Citrus aurantium* contra *Phytophthora cinnamomi*. *Revista Colombiana de Ciencia Animal-RECIA*, 8, 325-334.

Vitola, D., y Hernández, J. (2015). *Evaluación in vitro de la eficiencia de aceites esenciales de cuatro plantas aromáticas contra Colletotrichum gloeosporioides (Penz.) Penz. & Sacc. Causante de la antracnosis en cultivos de ñame en el departamento de Sucre.* (Tesis de pregrado). Universidad de Sucre, Sincelejo, Colombia, pp. 89.

Yang, X. 2004. *Identifcation of bacterial pathogens causing panicle blight of rice in Louisiana.* (Thesis M.Sc). The Department of Plant Pathology and Crop Physiology, Louisiana State University and Agricultural and Mechanical College, USA.

Zhang, S. 2004. *Tissue culture and transformation for introducing genes useful for pest management in rice.* (Ph.D. Thesis). Plant Pathology & Crop Physiology, Louisiana State University. p. 135.

Zhou, X. G., McClung, A. M., Way, M. O., Jo, Y., Tabien, R. E., & Wilson, L. T. (2011). Severe outbreak of bacterial panicle blight across Texas Rice Belt in 2010. *Phytopathology*, 101(6), S205.

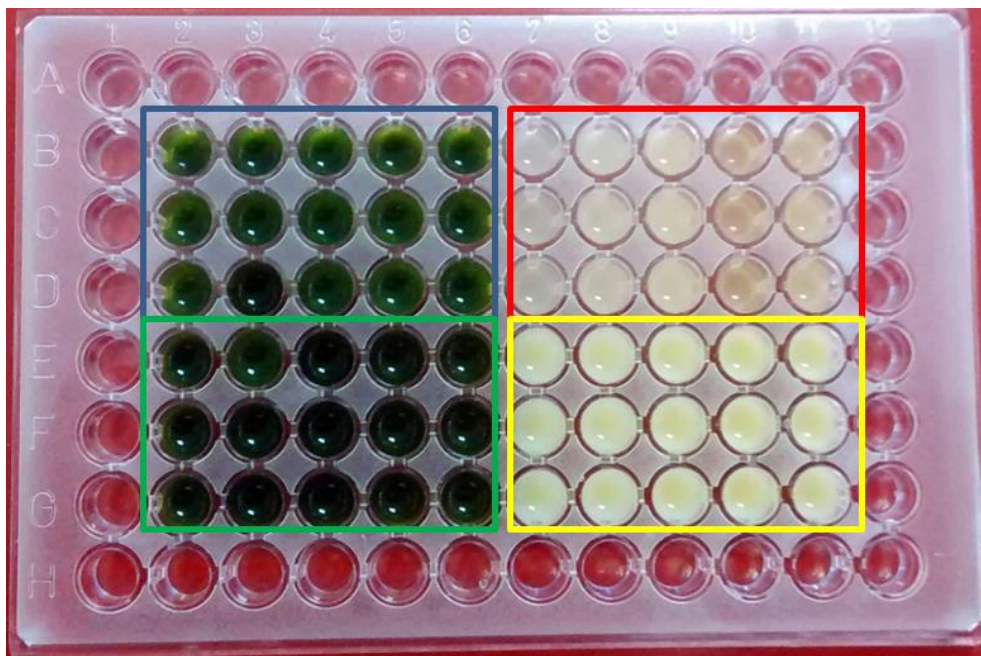
Zhu B., Lou M., Huai Y., Xie G., Luo J. & Xu L. (2008). Isolation and identification of *Burkholderia glumae* from symptomless rice seeds. *Rice Science*, 15(2), 145–149.

11. Anexos

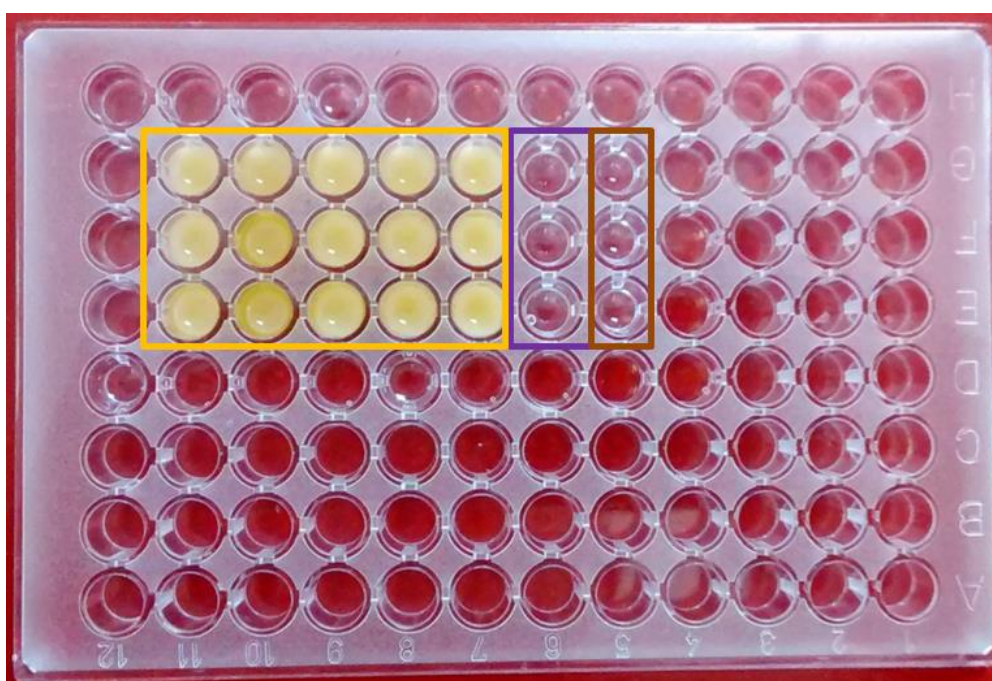


Anexo 1. Rotaevaporador compacto con vidriería diagonal, MODEL: N-1200B MARCA:EYELA, para la concentración de extractos

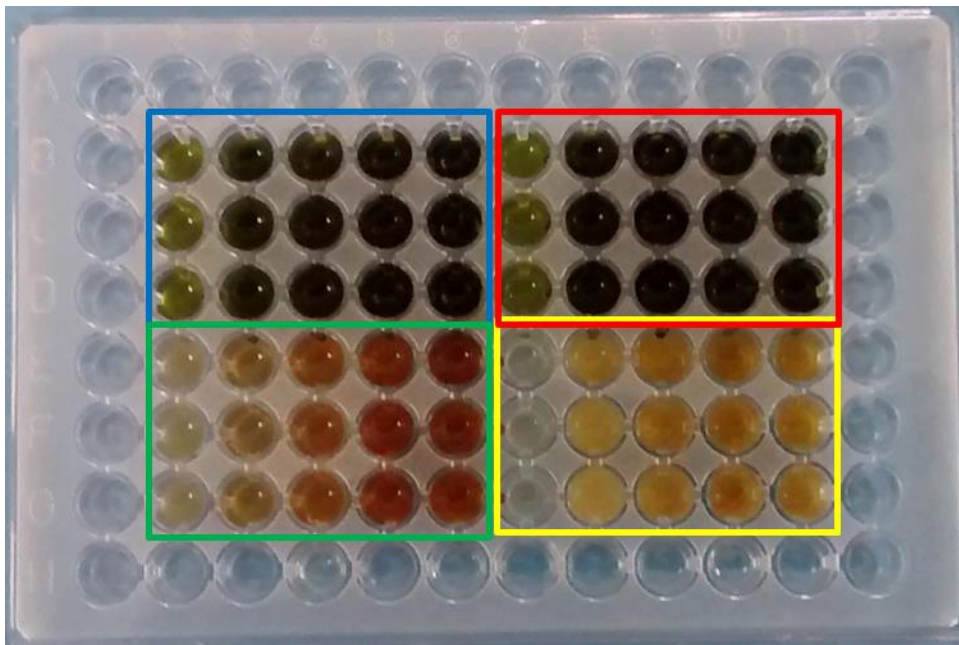
Anexo 3. Prueba Inhibición de la germinación de conidias del extracto de semillas de Melia en concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20% (naranja: extracto de semillas de Melia; violeta: testigo; café: control positivo).



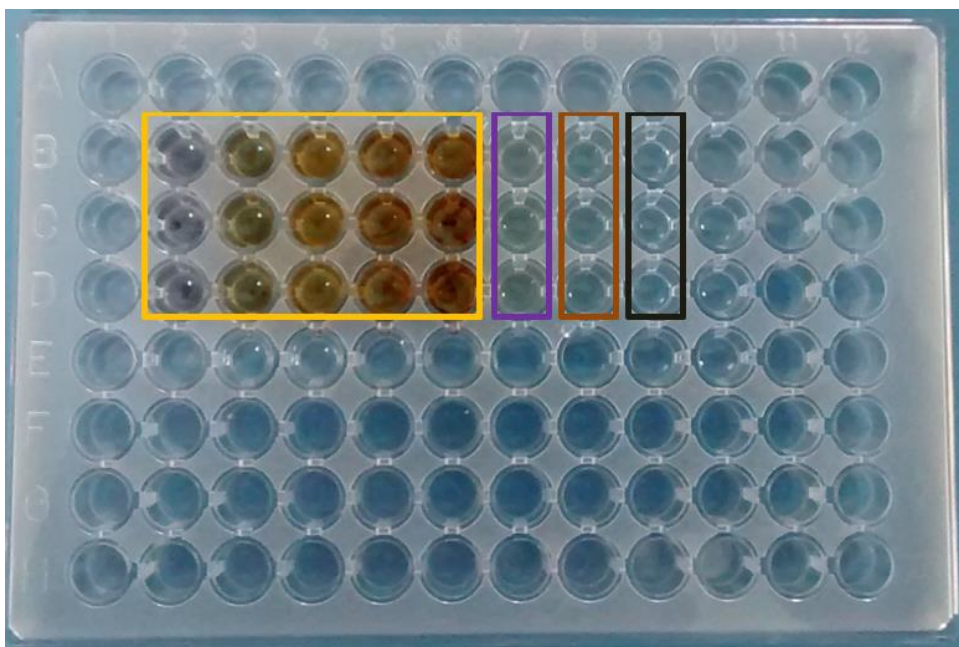
Anexo 4. Prueba de Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (MGC) de germinación de las conidias, de extractos de hojas y frutos de Melia y Neem en concentraciones de 5, 6, 7, 8, 9% por triplicado (azul: extractos de hojas de Neem; rojo: extracto de frutos de Neem; verde: extracto de hojas de Melia; amarillo: extracto de frutos de Melia)



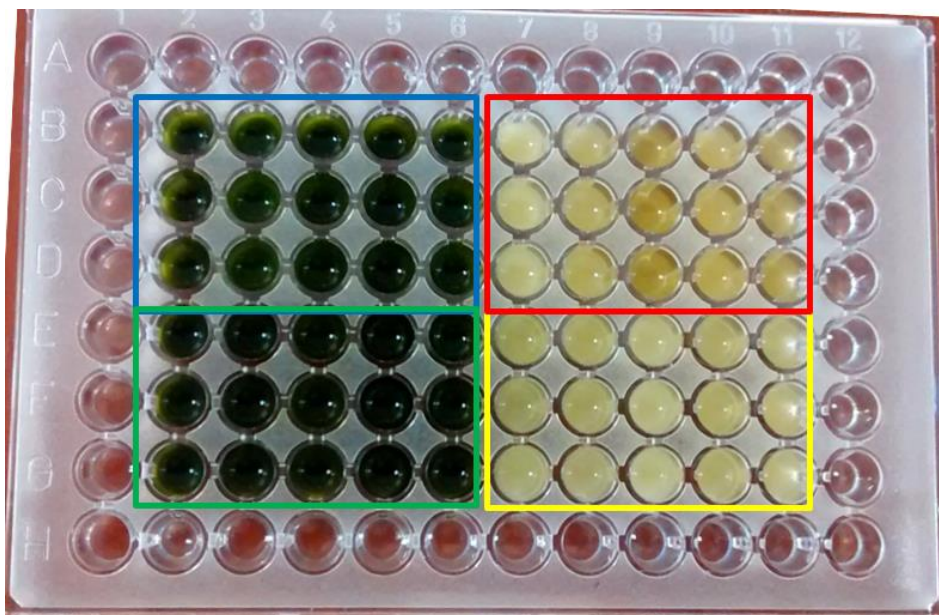
Anexo 5. Prueba de Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima fungicida (MGC) de germinación de las conidias, de extracto de semillas de Melia en concentraciones de 10, 11, 12, 13 y 14% por triplicado (naranjado: extracto de semillas de Melia; violeta: testigo; café: control positivo).



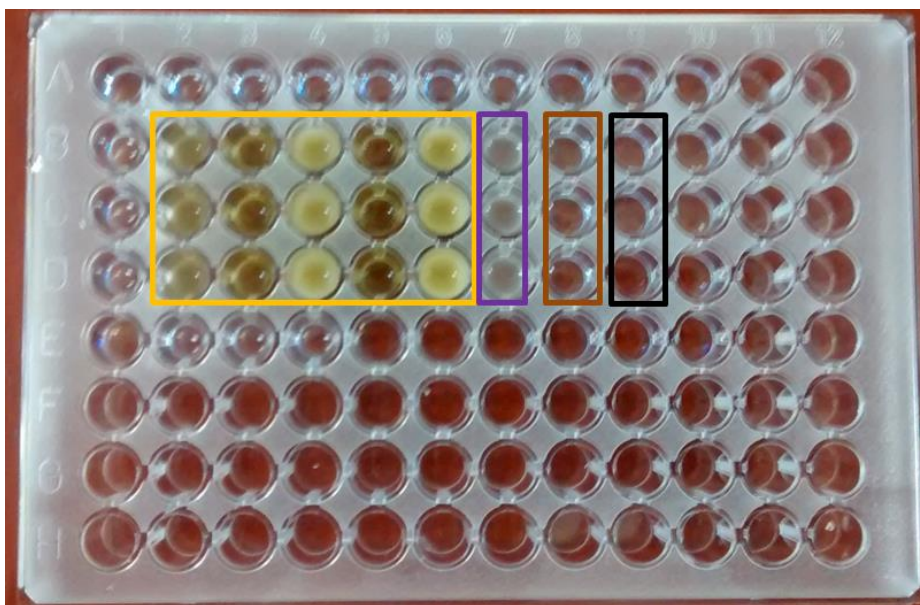
Anexo 6. Prueba de actividad antibacteriana de extractos de hojas y frutos de Melia y Neem en concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20% por triplicado (azul: extractos de hojas de Melia; rojo: extracto de hojas de Neem; verde: extracto de frutos de Melia; amarillo: extracto de frutos de Neem)



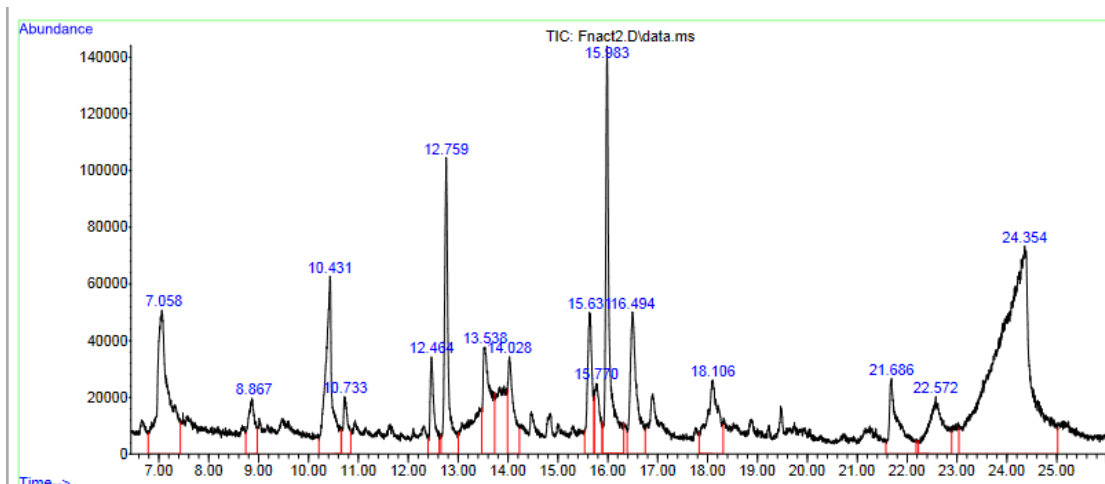
Anexo 7. Prueba de actividad antibacteriana del extracto de semillas de Melia en concentraciones de 1, 5, 10, 15 y 20% (naranjado: extracto de semillas de Melia; violeta: testigo; café: control positivo; negro: control negativo).



Anexo 8. Prueba de Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MFC) de extractos de hojas y frutos de Melia y Neem, en concentraciones de 15, 16, 17, 18, 19% para los extractos de hojas de Neem y Melia por triplicado y en concentraciones de 10, 11, 12, 13, 14, 15% para frutos de Neem y Melia por triplicado (azul: extractos de hojas de Neem; rojo: extracto de frutos de Neem; verde: extracto de hojas de Melia; amarillo: extracto de frutos de Melia)



Anexo 9. Prueba de Concentración mínima inhibitoria (MIC) y concentración mínima bactericida (MBC) de extracto de semillas de Melia en concentraciones de 10, 11, 12, 13, 14 y 15 % por triplicado (naranjado: extracto de semillas de Melia; violeta: testigo; café: control positivo; negro: control negativo).

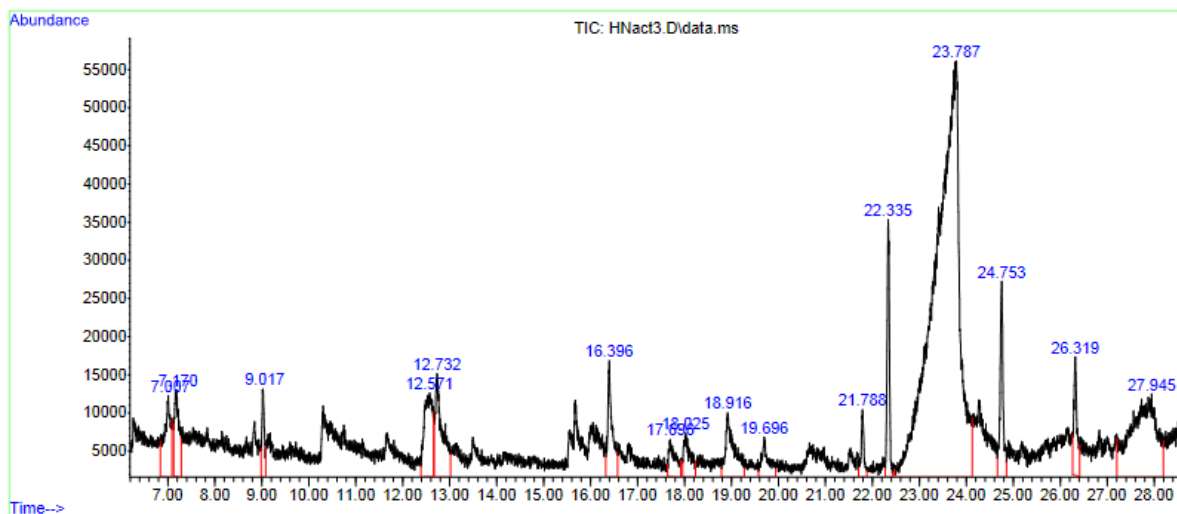


Anexo 10. Cromatograma del extracto de hojas de Neem

ITEM	TIEMPO DE RETENCION (Tr) min	% AREA	COMPUESTO IDENTIFICADO
1	7,058	8,639	2-Hydroxy-gamma-butyrolactone
2	8,867	1,866	1-Methyl-4-amino-4,5(1H)-dihydro-1,2,4-triazole-5-one
3	10,431	6,037	D-Alanine, N-propargyloxycarbonyl-, isohexyl ester
4	10,733	1,456	1-Butanol, 2-nitro-
5	12,464	2,133	2-Propanamine, N-methyl-N-nitroso-
6	12,759	5,639	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-
7	13,538	4,188	2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy-
8	14,028	2,873	N-[4-Aminobutyl]aziridine
9	15,631	3,389	2-Norpinanol, 3,6,6-trimethyl-
10	15,77	1,849	2-Pentenoic acid, 3-methyl-, methyl ester
11	15,983	8,11	5-Hydroxymethylfurfural
12	16,494	4,973	2-Deoxy-D-galactose
13	18,106	4,346	1-Nitro-2-acetamido-1,2-dideoxy-d-mannitol
14	21,686	3,748	Butanoic acid, 4-amino-3-hydroxy-, (±)-

15	22,572	4,387	Caryophyllene
16	24,354	36,367	2-Formyl-9-[β-d-ribofuranosyl]hypoxanthine

Anexo 11. Compuestos identificados del extracto de hojas de Neem por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.

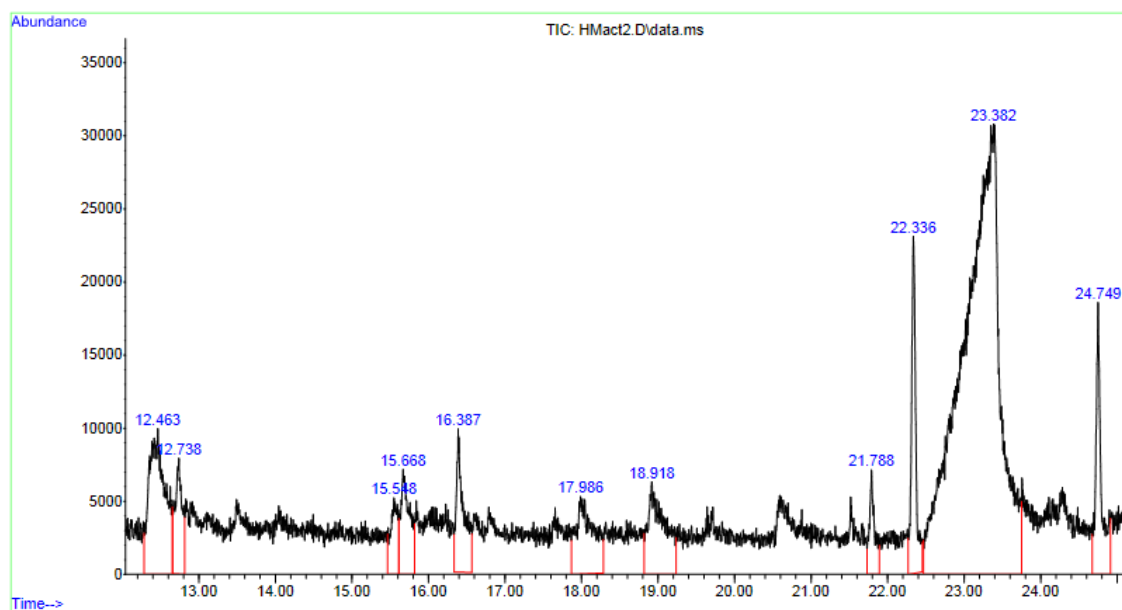


Anexo 12. Cromatograma del extracto de frutos Neem.

ITEM	TIEMPO DE RETENCION (Tr) min	% AREA	COMPUESTO IDENTIFICADO
1	7,007	2,828	2-Hydroxy-gamma-butyrolactone
2	7,17	2,189	α -D-Mannopyranoside, methyl 3,6-anhydro-
3	9,017	1,169	Benzeneacetaldehyde
4	12,571	3,781	3,4-Furandiol, tetrahydro-, cis-
5	12,732	3,983	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-
6	16,396	2,8	1-Nitro-2-propanone
7	17,696	1,322	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-
8	18,025	1,571	Acetic acid, [(aminocarbonyl)amino]oxo-
9	18,916	2,972	Ethanone, 1-(2-hydroxy-5-methylphenyl)-
10	19,696	1,407	2,4,4-Trimethyl-3-hydroxymethyl-5a-(3-methyl-but-2-enyl)-cyclohexene
11	21,788	1,036	1-(3,6,6-Trimethyl-1,6,7,7a-tetrahydrocyclopenta[c]pyran-1-

			yl)ethanone
12	22,335	3,228	Caryophyllene
13	23,789	55,292	2-Formyl-9-[β -d-ribofuranosyl]hypoxanthine
14	24,753	2,118	(1S,2E,6E,10R)-3,7,11,11-Tetramethylbicyclo[8.1.0]undeca-2,6-diene (sinonimo: bicyclogermacrene)
15	27,945	11,24	3-Deoxy-d-mannonic lactone

Anexo 13. Compuestos identificados del extracto de frutos de Neem por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.

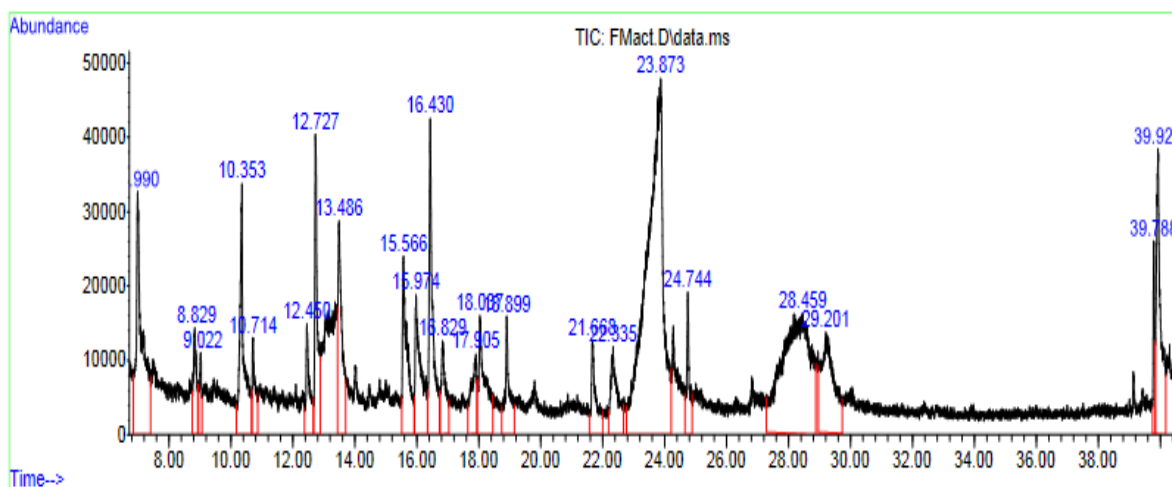


Anexo 14. Cromatograma del extracto de hojas de Melia.

ITEM	TIEMPO DE RETENCION (Tr)min	% AREA	COMPUESTO IDENTIFICADO
1	12,463	8,205	3,4-Furandiol, tetrahydro-, cis-
2	12,738	2,788	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-
3	15,548	1,937	3,3-Bis(carbamino)diaziridine
4	15,668	3,263	Phenol, 4-ethenyl-
5	16,387	3,597	[5-Hydroxymethyl)-1,3-dioxolan-4-yl]methanol

6	17,986	4,724	Acetic acid, [(aminocarbonyl)amino]oxo-
7	18,918	5,31	4-Acetoxy-3-methoxystirene
8	21,788	1,871	3-Buten-2-one, 4-(2,5,6,6-tetramethyl-1-cyclohexen-1-yl)-
9	22,336	4,991	Isocaryophyllene
10	23,382	58,332	2-Formyl-9-[β -d-ribofuranosyl]hypoxanthine
11	24,749	4,983	Cyclohexane, 1-ethenyl-1-methyl-2-(1-methylethenyl)-4-(1-methylethylidene)-

Anexo 15. Compuestos identificados del extracto de hojas de Melia por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.

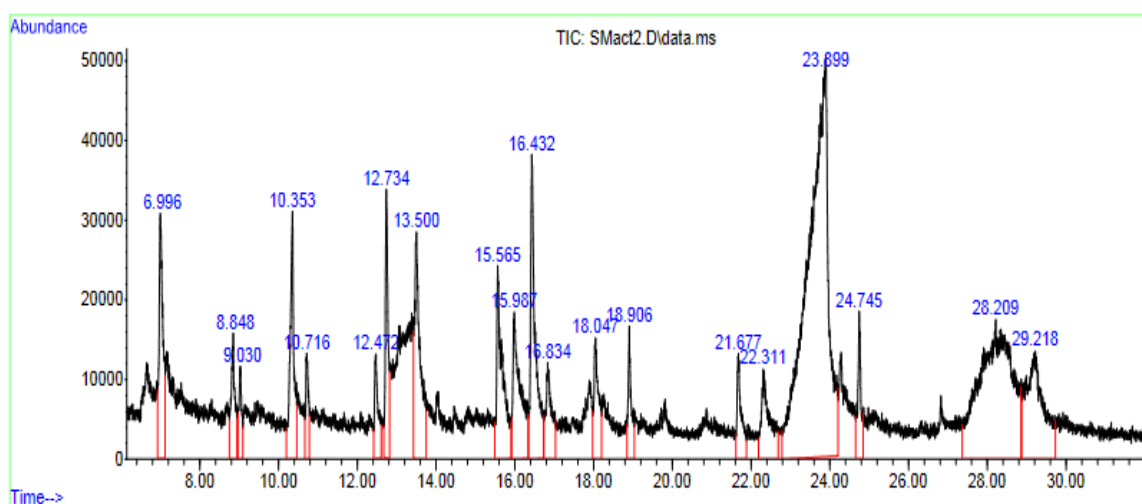


Anexo 16. Cromatograma del extracto de frutos de Melia.

ITEM	TIEMPO DE RETENCION (Tr)min	% AREA	COMPUESTO IDENTIFICADO
1	6,99	6,235	2-Hydroxy-gamma-butyrolactone
2	8,829	1,44	1-Methyl-4-amino-4,5(1H)-dihydro-1,2,4-triazole-5-one
3	9,022	0,76	4,5-Dihydro-2(1H)-pentalenone
4	10,353	4,324	D-Alanine, N-propargyloxycarbonyl-, isohexyl ester
5	10,714	1,212	Oxalic acid, cyclobutyl ethyl ester
6	12,45	1,661	Urea, N-butyl-N-nitroso-

7	12,727	3,311	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-
8	13,486	3,558	2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy-
9	15,566	3,656	2,4(1H,3H)-pyrimidinedione, 1-(tetrahydro-2H-pyran-2-yl)-
10	15,974	3,459	5-Hydroxymethylfurfural
11	16,43	4,687	1,2,3-Propanetriol, 1-acetate
12	16,829	1,72	3,4-Furandiol, tetrahydro-, trans-
13	17,905	1,735	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-
14	18,037	3,263	Butanal, 3-methyl-
15	18,899	2,153	2-Methoxy-4-vinylphenol
16	21,668	1,88	N-Methylpyrrolidine-2,2-dicarboxilic acid, dimethyl ester
17	22,335	2,491	2-(Oxan-3-yl)ethanamine
18	23,873	24,481	2-Formyl-9-[β -d-ribofuranosyl]hypoxanthine
19	24,744	1,595	γ -Elemene
20	28,459	14,54	3-Deoxy-d-mannonic lactone
21	29,201	5,47	3-Deoxy-d-mannonic lactone
22	39,788	1,257	n-Hexadecanoic acid
23	39,92	5,113	D-arabino-Hex-1-enitol, 1,5-anhydro-2-deoxy-

Anexo 17. Compuestos identificados del extracto de frutos de Melia por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.



Anexo 18. Cromatograma del extracto de semillas de Melia.

ITEM	TIEMPO DE RETENCION (Tr)min	% AREA	COMPUESTO IDENTIFICADO
1	6,996	3,619	2-Hydroxy-gamma-butyrolactone
2	8,848	1,672	3-Ethoxy-5-propoxymethyl-4,5-dihydroisoxazole
3	9,03	0,928	Benzeneacetaldehyde
4	10,353	3,501	D-Alanine, N-propargyloxycarbonyl-, isohexyl ester
5	10,716	1,106	2-Propenoic acid, 2-hydroxyethyl ester
6	12,472	1,425	3-Amino-2-oxazolidinone
7	12,734	2,776	4H-Pyran-4-one, 2,3-dihydro-3,5-dihydroxy-6-methyl-
8	13,5	4,858	2(3H)-Furanone, dihydro-4-hydroxy-
9	15,565	4,365	2H-Pyran-2-methanol, tetrahydro-
10	15,987	4,113	5-Hydroxymethylfurfural
11	16,432	5,537	1,2,3-Propanetriol, 1-acetate
12	16,834	2,15	3,4-Furandiol, tetrahydro-, cis-
13	18,047	2,163	5,6-Dihydroxypiperazine-2,3-dione dioxime
14	18,906	1,51	2-Methoxy-4-vinylphenol
15	21,677	1,712	Quinoline, 2-butyl-
16	22,311	2,803	1-Hexanamine
17	23,899	30,178	2-Formyl-9-[β-d-ribofuranosyl]hypoxanthine
18	24,745	1,686	γ-Elemene
19	28,209	16,771	3-Deoxy-d-mannoic lactone

Anexo 19. Compuestos identificados del extracto de semillas de Melia por cromatografía de gases acoplado a espectrometría de masa.