



**FACULTAD DE INGENIERÍA, ARQUITECTURA Y
URBANISMO**

**ESCUELA ACADÉMICO PROFESIONAL DE INGENIERÍA
AGROINDUSTRIAL Y COMERCIO EXTERIOR**

TESIS

**OBTENCIÓN DE UN COMPUESTO BIOACTIVO A PARTIR
DE *Streptomyces ssp.* PARA EL CONTROL DE
ANTRACNOSIS EN MANGO (*Mangifera indica*)**

**PARA OPTAR EL TÍTULO PROFESIONAL DE INGENIERO
AGROINDUSTRIAL Y COMERCIO EXTERIOR**

Autor:

**Bach. Menor Quispe Vanessa Eliana
(<https://orcid.org/0000-0002-2733-3003>)**

Asesor:

**MSc. Ing. Miguel Ángel Solano Cornejo
(<https://orcid.org/0000-0002-8221-7443>)**

Línea de investigación:

Infraestructura, Tecnología y Medio ambiente

**Pimentel – Perú
2021**

OBTENCIÓN DE UN COMPUESTO BIOACTIVO A PARTIR DE *Streptomyces ssp.* PARA EL CONTROL DE ANTRACNOSIS EN MANGO (*Mangifera indica*).

Bach. MENOR QUISPE VANESSA ELIANA.

AUTOR (A)

Aprobado por:

MSc. SOLANO CORNEJO MIGUEL ÁNGEL

**Mg. AURORA VIGO EDWARD FLORENCIO
SECRETARIO DEL JURADO**

**Ing. SÍMPALO LÓPEZ WALTER BERNARDO
VOCAL DEL JURADO**

MAYO DEL 2021

DEDICATORIAS

A Dios:

Por darme la vida, por su gracia y amor, por enseñarme el camino y ser mi luz cada día, por la vida que les da a todas las personas que amo y son mi todo.

A mis padres:

José y Rosalía, por su amor y sacrificio desmedido, por enseñarme a ser persistente, que lo mejor y más valioso que uno posee no son las riquezas, sino los valores y la actitud que nos ayuda a conseguir nuestros sueños.

A mi familia:

A mis hermanas Melany y Nicole por sus sacrificios, son mis grandes camaradas.

AGRADECIMIENTO

A mis docentes:

Jorge Leyva Piedra, por su acogida en el laboratorio y por su constante aporte a ésta investigación, por sus consejos, su gran dedicación a la enseñanza y paciencia. Miguel Solano Cornejo, Walter Símpalo López por su apoyo y orientación en el desarrollo de ésta investigación. Al doctor Ángel Ruiz Pico, por su motivación y hacerme partícipe de innumerables diálogos y oportunidades.

INDICE GENERAL

DEDICATORIAS	iii
AGRADECIMIENTO.....	iv
INDICE GENERAL.....	v
Resumen.....	10
Abstract.....	11
I. INTRODUCCIÓN.....	12
1.3.2. <i>Streptomyces spp.</i>	21
1.3.3. <i>Colletotrichum spp.</i>	24
1.3.4. Metabolitos secundarios de los actinomicetos.....	26
1.4. Formulación del problema.....	27
1.6. Hipótesis.....	28
1.7. Objetivos.....	28
1.7.1. Objetivo General.....	28
1.7.2. Objetivos Específicos:.....	28
II. MATERIAL Y MÉTODO.....	29
2.1. Tipo y Diseño de Investigación.....	29
2.1.1. Aplicativa.....	29
2.1.2. Experimental.....	29
2.2. Población y Muestra.....	29
2.2.1. Población.....	29
2.2.2. Muestra.....	30
2.3. Variables, Operacionalización.....	30
2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad... 32	
2.4.1. Balanza digital.....	32
2.4.2. Sonicador.....	32
2.4.3. Placa de Petri de 90 mm - MP90-25I300.....	33
2.4.4. Matraz Erlenmeyer.....	33
2.4.5. Cámara de irradiación UV Bio II Advance.....	34
2.4.6. Microscopio Primo Star HD HAL/LED, CV20, R. HD IP cámara 5MP ...	34
2.4.7. Boeco centrífuga S-8.....	34
2.4.8. Autoclave Modelo 75X (41 qt / 39 litros).....	35
2.4.9. Incubadora con agitación modelo SI-300.....	36
2.4.10. Incubadora BD 53 L – Binder.....	36

2.5.	Procedimientos de análisis de datos	37
2.5.1.	Obtención de un extracto de un tipo de <i>Streptomyces ssp.</i>	37
2.5.1.1.	Caracterización y reconocimiento del material biológico	37
2.5.1.2.	Obtención del extracto extracelular de <i>Streptomyces ssp.</i>	38
2.5.2.	Evaluación de la eficiencia del extracto <i>in vitro</i> de un tipo de <i>Streptomyces spp.</i> frente a <i>Colletotrichum spp.</i>	39
2.6.	Criterios éticos	40
	Durante la investigación utilizará información importante de diferentes fuentes ya sean libros, revistas, páginas web, trabajos virtuales, tesis, entre otras fuentes, respetando los derechos de autor, y se mostrará en las citas bibliográficas de varios párrafos de nuestra investigación. Además, se respetó la información protegida por los autores de libros, artículos y tesis.	40
2.7.	Criterios de Rigor científico	40
III.	RESULTADOS	42
3.1.	Resultados de la obtención de un extracto de un tipo <i>Streptomyces ssp.</i> ...	42
3.1.1.	Codificación de especies de <i>Streptomyces spp.</i>	42
3.1.2.	Reconocimiento microscópico y caracterización macroscópica de <i>Streptomyces spp.</i>	42
3.1.3.	Obtención del cultivo puro de hongo <i>Colletotrichum spp.</i>	44
3.1.4.	Enfrentamiento dual <i>Streptomyces spp.</i> vs. <i>Colletotrichum spp.</i>	46
3.2.	Evaluación de la eficiencia del extracto <i>in vitro</i> de un tipo de <i>Streptomyces ssp.</i> frente a <i>Colletotrichum ssp.</i>	48
3.2.1.	Pruebas enzimáticas	49
3.3.	Resultados de la eficiencia <i>in vivo</i> de <i>Streptomyces spp.</i> Q84 en frutos de mango.....	50
3.4.	Discusión de resultados	52
IV.	CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	56
4.1.	Conclusiones:	56
4.2.	Recomendaciones:	57
VI.	REFERENCIAS	58

INDICE DE TABLAS

<i>Tabla 1. Composición química y valor nutricional del mango.....</i>	<i>19</i>
<i>Tabla 2. Operacionalización de variables para el primer objetivo: Obtención del extracto de Streptomyces spp.....</i>	<i>27</i>
<i>Tabla 3. Operacionalización de variables para el segundo objetivo: Evaluación de la eficiencia in vitro del extracto de Streptomyces spp. contra Colletotrichum spp.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 4. Operacionalización de variables para el tercer objetivo: Evaluación de la eficiencia in vivo del extracto de Streptomyces spp. sobre el mango.....</i>	<i>28</i>
<i>Tabla 5. Codificación de cepas bacterianas de Streptomyces spp.....</i>	<i>42</i>
<i>Tabla 6. Datos del % Inhibitorio de Streptomyces spp. vs. Colletotrichum spp.....</i>	<i>46</i>
<i>Tabla 7. Análisis de varianza para hallar el % Inhibitorio de Streptomyces spp.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 8. Comparación de medias para determinar las diferencias entre las cepas en estudio.....</i>	<i>6</i>
<i>8</i>	
<i>Tabla 9. Prueba de Tukey para determinar el porcentaje inhibitorio.....</i>	<i>47</i>
<i>Tabla 10. Porcentaje de inhibición del extracto de Streptomyces spp.</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 11. Extracto con mayor % inhibición según la prueba de Tukey</i>	<i>49</i>
<i>Tabla 12. Reacciones enzimáticas de 4 de las 5 cepas bacterianas en medios nutritivos.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 13. Descripción de los tratamientos In Vivo.....</i>	<i>50</i>
<i>Tabla 14. Porcentajes obtenidos de la fórmula del % Avance</i>	<i>52</i>
<i>Tabla 15. Prueba de Tukey para determinar la diferencia significativa</i>	<i>69</i>

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Formación de esporas <i>Streptomyces spp.</i>	22
Figura 2. Conidias y setas de <i>Colletotrichum spp.</i> Agrios 2005.....	25
Figura 3: Balanza analítica para determinar pesos con precisión.	32
Figura 4. Equipo Sonicador que nos permite realizar la rotura de células de las cepas bacterianas. Laboratorio PACTUSS.....	32
Figura 5. Muestra las placas con cepas utilizadas para ésta investigación.....	33
Figura 6. Muestra el instrumento de vidrio graduado que se utiliza para realizar titulaciones y filtraciones simples.	33
Figura 7. Cámara de bioseguridad con luz ultravioleta. Laboratorio PACTUSS.....	34
Figura 8. Microscopio óptico del laboratorio PACTUSS.	34
Figura 9. Centrífuga de 4 tubos del laboratorio PACTUS.....	35
Figura 10: Autoclave para esterilización de materiales del laboratorio PACTUSS....	35
Figura 11. Incubadora con agitación del laboratorio PACTUSS.	36
Figura 12. Incubadora microbiológica del laboratorio PACTUSS.	36
Figura 13. Reconocimiento microscópico de <i>Streptomyces spp.</i> código Q84 por microfotografía. Tinción Gram positiva violeta debido a la presencia de peptidoglicano en su pared celular. Hifas de 0.5 – 2 micras. Elaboración propia.....	43
Figura 14. Fotografía de caracterización macroscópica de <i>Streptomyces spp</i> según codificación. (a) código Q84, (b) código Q85, (c) código Q45B, (d) código Q32 y código Q60. (b y e) Excreta de pigmentación blanco grisáceo, (a) naranja, (d) negra y (c) marrón. Elaboración propia.	44
Figura 15. Pruebas enzimáticas de <i>Streptomyces spp</i> Q60. (a) quitinasa y lipasa, (b) celulasa y proteasa.	66
Figura 16. Pruebas enzimáticas de <i>Streptomyces spp</i> Q84. (a) quitinasa y lipasa, (b) celulasa y proteasa.	67
Figura 17. Pruebas enzimáticas de <i>Streptomyces spp</i> Q45.....	67
Figura 18. Pruebas enzimáticas de <i>Streptomyces spp</i> Q45. (a) quitinasa y lipasa, (b) celulasa y proteasa.	68

RESUMEN

“OBTENCIÓN DE UN COMPUESTO BIOACTIVO A PARTIR DE *Streptomyces* ssp. PARA EL CONTROL DE ANTRACNOSIS EN MANGO (*Mangifera indica*)”

*Bach. Vanessa Eliana Menor Quispe*¹

Streptomyces, un género de bacterias extensamente estudiadas, están caracterizadas por poseer un gran potencial para el desarrollo de productos antimicrobianos. Este género gram positivo, es un factor importante en el descubrimiento de compuestos bioactivos de origen microbiano. Dada la importancia de *Streptomyces*, el presente trabajo de investigación tiene por objetivo producir un compuesto bioactivo a partir del extracto puro de una bacteria (*Streptomyces* ssp.) para el control de antracnosis en mango, para lo cual se tomaron las variables: Cepa bacteriana, % Inhibición, % Avance de lesión. Se realizaron pruebas in vitro mediante el método de enfrentamiento dual entre hongo y bacteria para determinar la inhibición y crecimiento de esporas en el hongo. Se determinó el porcentaje de inhibición utilizando el método de porcentaje de inhibición de crecimiento (PIC) dando como resultado a la cepa Q84 con 97.3% de inhibición. Luego, se extrajo el compuesto bioactivo de la cepa Q84 la cual presentó 44,78% de inhibición según la prueba de Tukey. En la evaluación In Vivo, los mangos sanos fueron infestados con el hongo a 10^6 y luego se recubrieron con el extracto de la cepa Q84; posteriormente los frutos de mango fueron sometidos a pruebas de 14 días en incubación con 70-80% de HR, donde se evaluó la progresión de la enfermedad y crecimiento del hongo causante mediante el porcentaje de avance de lesión. Durante éste periodo se demostró mediante la fórmula del % de Avance que el tratamiento 1 logró inhibir el crecimiento del hongo causante de la enfermedad, ya que las manchas en el fruto solo avanzaron un 24% en comparación del testigo donde el Avance de mancha llegó hasta 43.9%.

Palabras claves: *compuesto bioactivo, mango, antracnosis, Streptomyces spp.*

ABSTRACT

“OBTAINING A BIOACTIVE COMPOUND FROM *Streptomyces* ssp. FOR THE CONTROL OF ANTHRACNOSIS IN MANGO (*Mangifera indica*)”

Bach. Menor Quispe Vanessa Eliana

Streptomyces, an extensively studied genus of bacteria, are characterized as having great potential for the development of antimicrobial products. This gram positive genus is an important factor in the discovery of bioactive compounds of microbial origin. Given the importance of *Streptomyces*, the present research work aims to produce a bioactive compound from the pure extract of a bacterium (*Streptomyces* ssp.) For the control of anthracnose in mango, for which the variables were taken: Bacterial strain, % Inhibition, % Advance of lesion. In vitro tests were performed using the dual confrontation method between fungus and bacteria to determine the inhibition and growth of spores in the fungus. The percent inhibition was determined using the percent growth inhibition (PIC) method resulting in strain Q84 with 97.3% inhibition. Then, the bioactive compound was extracted from the Q84 strain, which presented 44.78% inhibition according to the Tukey test. In the In Vivo evaluation, healthy mangoes were infested with the fungus at 106 and then coated with the extract of the strain Q84; subsequently, the mango fruits were subjected to 14-day incubation tests with 70-80% RH, where the progression of the disease and growth of the causative fungus were evaluated by the percentage of advance of the lesion. During this period, it was demonstrated by the formula of % Advancement that treatment 1 managed to inhibit the growth of the fungus causing the disease, since the spots on the fruit only advanced 24% compared to the control where the Spot Advance reached up to 43.9%.

Key words: *bioactive compounds, mango, anthracnose, Streptomyces ssp.*

¹Adscrita a la Escuela Académica de Ingeniería Agroindustrial y Comercio Exterior Pregrado, Universidad Señor de Sipán, Pimentel, Perú, email: mquispevanes@crece.uss.edu.pe.

Código ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-2733-3003>

I. INTRODUCCIÓN

Según Rodríguez (2010) nos menciona que el árbol tropical de mango, en zonas subtropicales se adapta muy bien, prefiere los suelos sueltos, profundos y de pH ligeramente ácidos (Entre 6-7). Necesita de temperaturas bajas o bien, estrés hídrico para la inducción floral y, además altas temperaturas para el cuajado de frutos; sin embargo, desde los años 2005 a 2007 se han detectado nuevas enfermedades en los cultivos, una de ellas es la antracnosis, la cual es muy importante en las zonas húmedas teniendo baja incidencia en los climas secos. Según Rodríguez (2010), ésta enfermedad produce caída de los frutos a temprana edad cuando la infección se produce en frutos jóvenes. Este hongo causa infecciones latentes en los frutos en desarrollo que no se manifiestan hasta después de la cosecha. Los síntomas iniciales son manchas pequeñas de color marrón y las variedades moderadamente resistentes a la antracnosis son Kentt y Tomy Atkins. Para el autor, no existen productos fungicidas autorizados para éste cultivo.

En el año 2010 hacia adelante, un grupo de investigadores de INIA, han generado información sobre la expansión de la enfermedad de la antracnosis, los efectos de las tecnologías de post cosechan y su impacto en los campos de cultivo. También vienen desarrollando otra área desde el año 2010, realizada en conjunto con otros académicos de la Universidad Andrés Bello, que tiene como objetivo el control natural no químico de esta enfermedad enfocándose en la identificación genética de los organismos que causan las lesiones.

Según Rivera (2017), gerente general de la APEM, menciona en la revista Red Agrícola que el comercio del mango desde hace 10 años es una potencia mundial en el Perú, logrando uno de los principales objetivos el haber promovido a Brasil como el segundo exportador.

Según la Sociedad de Comercio Exterior del Perú (COMEXPERÚ, 2018) de acuerdo con las cifras de la Sunat, la historia de exportación del mango peruano data

de 1997, cuando se enviaba apenas 340 toneladas (poco más de US\$ 400,000) y se llegaba a tan solo 4 países del mundo, desde entonces han habido saltos importantes desde 1998 a 2015, años en los que se registraron crecimientos interanuales de 23% a 41%, respectivamente, para llegar a las más de 160,000 toneladas que se exportan hoy, por casi US\$ 200 millones, a 39 países del mundo.

Dados los datos anteriores, fue necesario llevar a cabo ésta investigación, utilizando la metodología de Padilla, análisis de varianza y método de Tukey, teniendo como objetivo la obtención de un compuesto a partir de una bacteria y su evaluación *in vitro* e *in vivo* frente al crecimiento del hongo causante de la antracnosis.

1.1. Realidad problemática

Según Serrano et al. (2010) La enfermedad de la antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. y Sacc), es la enfermedad principal producida por hongos del mango a nivel mundial, ya que es la responsable de grandes pérdidas económicas pre y postcosecha, principalmente en las regiones que cuentan con la temperatura y humedad relativa elevada. Esta enfermedad está presente en México, en todas sus regiones productoras en las que se han reportado incidencias severas durante la floración, fructificación y postcosecha, produciendo pérdidas que varían entre el 15 y 60%.

Allende *et al.* (2001) menciona que a pesar de que no existen datos estadísticos precisos, se estima que el 30 y 60% del total de la producción son pérdidas poscosecha por antracnosis en mango. Entre las alternativas que han mostrado potencial como agentes de control para las enfermedades poscosecha, se encuentra el uso de microorganismos, tratamientos hidrotérmicos, luz ultravioleta, atmósferas modificadas, extractos de plantas y aire caliente.

Ploetz y Freeman (2009) nos dicen que la enfermedad más importante del mango en áreas de producción con humedad alta es la antracnosis causada por *Colletotrichum gloeosporioides*. Aunque se producen pérdidas en el campo, las pérdidas post cosecha son las más significativas, por lo que la antracnosis representa grandes desafíos para quienes están involucrados en el comercio internacional de este fruto y considera que las enfermedades en el mango, igual que en otros cultivos pueden originar pérdidas, ya que influyen y afectan en la planta en su capacidad fisiológica y productiva, pudiendo incidir en la calidad de los frutos y provocar su destrucción total en otros.

A pesar de no haberse encontrado porcentajes de pérdidas estadísticas pos cosecha de frutos de mango por antracnosis en el Perú, podemos decir que esta enfermedad tiene mucha importancia en la fruticultura tropical del país, debido a los daños económicos mundiales que ocasiona en frutos y el elevado rango de hospederos que tienen los patógenos.

1.2. Antecedentes de estudio

Según Pérez, León, y Galindo (2014) mencionan que el uso de microorganismos antagonistas es una forma de controlar los fitopatógenos. Nos mencionan que un producto orgánico como el compost, proviene de microorganismos que tienen la capacidad de producir metabolitos secundarios que son de gran atracción para el sector agrario. Algunos de estos microorganismos, fueron aislados, y se evaluó la capacidad antagonista que tienen 85 actinomicetos vs. fitopatógenos que aturden a *Solanum tuberosum*, todo ello mediante cultivo en placa. Como resultado se obtuvo que de los aislados a *Ralstonia solanacearum* se obtuvo 23.5% de actividad antagonista, a *Phytophthora infestans* 43.5%, a *Pectobacterium carotovorum* 16.4%, a *Rhizoctonia solani* 61.1%, y a *Fusarium sp* 28.5%. Cepas del género *Streptomyces* fueron identificadas como las de mayor actividad. Debido a la capacidad antagonista mostrada, los actinomicetos fueron excelentes candidatos en el control de hongos y patógenos del tubérculo para el desarrollo de una agricultura soportable. Además, los extractos orgánicos que se obtuvo con diclorometano y acetato de etilo de las cepas que fueron seleccionadas (AACI-22, ACZI-5, ACZII-88, ACZIII-84 y ACZIII-35) mostraron actividad antimicrobiana, la extracción de acetato de etilo de la cepa AACI-5 mostró mayor importancia debido a que tiene mayor amplitud en el espectro de actividad y presenta una CMI (Concentración Mínima Inhibitoria) de 0.0625 mg. mL⁻¹ vs. a *Phytophthora infestans*. (p. 116).

Según Liu *et al.* (2013), mencionan que: Los estreptomicetos son la fuente más abundante de antibióticos. Típicamente, cada especie produce varios antibióticos, siendo el perfil específico de especie *Streptomyces coelicolor*, la especie modelo, produce al menos cinco antibióticos diferentes. Revisamos la regulación de la biosíntesis de antibióticos en *S. coelicolor* y otros modelos de estreptomicetos a la luz de estudios recientes. La biosíntesis de cada antibiótico está especificada por un gran grupo de genes, que generalmente incluye genes reguladores (reguladores situados en grupos [CSR]). Estas son el principal punto de conexión con una gran

cantidad de sistemas regulatorios conservados que monitorean la fisiología del organismo, estado de desarrollo, densidad de población y medio ambiente para determinar el inicio y el nivel de producción de cada antibiótico. Algunos CSR también pueden ser sensibles a los niveles de productos de otras vías antibióticas en el mismo organismo, y especializado moléculas pequeñas reguladoras tales como gamma-butirolactonas. Estas las interacciones pueden dar como resultado un circuito de alimentación de avance autorreforzado y la conversación cruzada compleja entre las vías. Las señales fisiológicas y los mecanismos reguladores pueden ser de importancia práctica para la activación de muchos genes genéticos secundarios crípticos rutas del clúster reveladas por la secuenciación reciente de numerosos Genomas de *Streptomyces* (p. 112).

Según Santamaría *et al.* (2011) establecieron que: La enfermedad de la antracnosis es una limitante para la vida útil de los frutos de papaya. Como se ha mencionado a lo largo de ésta investigación, ésta enfermedad es originada principalmente por el hongo *Colletotrichum gloeosporioides*, pero es posible que la enfermedad sea causada por otras especies de *Colletotrichum*. Para el control de esta enfermedad en el cultivo en Yucatán, se recomendaron distintos fungicidas, sin embargo, muchos están prohibidos por la EPA, el cuál es el principal comprador de la papaya yucateca. Durante los meses de marzo y mayo del año 2006, en Yucatán se aislaron 9 cepas de *Colletotrichum* de frutos de tres de sus regiones productoras. Éstas fueron identificadas mediante claves taxonómicas. Como objetivo, se obtuvo, determinar la capacidad del efecto de fungicidas que están permitidas por la EPA en las esporas causante de la antracnosis, identificar el agente causal de la enfermedad de la antracnosis en papaya en Yucatán e indagar sobre el efecto de los inductores en la resistencia del control de esta enfermedad. Los bioensayos permitieron evaluar la efectividad en frutos inoculados y sensibilidad in vitro, posteriormente en febrero de 2008, noviembre de 2007 y agosto del mismo año, se evaluaron los inductores de resistencia y los de efectos de la aplicación pos cosecha de los fungicidas ante la antracnosis en frutos en los que se le indujo la infección naturalmente. Como resultado se obtuvo que en las tres de las localidades de Yucatán, se encontraron

dos especies causante de antracnosis identificadas como *C. gloeosporioides* y *C. dematium*. En condiciones in vitro el desarrollo de *Colletotrichum. dematium* fue inhibido sólo por prochloraz, ferbam y clorotalonil; el desarrollo de *Colletotrichum gloeosporioides* fue inhibido por clorotalonil;. En frutos inoculados prochloraz tuvo 100% de efectividad para las dos especies, mientras que azoxystrobin tuvo 87.5% de efectividad para *C. gloeosporioides* y 3.3% para *C. dematium* (p. 631).

1.3. Teorías relacionadas al tema

1.3.1. Mango

1.3.1.1. Generalidades del mango

Según Galán (2000), el mango (*Mangifera indica L.*) es un fruto que posee la piel no comestible, es de forma ovalada y su color varía entre de amarillo macilento y rojo enérgico según su variedad. La pulpa es viscosa y jugosa. El sabor del fruto maduro se caracteriza por ser dulce, pero es muy ácido cuando aún no ha alcanzado su etapa de madurez. Se considera una fruta con mucha agua y mucha fibra, a excepción de las variedades mejoradas que no poseen mucha fibrociudad. Todos los frutos de mango, tienen un hueso interno (pepa), cuyo tamaño oscila entre los 5 y 20 cm, su peso varía entre 300 y 400 g, sin embargo, algunos frutos pueden alcanzar más de 1 kg. Además, el mango es reconocido como uno de los 3 o 4 frutos tropicales más finos

Según Galán (2000), debido a su atractivo color naranja y sabor agradable, el mango también es conocido por los consumidores como "el melocotón de los trópicos". Se sabe que está maduro por su agradable aroma, y además cuando presionamos la piel con los dedos afloja fácilmente. Debido a su estupendo sabor, aroma, color y textura puede consumirse solo o transformado en un subproducto como mermeladas, jaleas, e incluso ser utilizado para sazonar o acompañar carnes. Además, en otros países, cuando el mango aún no ha alcanzado su grado de madurez, se convierte en un ingrediente tradicional para preparar el famoso plato "chutney", como es el caso de India.

Según Quintero (2013) menciona que, en Colombia, el mango común, (*Mangifera indica L.*), es reconocido y muy bien aceptado gracias a sus características naturales como el contenido de azúcares, aromas y pigmentos, además de sus propiedades organolépticas, lo cual lo hace atractivo para cualquier consumidor. Quintero afirma que éste fruto puede comercializarse y transportarse en

diferentes estados de madurez, según los requerimientos del mercado y del consumidor final.

1.3.1.2. Composición química y valor nutricional

Según Villamizar y Giraldo (2010) el mango es una fruta popular y es consumido mayormente en su estado natural de fruto, por ser considerado como la fruta tropical más deliciosa. El mango posee una importante fuente nutritiva gracias a su contenido de vitaminas y minerales. Como se puede observar, en la tabla 1 se muestra el contenido de nutrientes en promedio por 100 gr de pulpa de fruto.

Tabla 1. Composición química y valor nutricional del mango

Componente	Valor
Agua	81, 7 %
Calorías	66%
Proteínas	0,7 g
Grasas	0,4 g
Carbohidratos	16. 8 g
Fibra	0,9 g
Ceniza	0,4 g
Calcio	10 mg
Fósforo	13 mg
Hierro	0,4 mg
Sodio	7 mg
Potasio	189 mg
Vitamina A	4, 800 UI
Tiamina	0.05 mg
Rivoflavina	0.05 mg
Niacina	1.1 mg
Ácido ascórbico	35 mg

Fuente: Recuperado de Revista Tumbaga 2010, 5, 149-164.

1.3.1.3. Cosecha y maduración del mango:

Según Huete (2007), el árbol de mango tiene un tamaño mediano, con más o menos 15-30 m de altura. Su tronco tiene una forma cilíndrica que posee un diámetro de 70-100cm, tiene forma recta, y su corteza es de color gris/café. Tiene grietas que van a lo largo del tronco y surcos reticulados con poca profundidad, que en algunas ocasiones contienen gotas de resina. Naturalmente posee un sistema radical, su copa es bastante frondosa, es denso y vigoroso; posee una raíz principal de 6 a 8 m y un conjunto de raíces secundarias sobre la superficie, cuya mayor concentración está en los primeros 2.5 m de suelo. La savia que se produce en el tronco es tóxica e irritante, además, puede causar lesiones en la piel. Por ser vigoroso, se facilita el desarrollo del árbol en suelos con poca profundidad, relativamente pobres y hasta cierto límite, impermeables.

1.3.1.4. Adaptación Climática y Edáfica

Según Huete (2007) la temperatura es un factor que influye mucho en el desarrollo, crecimiento y floración del fruto de mango. Para su cultivo, las condiciones ideales son entre los 22°C y 33°C. Las características de la fruta, su dulzura y excelente madurez se desarrollan mayormente en temperaturas altas durante la noche (28-32°C), pero su color más atractivo se desarrolla en los días con temperaturas altas y las noches frescas (12 a 20°C).

1.3.1.5. Antracnosis en el fruto de mango

Según Rodríguez (2002) la antracnosis es la principal enfermedad en el cultivo de mango. Así como en otros frutales; la enfermedad de la antracnosis afecta a los brotes, hojas, inflorescencias y frutos. La característica más importante son las deformaciones, rupturas, y láminas quebradizas en las hojas jóvenes. Además, causa manchas de diferentes tamaños, con forma irregular, de coloración

marrón y variable tamaño. Cuando ataca a los primeros brotes (no desarrollados) la infección causada por la enfermedad se expande al tejido joven y causa muerte apresurada descendente. Durante la inflorescencia causa hiperplasia (excesivo crecimiento durante la división celular), comienzan a aparecer manchas oscuras de tamaño pequeño en las flores y las ramas, lo que ocasiona la caída de flores o la muerte parcial de la inflorescencia. Según el autor los frutos pueden ser atacados en cualquier estado. Cuando los frutos empiezan a formarse, comienzan a aparecer manchas cerca al pedúnculo o incluso sobre la superficie, causando así, aborto del fruto. Cuando el fruto empieza a desarrollarse, comienzan a aparecer manchas circulares, color oscuro que forman grietas en la parte central del fruto. No se manifiestan ataques en la etapa final, pero sí se mantienen latentes hasta que inicia el proceso de maduración natural o en almacén. En este estado comienzan a aparecer unas manchas oscuras de diámetro pequeño ligeramente profundas que pueden unirse, causando grandes necrosidades. Las lesiones son mayormente superficiales, ya que al levantar la cáscara, se observa la pulpa sana.

1.3.2. *Streptomyces spp.*

Según Chater (1989) las colonias de *Streptomyces spp* que crecen en un medio de agar adecuado son efectivamente organismos multicelulares que, a medida que crecen, muestran regiones distintas desde el punto de vista morfológico, fisiológico y funcional.

Según Wildermuth (1970) menciona que las puntas de las hifas que crecen en el agar convierten los nutrientes circundantes en biomasa, mientras que a menudo, las hifas en la región central de la colonia muestran una extensa lisis, quizás relacionadas con el suministro de sus contenidos como nutrientes a las hifas aéreas en crecimiento.

Según Wildermuth y Hopwood (1970) las hifas aéreas en sí tienen dos tipos de organización celular: las hifas multinucleoidales que resultan de la

reutilización de materiales del micelio del sustrato para una segunda ronda de crecimiento, y las cadenas de compartimentos uninucleoidal que se encuentran en las puntas hifales y que eventualmente se forman en cadenas de esporas.



Figura 1. *Formación de esporas Streptomyces spp.*

Fuente: Libro: "Genetics and Product Formation in Streptomyces" (1970).

1.3.2.1. Eventos morfológicos y bioquímicos durante la esporulación de hifas aéreas

Según Guijarro et al. (1988) cuando se forman hifas aéreas, las colonias de *Streptomyces* especie coelicolor cambian de aspecto y propiedades de la superficie: el micelio aéreo se ve blanco y peludo, y es hidrofóbico. En este momento, varias nuevas proteínas de función desconocida se depositan en la superficie de las hifas. Persisten a través de la esporulación, y pueden lavarse de las esporas mediante un tratamiento con detergente suave, de ahí el término Sap, para las proteínas asociadas a las esporas.

Según Wildermuth y Hopwood (1970) mencionan que durante la extensión de las hifas aéreas y la citoquímica muestra que los gránulos de glucógeno están ausentes. Eventualmente, las puntas de muchas hifas aéreas se transforman en largas cadenas de esporas. Los primeros signos de esto son el enrollamiento de las puntas y el inicio de la tabulación de esporulación. Los tabiques de esporulación

son morfológicamente distintos de las paredes transversales ocasionales formadas en hifas vegetativas, presumiblemente porque su función final es permitir que las células se separen. Dentro de una hifa, se forman más o menos sincrónicamente ya intervalos regulares, un cromosoma (junto con elementos extracromosómicos) se divide en cada compartimento. Al mismo tiempo, se forman abundantes depósitos de glucógeno. Finalmente, los compartimentos cambian de forma, de cilindros a elipsoides, y sufren engrosamiento de la pared para dar lugar a esporas reconocibles. A medida que esto sucede, los depósitos de glucógeno desaparecen y el micelio aéreo cambia de blanco a gris, un color asociado con las esporas maduras de *Streptomyces* especie *coelicolor*. Diferentes colores de esporas están asociados con muchas otras especies, lo que sugiere que se producen diferentes pigmentos.

1.3.2.2. Efecto antifúngico de *Streptomyces* spp.

Según Gilles *et al.* (2011) mencionan que los agentes quimioterapéuticos derivados de *Streptomyces* y otras actinobacterias incluyen agentes antibacterianos, anticancerosos, inmunosupresores, antihelmínticos y antifúngicos. La química de este metabolismo secundario, es estructuralmente diversa y se basa en un número de esqueletos diferentes. estructuras, por ejemplo, polipéptidos, b-lactamas, péptidos y pirroles. La función natural de muchos metabolitos secundarios de *Streptomyces* se considera como antibióticos que impiden el crecimiento de microorganismos en competencia; sin embargo, hay ejemplos claros de roles en la comunicación celular y la señalización. Los hábitats principales de los estreptomicetos, los suelos y los sedimentos acuáticos son biológicamente diversos y fluctúan en la disponibilidad de nutrientes. A través de la producción de numerosas enzimas extracelulares, como quitinasas, lipasas, amilasas, proteasas y celulasas, se cree que los estreptomicetos se alimentan principalmente de materia orgánica en descomposición. La competencia surge porque esta es una fuente de nutrición común a muchos otros organismos, por ejemplo, hongos, nematodos, insectos y otras bacterias.

Además, según Gilles *et al.* (2011), la competencia ha sido suficiente para impulsar la formación de relaciones simbióticas: los efectos protectores de los antibióticos producidos por ciertos estreptomicetos se extienden a los insectos huéspedes que, a cambio, comparten la nutrición derivada de su cosecha de material vegetal. No todas las relaciones son mutuamente beneficiosas; algunas de las varias especies de *Streptomyces* que colonizan las raíces y otros órganos de plantas subterráneas causan enfermedades importantes de sarna, podredumbre y agallas.

1.3.3. *Colletotrichum* spp

Según Wharton y Diaguez (2004) el género *Colletotrichum* hoy en día constituye un gran reto para los taxónomos, ya que el concepto de especie no ha sido bien establecido o aceptado. De tal modo, en el caso de *C. gloesporioides* y *C. acutatum*, se dice que éste patógeno no debe considerarse como una sola especie, sino como un conjunto.

Según Agrios (2005) *Colletotrichum* spp., produce principalmente conidios sin ningún tipo de color, unicelulares, ovalados, cilindrados y a veces en curva o en forma de acérvulo. En el pimiento, la masa de conidios presenta coloración rosa o salmón. Éstos se sitúan por debajo de la piel y empiezan a brotar en la superficie de los tejidos de la planta, tienen forma circular como un disco y tienen textura cerosa, presentan conidios cortos, simples y erectos. En el pimiento y otros frutales, la enfermedad genera grandes pérdidas de fruto exportable, en algunas ocasiones daña el tallo y hojas. La enfermedad en los ajíes, durante las primeras etapas aparecen cerca de 20 manchas pequeñas aguadas, semiprofundas y con forma circular, las cuales se asemejan a las marcas dejadas por un objeto redondo. Al desarrollo de la enfermedad, las manchas comienzan a extenderse, alcanzando un diámetro de 2 o 3 cm, la parte central comienza a ennegrecerse y endurecerse levemente debido a los acérvulos negros que empiezan a desarrollarse inmediatamente en la parte subepidérmica del fruto. Entonces, grandes cantidades

de conidios empiezan a formarse en los acérvulos que se encuentran por debajo de la piel del fruto llegando incluso a las manchas más pequeñas.

Para Agrios (2005) el microorganismo que causa la antracnosis puede invernar en residuos de plantas ya enfermas, y de igual forma, en las semillas. Este patógeno, provoca infecciones poco letales de las hojas y brotes con tallos jóvenes las cuáles pueden pasar desapercibidas, sin embargo sobreviven y se reproducen hasta que el fruto alcanza su etapa de maduración y se vuelve muy susceptible a la infección. Factores como la alta humedad relativa, altas temperaturas o climas húmedos, favorecen la incubación y expansión del hongo, por ende el desarrollo destructivo.

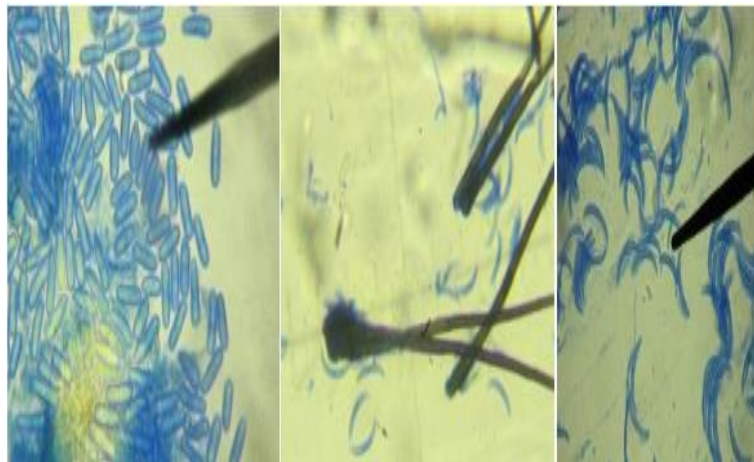


Figura 2. Conidias y setas de *Colletotrichum* spp.

Fuente: Agrios (2005).

Según Páez (2003) cuando el fruto está inmaduro el hongo solo permanece latente, pero cuando llega su tiempo de cosecha y presenta maduración, la enfermedad empieza a evidenciarse. El hongo puede afectar cualquier parte u órgano de la planta, sin embargo, el daño es más grande cuando afecta a flores y frutos. En las flores causa lesiones oscuras y caída prematura. El microorganismo puede ingresar fácilmente a través de heridas ocasionadas por picaduras de insectos. En la superficie de las manchas de los peciolo, pueden observarse los

acérvulos, característica del hongo causante de la enfermedad. El crecimiento del patógeno es favorecido por la alta humedad relativa (más de 82%), alta precipitación y temperaturas que oscilan entre los 22 y 32 grados centígrados.

Según Páez (2003) la enfermedad puede presentarse en las etapas de pre y postcosecha en hojas, tallos y frutos, incluso pequeñas manchas de ésta enfermedad sobre la superficie del fruto reducen su valor comercial. Cuando el fruto madura comienza a presentarse la “quiescencia”. Las distintas especies de *Colletotrichum* principalmente reconocidas por causar las infecciones latentes. Los acérvulos y apresorios son reconocidos por formar discos que se adhieren y fijan a la superficie de la planta hasta que el fruto empieza a cambiar fisiológicamente, principalmente ontogénicamente.

1.3.4. Metabolitos secundarios de los actinomicetos

Según Lazzarini *et al.* (2000) “...dentro de los metabolitos secundarios más importantes se encuentran los antibióticos, toxinas (micotoxinas), feromonas, inhibidores enzimáticos, agentes inmunomoduladores, antagonistas y agonistas de receptores, alcaloides (ácido lisérgico), pesticidas, agentes antitumorales, promotores del crecimiento en animales y plantas (giberelinas) y pigmentos. Esta gran variedad de compuestos producidos en la naturaleza se ve reflejada en cerca de los más de 23,000 metabolitos microbianos conocidos, de los cuales el 42% los producen hongos, 32% actinomicetos y el resto producidos por otros grupos de bacterias.”

Según Murashima *et al.* (2002) “...la celulosa es uno de los componentes más abundantes de la biomasa vegetal que es degradada por una serie de microorganismos mediante la acción de varias enzimas no asociadas en complejos, como en los hongos filamentosos y en algunos actinomicetos o formando un complejo denominado “celulosoma”, como en los clostridios y en bacterias del rumen.”

1.4. Formulación del problema

¿Es posible obtener un compuesto bioactivo a partir de *Streptomyces* spp para el control de antracnosis en mango?

1.5. Justificación e importancia de estudio

Con la presente investigación se quiere lograr contribuir a la disminución de las tasas de pérdidas pos cosecha de materia prima en las plantas agroindustriales del país y así mismo en los fundos de mango ubicados en distintas zonas.

Según Galán (2009) el mango es indudablemente la especie de mayor importancia en la familia de las Anacardiáceas, tanto por su distribución mundial, como por su importancia económica ya que se encuentra en el puesto 5 como fruto de consumo mundial y en el puesto 3 entre los tropicales.

Debido a la importancia del mango en la industria alimentaria en la presente investigación se desarrollaron pruebas mediante enfrentamiento dual *in vitro* e *in vivo* de *Streptomyces* spp. sobre el crecimiento de *Colletotrichum* spp. para el control de la enfermedad y mejora de la apariencia del fruto.

Según Páez (2003) las pérdidas en la región Caribe del país de Colombia se han cuantificado en cosecha en un poco menos del 50% para papaya y mango, respectivamente; no obstante, Páez mencionó que, debido a infecciones latentes, la enfermedad es una gran amenaza que afecta la competitividad de los campos agrícolas y agentes productivos. También mencionó que el manejo de la infección se ha fundamentado en frecuentes aplicaciones de fungicidas, especialmente en las etapas de floración y fructificación, los cuales tienen resultados no satisfactorios y contribuyen a la contaminación de los ecosistemas. Según lo indicado anteriormente, y teniendo en cuenta el resultado de trabajos de investigación, Páez pone a consideración de los productores, asistentes técnicos y otros usuarios intermediarios

alternativas tecnológicas complementarias entre sí que permitan hacer un manejo eficaz, económico y sostenible de la antracnosis para los frutos de papaya y mango.

Al evaluar el efecto *in vivo* de la bacteria sobre la enfermedad aseguramos su éxito en la elaboración de un anti fúngico industrial que se desarrolle en posteriores investigaciones para los fundos de mango afectados por la enfermedad de antracnosis en el país.

1.6. Hipótesis

Hi: Es posible obtener un compuesto bioactivo de *Streptomyces ssp.* que logre reducir significativamente el hongo causante de la antracnosis en el fruto de mango.

Ho: No es posible obtener un compuesto bioactivo de *Streptomyces ssp.* que logre reducir significativamente el hongo causante de la antracnosis en el fruto de mango.

1.7. Objetivos

1.7.1. Objetivo General

Obtener un compuesto bioactivo a partir de *Streptomyces ssp.* para el control de antracnosis en frutos de mango (*Mangífera indica*).

1.7.2. Objetivos Específicos:

- Obtener un extracto acuoso de un tipo de *Streptomyces ssp.*
- Evaluar la eficiencia del extracto *in vitro* de un tipo de *Streptomyces ssp.* frente a *Colletotrichum ssp.*
- Determinar la eficiencia del extracto *in vivo* de un tipo de *Streptomyces ssp.* en frutos de mango.

II. MATERIAL Y MÉTODO

2.1. Tipo y Diseño de Investigación

2.1.1. Aplicativa

Esta investigación es aplicada ya que se logró ver el efecto de extracto de *Streptomyces spp.* en el fruto de Mango e identificar su comportamiento in vitro e in vivo en el control de antracnosis.

2.1.2. Experimental

El diseño es experimental ya que se manejaron variables independientes para evaluar posteriormente su dependencia y significancia sobre la variable dependiente.

2.1.3. Laboratorio:

Su contexto fue de Laboratorio, lo que conllevó a la creación intencionada de las condiciones de investigación con mayor rigor y control de las variables independientes.

2.2. Población y Muestra

2.2.1. Población

Frutos de Mango (*Mangífera indica*) variedad *Haden*, procedente de la zona norte del país, entre Julio y Agosto del año 2018, en estado de madurez óptima.

2.2.2. Muestra

Se utilizarán 2Kg de frutos de Mango (*Mangífera indica*) variedad *Haden* que se obtendrá de Supermercados Peruanos S.A. (Plaza Vea) ubicado dentro del centro comercial Real Plaza – Chiclayo.

2.3. Variables, Operacionalización.

Tabla 2. Objetivo específico 01: Obtención del extracto de *Streptomyces spp.*

Variables Independiente	Dimensiones	Indicadores	Técnica e instrumento de recolección de datos
Cepas	Q32		
Bacterianas	Q84		
(Extracto de <i>Streptomyces spp.</i>)	Q85 Q45B Q60	Características morfológicas	Técnica visual
Variables Dependientes	Dimensiones	Indicadores	Técnica e instrumento de recolección de datos
Crecimiento de la bacteria	-	ufc/mL.h	Conteo visual. Microscopio.

Elaboración propia.

Tabla 3. Objetivo específico 02: Evaluación de la eficiencia in vitro del extracto de *Streptomyces spp.* contra *Colletotrichum spp.*

Variables Independiente	Dimensiones	Indicadores	Técnica e instrumento de recolección de datos
Cepa bacteriana	5	Q32, Q60, Q84, Q85 y Q45B.	Incubadora de muestras.
Variables Dependientes	Dimensiones	Indicadores	Técnica e instrumento de recolección de datos
Inhibición.	Halo	cm/inhibición	PIC

Elaboración propia.

Tabla 4. Objetivo específico 03: Evaluación de la eficiencia in vivo del extracto de *Streptomyces spp.* sobre el mango.

Variables Independiente	Dimensiones	Indicadores	Técnica e instrumento de recolección de datos
Concentración de esporas	4 log ufc/cm ²	Esporas/cm ²	Insidencia
Variables Dependientes	Dimensiones	Indicadores	Técnica e instrumento de recolección de datos
Manchas	Diámetro de la mancha	cm	Conteo
Avance de lesión	Tasa de crecimiento	%	Insidencia

Elaboración propia.

2.4. Técnicas e instrumentos de recolección de datos, validez y confiabilidad.

2.4.1. Balanza digital

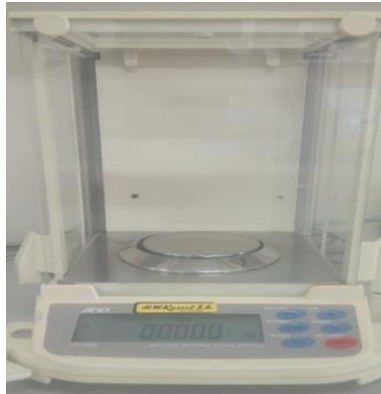


Figura 3: Balanza analítica para determinar pesos con precisión.

Fuente: Laboratorio USS.

2.4.2. Sonicador

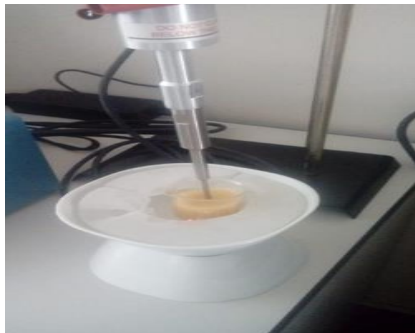


Figura 4. Equipo Sonicador que nos permite realizar la rotura de células de las cepas bacterianas.

Fuente: Laboratorio PACTUSS.

2.4.3. Placa de Petri de 90 mm - MP90-25I300

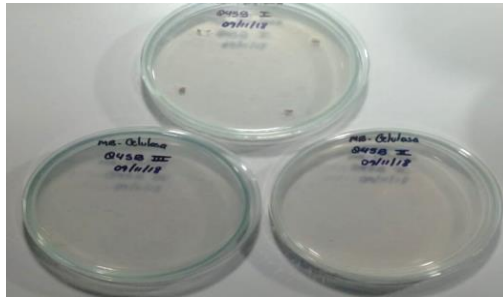


Figura 5. Muestra las placas con cepas utilizadas para ésta investigación.

Fuente: Laboratorio USS.

2.4.4. Matraz Erlenmeyer

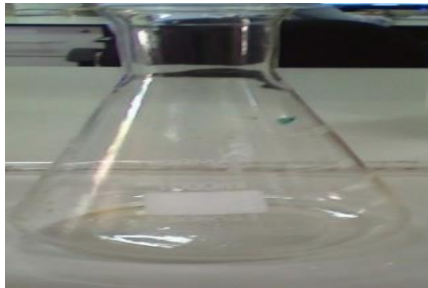


Figura 6. Muestra el instrumento de vidrio graduado que se utiliza para realizar titulaciones y filtraciones simples.

Fuente: Laboratorio USS.

2.4.5. Cámara de irradiación UV Bio II Advance



Figura 7. Cámara de bioseguridad con luz ultravioleta.

Fuente: Laboratorio PACTUSS.

2.4.6. Microscopio Primo Star HD HAL/LED, CV20, R. HD IP cámara 5MP



Figura 8. Microscopio óptico del laboratorio PACTUSS utilizado para identificación de hifas.

Fuente: Laboratorio USS.

2.4.7. Boeco centrífuga S-8



Figura 9. Centrífuga de 4 tubos del laboratorio PACTUS.

Fuente: Laboratorio USS.

2.4.8. Autoclave Modelo 75X (41 qt / 39 litros)



Figura 10: Autoclave para esterilización de materiales del laboratorio PACTUSS.

Fuente: Laboratorio USS.

2.4.9. Incubadora con agitación modelo SI-300



Figura 11. Incubadora con agitación del laboratorio PACTUSS.

Fuente: Laboratorio USS.

2.4.10. Incubadora BD 53 L – Binder



Figura 12. Incubadora microbiológica del laboratorio PACTUSS.

Fuente: Laboratorio USS.

2.5. Procedimientos de análisis de datos

2.5.1. Obtención de un extracto de un tipo de *Streptomyces ssp.*

2.5.1.1. Caracterización y reconocimiento del material biológico

Para esta investigación se utilizaron 5 cepas de *Streptomyces spp.* que fueron extraídas del cepario del laboratorio de Agrobiotecnología de la Universidad Señor de Sipán, se utilizaron códigos para diferenciar el tipo de cepa con la que se realizaría el desarrollo investigativo. Los códigos fueron puestos y rotulados por el laboratorio de la casa educativa.

Se utilizaron 5 cepas de la familia *Streptomycetaceae* para llevar a cabo la obtención del cultivo puro. Con un asa microbiológica las cepas fueron extraídas mediante un raspado en el cultivo de los tubos de ensayo y sembradas en 5 placas Petri de vidrio con 75 ml de Agar Avena (15 ml c/u) para su crecimiento.

Para el reconocimiento microscópico de *Streptomyces spp.*, cepa Q84, se utilizó coloración con azul de metileno. Se reconoció el tipo de bacteria por la formación de hifas de forma alargada y filamentosa con un diámetro aproximado de 0.5 – 2 micras. Las bacterias que pertenecen al género *Streptomyces* adoptan un característico color violeta cuando son sometidas al método de tinción de Gram. Esto se debe a la presencia de peptidoglicano en su pared celular, el cual retiene las partículas de colorante.

Se incubó fruto de mango de la variedad Tommy, infectado con antracnosis en cámara húmeda a 25°C, durante 3 días. Luego de éste tiempo, con una espátula de laboratorio, se extrajo 5 mm de cáscara infectada, se sembró en 3 placas con 15ml de Agar PDA y se esperó su crecimiento durante 3 días a 27°C en incubación.

Se raspó con el asa microbiológica las conidias del hongo y se colocó el raspado en una lámina portaobjeto. Se colocó una gota de azul de metileno para facilitar su observación.

2.5.1.2. Obtención del extracto extracelular de *Streptomyces* spp.

Para esta parte, se usó la metodología de Padilla citada por Ampuero, A (2016). Se preparó 500 ml de caldo de cultivo a base de Triptona de Soya para el crecimiento de *Streptomyces* spp. en 5 matraces de 100 ml c/u. Se sembraron las 5 cepas por la técnica de raspado y se almacenó en una incubadora con agitación a 165 RPM a 23°C por 9 días.

Pasado los 9 días de crecimiento con agitación, se colocaron los extractos en vasos beaker de 25 ml y fueron llevados al Sonicador para realizar el proceso de lisado celular. El equipo se programó para un tiempo de 15 minutos, a 70% de amplitud y a temperatura ambiente.

Luego se homogeneizó 7ml del contenido de los beaker con 7ml de Acetato de Etilo en tubos falcón. Fueron llevados a la incubadora con agitación durante 12 horas. Luego del lapso, se centrifugó el contenido durante 10 minutos a 60 x 100 RPM para obtener el sobrenadante.

Una vez realizado todo el barrido, el sobrenadante de las 5 cepas se vació en vasos beaker de 25 ml y fueron llevados a la incubadora con agitación durante 3 horas para evaporar el acetato de etilo a 40°C sin RPM. Luego se agregó 5 ml de metanol al 10% a los vasos beaker con el extracto evaporado para diluir el extracto seco. (Ampuero, A 2016).

2.5.2. Evaluación de la eficiencia del extracto *in vitro* de un tipo de *Streptomyces spp.* frente a *Colletotrichum spp.*

Para determinar la cepa con mayor inhibición, las 5 cepas bacterianas se mantuvieron en crecimiento durante 3 días. Al tercer día de crecimiento, se hizo un raspado de las colonias y se sembraron en la mitad de 15 placas con Agar PDA para su posterior enfrentamiento dual vs. *Colletotrichum spp.*

Se tomó una porción de esporas del cultivo puro con hongo *Colletotrichum spp.* con un asa bacteriológica y se sembró en el extremo superior de la mitad restante de las placas con las 5 cepas bacterianas. Se realizaron mediciones diarias del crecimiento radial del hongo para observar su crecimiento. Durante éste tiempo el cultivo se incubó a 27°C de temperatura.

Los experimentos con la cepa de mayor inhibición se realizaron en placas Petri utilizando como medio de cultivo PDA. Se formaron 3 pozos de 0,5 cm de diámetro con 40 µl de extracto y se ubicaron a una distancia de 3 cm entre pozos, enfrentando el patógeno colocado en el centro de los pozos (*Colletotrichum spp.*)

Los enfrentamientos se incubaron a 27°C, en periodos de oscuridad, y se hicieron mediciones del crecimiento radial durante seis días aproximadamente. Para hallar el porcentaje de inhibición se utilizó la ecuación PIC.

$$PIC = \frac{\text{Crecimiento del testigo} - \text{Crecimiento del tratamiento}}{\text{Crecimiento del testigo}} \times 100$$

2.5.3. Pruebas enzimáticas

Siguiendo la metodología desarrollada por Ampuero (2016), las 5 cepas fueron nuevamente sembradas en agar PDA. Se preparó medio de cultivo Proteasa, Lipasa, Celulasa y Quitinasa y se sembraron 60 placas (12 c/u). Las placas con cultivo se incubaron a 27°C durante 120h para determinar la degradación enzimática de cada cepa utilizada.

Los datos recogidos en ésta investigación se evaluarán estadísticamente utilizando el software SPSS para Windows (versión 7.5.1, 20 de diciembre de 1996; SPSS Inc., Chicago, IL) y serán sub proyectados a análisis de varianza.

Los tratamientos de los valores medios se compararán mediante un ensayo múltiple de Tukey modificada ($P > 0,05$). Para los tratamientos in vivo, el análisis estadístico se realizará mediante el programa SPSS Statistics.

2.6. Criterios éticos

Durante la investigación utilizará información importante de diferentes fuentes ya sean libros, revistas, páginas web, trabajos virtuales, tesis, entre otras fuentes, respetando los derechos de autor, y se mostrará en las citas bibliográficas de varios párrafos de nuestra investigación. Además, se respetó la información protegida por los autores de libros, artículos y tesis.

2.7. Criterios de Rigor científico

Todos los procedimientos utilizados en ésta investigación, fueron desarrollados exclusivamente por el autor, teniendo en cuenta los protocolos de los antecedentes y recibiendo la orientación de docentes y microbiólogos. Así mismo se respetó la autoría de todas las investigaciones utilizadas.

Los resultados de la investigación no están sesgados por motivaciones, intereses, y perspectivas del investigador. Se respetaron resultados y criterios de validez, así como su valor, fiabilidad y objetividad.

Todos los resultados obtenidos para los tres objetivos de ésta investigación fueron desarrollados en el laboratorio de Agrobiotecnología por el autor.

III. RESULTADOS

3.1. Resultados de la obtención de un extracto de un tipo de *Streptomyces spp.*

3.1.1. Codificación de especies de *Streptomyces spp.*

En la Tabla 5 observan los códigos interpuestos para cada cepa seleccionada de *Streptomyces spp.* Utilizamos éstos códigos para diferenciar los tipos de *Streptomyces spp.*, y seleccionar la que mayor inhibición presente en los siguientes objetivos de ésta investigación.

Tabla 5: Codificación de cepas bacterianas de *Streptomyces spp.* en laboratorio USS.

Especie	Código
<i>Streptomyces spp.</i>	Q85
<i>Streptomyces spp.</i>	Q84
<i>Streptomyces spp.</i>	Q60
<i>Streptomyces spp.</i>	Q45B
<i>Streptomyces spp.</i>	Q32

Fuente: Cepas extraídas del laboratorio de Agrobiotecnología de la USS. Codificación y elaboración propia.

3.1.2. Reconocimiento microscópico y caracterización macroscópica de *Streptomyces spp.*

En la figura 13 se muestra la fotografía del reconocimiento microscópico de *Streptomyces spp.*, cepa Q84, utilizando coloración con azul de metileno. Se reconoció el tipo de bacteria por la formación de hifas de forma alargada y filamentosa, que comúnmente poseen un diámetro aproximado de 0.5 – 2 micras.

Las bacterias adoptaron un característico color violeta al ser sometidas al método de tinción de Gram.

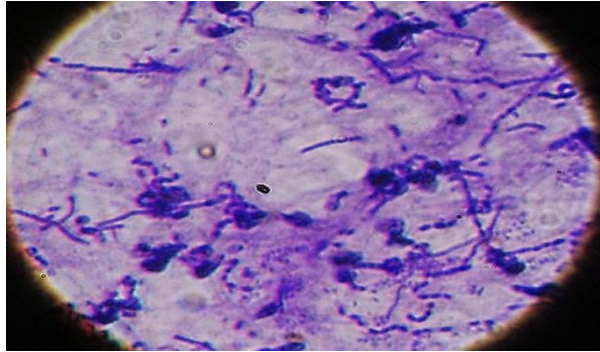


Figura 13. Reconocimiento microscópico de *Streptomyces* spp. código Q84 por microfotografía. Tinción Gram positiva violeta debido a la presencia de peptidoglicano en su pared celular. Hifas de 0.5 – 2 micras.

Fuente: Elaboración propia.

En la caracterización macroscópica de *Streptomyces* spp. en placas Petri, las colonias de *Streptomyces* presentaron aspecto polvoroso y coloración distinta en cada cepa. El desarrollo de colonias fue exactamente el mismo. El tiempo de crecimiento de las cepas de *Streptomyces* spp. fue de 72h.

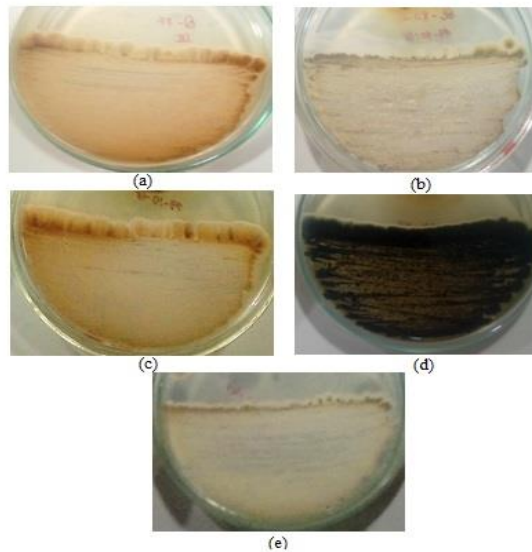


Figura 14. Fotografía de caracterización macroscópica de *Streptomyces* spp según codificación. (a) código Q84, (b) código Q85, (c) código Q45B, (d) código Q32 y código Q60. (b y e) Excreta de pigmentación blanco grisáceo, (a) naranja, (d) negra y (c) marrón.

Fuente: Elaboración propia.

3.1.3. Obtención del cultivo puro de hongo *Colletotrichum* spp.

En la figura 15 se puede observar que la enfermedad de la antracnosis se desarrolló significativamente en los frutos puestos en cámara húmeda. Ello nos permitió la extracción y cultivo de 1cm de cáscara de mango en Agar PDA.



Figura 15. Exudación de heridas y propagación de la enfermedad cubriendo visualmente el 90% del área del fruto. Coloración marrón y negruzca en la piel.

Las conidias del hongo en placa se extendieron radialmente a lo ancho de la placa Petri. Mostraron hifas en dirección circular de *Colletotrichum spp.* con coloración gris claro y micelio algodonoso. También se mostraron formación de apresorios.

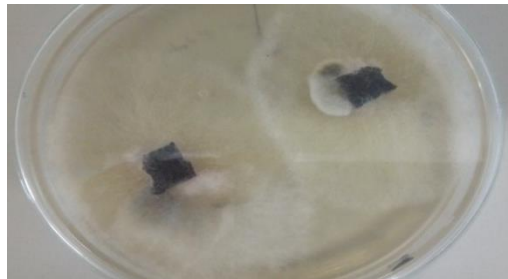


Figura 16. Cultivo en Agar PDA. Formación de hifas en dirección circular de *Colletotrichum spp.* Coloración gris claro, micelio algodonoso. Formación de apresorios.

En la figura 17 se logra observar la formación de conidias características de *Colletotrichum spp.*

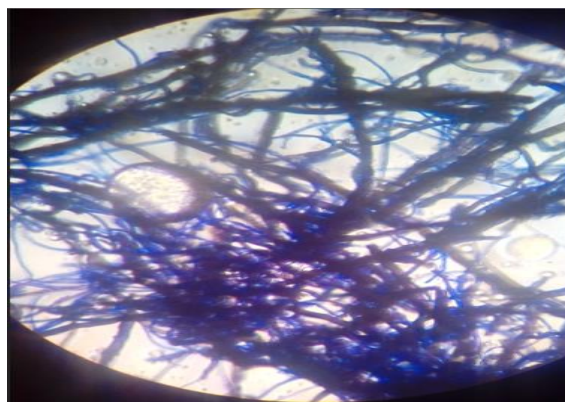


Figura 17. Fotografía microscópica de tinción Gram de *Colletotrichum spp.* Coloración con azul de metileno. Hifas septadas. Elaboración propia.

Fuente: Elaboración propia.

3.1.4. Enfrentamiento dual *Streptomyces spp.* vs. *Colletotrichum spp.*

En la Tabla 6 se observan los resultados de las mediciones diarias del crecimiento radial del hongo. Al utilizar la fórmula PIC obtuvimos que, la cepa Q32 presentaba significativamente menor porcentaje promedio de inhibición (69.89%) respecto a las demás (>69.89%). Lo que nos lleva a exceptuarla del resto de evaluación.

Tabla 6. Datos del % Inhibitorio de *Streptomyces spp.* vs. *Colletotrichum spp.*

	Q32	Q60	Q84	Q45B	Q85
I	69.84%	92.06%	96.83%	96.83%	80.95%
II	68.85%	86.89%	96.72%	88.52%	77.05%
III	70.97%	91.94%	98.39%	98.39%	79.03%
PROMEDIO:	69.89%	90.29%	97.31%	94.58%	79.01%

Fuente: Elaboración propia utilizando la fórmula PIC.

Los resultados del % Inhibitorio se muestran en la Tabla 7. Se muestra el error y valor de significancia > 0,05, en lo cual se demuestra que sí hubo diferencia significativa en los 5 tratamientos con 3 repeticiones.

Tabla 7. Análisis de varianza para hallar el % Inhibitorio de *Streptomyces spp.*

		Suma de cuadrado s	gl	Media cuadrática a	F	Sig.
Entre grupos	(Combinado)	1583,377	4	395,844	45,653	,000
	Término lineal	153,183	1	153,183	17,667	,002
	Desviación	476,731	3	476,731	54,981	,000
Dentro de grupos		8,671	10	8,671		
Total			14			

Fuente: Datos realizados en ANOVA. Elaboración propia.

En la Tabla 8 se muestra mediante la prueba de Tukey, que las cepas Q32 y Q85 fueron las de menor % inhibitorio, por lo que se descartaron para la ejecución del tercer objetivo. Además, la cepa Q84 que tuvo mayor porcentaje de inhibición fue seleccionada para la extracción del compuesto.

Tabla 8. Prueba de Tukey para determinar el porcentaje inhibitorio

Cepas bacterianas	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Q32	3	69,8867	79,0100	
Q85	3			
Q60	3			
Q45	3			90,2300
Q84	3			94,5800
Sig.		1,000	1,000	,085

Fuente: Valores expresados en %. Elaboración propia en el programa estadístico SPSS.

3.2. Evaluación de la eficiencia del extracto in vitro de un tipo de *Streptomyces spp.* frente a *Colletotrichum spp.*

Se obtuvo 1ml de extracto al final de la evaporación del acetato de etilo. En la figura 18 se puede observar los halos de profundidad o pozos realizados para la colocación del extracto de las cepas de *Streptomyces spp.*

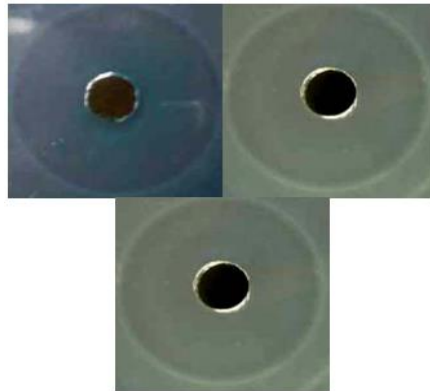


Figura 18. Halos de profundidad en Agar PDA.

Fuente: Elaboración propia.

En el conteo de conidias de *Colletotrichum spp.* mediante la cámara de Neubauer. Durante el enfrentamiento, el crecimiento del hongo fue reducido ante la presencia de *Streptomyces spp.* Como se aprecia en la Tabla 9, se muestran los porcentajes inhibitorios del extracto de nuestras 5 cepas bacterianas vs el hongo patógeno, con 3 repeticiones (PIC I, PIC II y PICIII), determinados por la ecuación PIC.

Tabla 9. Porcentaje de inhibición del extracto de *Streptomyces* spp.

	Q60	Q32	Q84	Q85	Q45B
PIC I	4.26%	7.06%	42.70%	40.60%	28.72%
PIC II	3.56%	7.06%	43.40%	42.70%	38.50%
PIC III	6.36%	7.06%	48.29%	40.60%	37.80%

Nota: Datos analizados en programa Microsoft Excel 2016, utilizando la fórmula del porcentaje inhibitorio de crecimiento. Elaboración propia.

Los datos también fueron analizados con la prueba de Tukey (Tabla 10), dando en ambos como resultado que al igual que en el enfrentamiento in vitro del extracto, la cepa Q84 tuvo mayor porcentaje promedio de inhibición (44.8%) que las otras 4 cepas. Por lo tanto, se continuó seleccionando el extracto de la cepa Q84 para la aplicación in vivo.

Tabla 10. Extracto con mayor % inhibición según la prueba de Tukey

Cepas bacterianas	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Q60	3	4,7233		
Q32	3	7,0500		
Q45B	3		35,0067	
Q85	3		41,3267	41,3267
Q84	3			44,7867
Sig.		,860	,133	,611

Fuente: Porcentaje de inhibición en prueba de Tukey, SPSS. Elaboración propia.

3.2.1. Pruebas enzimáticas

En la Tabla 11 se muestran los resultados de siembra de las cepas Q84, Q60, Q85 y Q45B de *Streptomyces* spp. en medio de cultivo Proteasa, Lipasa, Celulasa y Quitinasa, en las cuales las cepas bacterianas Q60, Q85 y Q45B mostraron reacciones enzimáticas a los medios Proteasa y Lipasa, mientras que la

cepa Q84 mostró reacción para 3 de los medios (Lipasa, Celulasa y Proteasa). Esto quiere decir que los metabolitos enzimáticos de la cepa Q84 además de degradar lípidos y celulasas también degradan las proteínas en el hongo *Colletotrichum spp.*

Tabla 11. Reacciones enzimáticas de 4 de las 5 cepas bacterianas en medios nutritivos.

	Q60	Q84	Q85	Q45B
Lipasa	x	x	x	x
Proteasa	X	x	x	x
Celulasa		x		
Quitinasa				

Fuente: Elaboración propia.

3.3. Resultados de la eficiencia *in vivo* de *Streptomyces spp.* Q84 en frutos de mango.

En la Tabla 12 se detallan los 3 tratamientos realizados para la demostración de la eficiencia *in vivo* de *Streptomyces spp.* frente a *Colletotrichum spp.*

Tabla 12. Descripción de los tratamientos In Vivo.

Tratamiento	Descripción del tratamiento
T1	Aspersión con el hongo (<i>Colletotrichum spp.</i>) y la cepa Q84 (<i>Streptomyces sp.</i>).
T2 (Testigo 1, 2 y 3)	Aspersión solamente con el hongo (<i>Colletotrichum spp.</i>).
T3 (Testigo sin nada)	No se aplicó ninguna de las suspensiones.

Fuente: Tratamientos realizados. T1 = Tratamiento con *Streptomyces spp.* y *Colletotrichum spp.* T2= Tratamiento con *Colletotrichum*. T3= Testigo.

En la Figura 19 se pueden observar los tratamientos utilizados en ésta investigación, los frutos del segundo tratamiento inoculados con una concentración de conidios/mL 1×10^6 presentaron los primeros síntomas, 48h después de la inoculación, mostrando manchas pequeñas redondeadas de color marrón castaño.



Figura 19. Frutos de mango utilizados para los tratamientos de la evaluación in vivo.

En la figura 20, se muestra que las manchas del Tratamiento 2 evolucionaron rápidamente tornándose de color marrón oscuro a negro hundido, cuyo tamaño osciló entre 1,8 y 3,6 cm durante los 6 días de evaluación. En los frutos del tratamiento 1, las lesiones se observaron a las 72 horas, siendo menos notorias y de evolución más lenta. Los testigos del tratamiento 2 tuvieron manchas más grandes, cuyo tamaño osciló entre 3,5 y 4,7 durante la prueba.



Figura 20. Primer fruto (T3 - Testigo), segundo fruto (T1) y tercer fruto (T2).

Como se puede observar en la Tabla 13, el T1 con la cepa Q84 mostró el menor porcentaje de avance de la mancha respecto a los tratamientos 2 y 3.

Tabla 13. Porcentajes obtenidos de la fórmula del % Avance

	T1	T2	T3
Repetición I	24.691%	41.975%	0.000%
Repetición II	24.000%	43.902%	0.000%
Repetición III	29.268%	30.435%	0.000%

Fuente: Promedio desviación estándar 2016 utilizando la fórmula del % de Avance. Elaboración propia.

3.4. Discusión de resultados

Al igual que en el trabajo realizado por Sanmartín et al. (2012), en el que se incubaron plantas con *Fusarium sp.* en cámara húmeda a 25 °C por 48 horas; las cepas de *Colletotrichum spp.* fueron incubados mediante cámara húmeda, y cultivados a 25°C, durante 72 horas, con ausencia de luz, a partir de un fruto de mango infestado con *Colletotrichum spp.*

Según Ampuero (2016) la obtención de metabolitos extracelulares del antagonista se realizó a partir de la fermentación sumergida de cada una de las cepas de *T. Asperellum*, y se denominaron igual que su cepa de procedencia (T19, T21, T22 y T38). Se tomaron cuatro discos de 0,5 cm de diámetro del cultivo puro de una de las cepas y se adicionaron a un erlenmeyer con 1 L de PDB (caldo papa-dextrosa, Merck). Se incubó en agitador orbital a 30 °C y 150 rpm por cinco días. Este procedimiento se hizo para cada cepa del antagonista. Después de finalizado el tiempo de incubación, cada cultivo se filtró, primero, con un tamiz y luego por filtración tangencial (tamaño de poro: 0,45 µm). El sobrenadante obtenido se congeló a -20 °C y se sometió a liofilización. Una vez eliminada el agua, se realizaron tres extracciones con porciones de 100 ml de metanol y se filtró con papel filtro

(Whatman). El solvente se eliminó por evaporación bajo presión reducida, obteniéndose de esta forma entre 900 y 1.000 mg de extracto crudo.

En el trabajo realizado por Ampuero (2016) las placas con la cepa crecida fueron retiradas de incubación y se dejaron temperar por unos minutos. Para el proceso de remoción de células y extracción de metabolitos secundarios se utilizó también el solvente acetato de etilo, la placa fue levemente inclinada y con ayuda de una micropipeta se bañó el cultivo con 3 mL del solvente. Trabajaron 30 placas y por cada 10 placas, su sobrenadante y células fueron llevados a tubos cónicos de 50mL. Una vez realizado todo el barrido, se homogeneizó el contenido de los tubos y fueron llevados al sonicador para realizar el proceso de lisado celular. El equipo se programó para un tiempo de 15 minutos y a temperatura ambiente.

Al igual que en el presente trabajo, los tubos con las células lisadas fueron posteriormente llevados a centrifugación por 10 minutos a 5000 RPM, se utilizó un rotavapor para evaporar el acetato. Para hallar el peso seco del extracto realizaron la siguiente fórmula:

$$Peso_{EX\ seco} = Peso_{EP+EX} - Peso_{EP}$$

En donde: Peso EX seco = peso del extracto seco, Peso EP+EX= Peso del tubo eppendorf junto con extracto seco y Peso EP= Peso de tubo eppendorf vacío. A este extracto le realizaron una cromatografía de capa fina usando una lámina cromatográfica de fase reversa (TLC Silicagel 60 RP-18) con una fase móvil de acetonitrilo: agua en proporción de 2:1 para observar, directamente y sin revelador, el número de compuestos bajo una lámpara UV a 254 y 366nm, para esta parte. Además se realizaron un antibiograma por medio del método de disco-difusión para determinar si aún permanecía el efecto antibacteriano.

Con el método mencionado el trabajo realizado por Ampuero (2016) se obtuvieron los siguientes resultados:

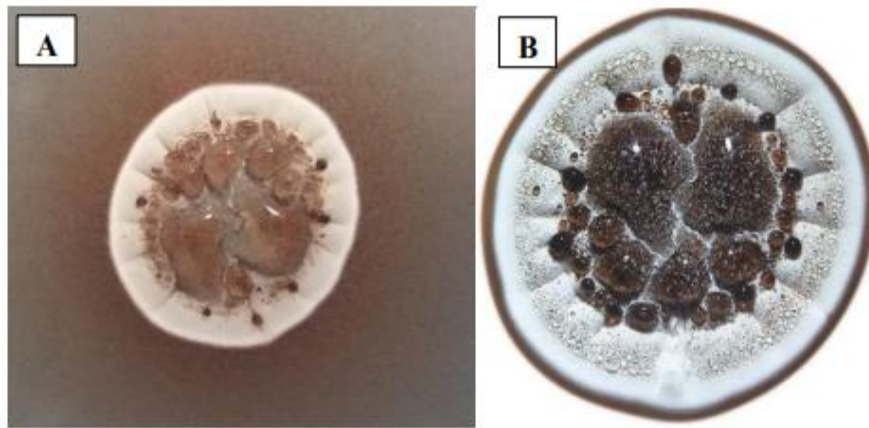


Figura 4. Observación macroscópica de la cepa *Streptomyces sp.* 6E3. En Figura A, observación del pigmento. En figura B, producción de exudado.

Se demostró que el extracto de la cepa Q84 tenía efecto inhibitorio frente al hongo *Colletotrichum spp.* Esto coincide con el trabajo realizado por Shahbazi *et al* (2014) donde el aislamiento de 66 estreptomicetos del suelo de la rizosfera de las plantas de Chile se realizó por sus actividades inhibitorias contra tres especies dominantes diferentes de *Colletotrichum*: *C. acutatum*, *C. gloeosporioides* y *C. capsici*. Veintiun cepas de estreptomicetos que estaban activas contra al menos una de las especies de *Colletotrichum*. Además, en el trabajo realizado, diez cepas que inhibieron el crecimiento in vitro de especies de *Colletotrichum* mostraron actividad quitinasa. La cepa P42 codificada en el laboratorio, que mostró la actividad inhibitoria más alta contra las tres especies de hongos de antracnosis y la actividad de quitinasa alta. Además, en éste estudio se probó la cepa como agente de control biológico en un estudio de invernadero. La cepa logró controlar la enfermedad de antracnosis del chili al reducir significativamente la gravedad de la enfermedad. El análisis filogenético de las secuencias del gen 16S RNA mostró que la cepa P42 codificada en el laboratorio pertenece al clado *Streptomyces rochei*. Los resultados del estudio mostraron que el suelo de las plantas de Chile derivado de la rizosfera es una fuente importante de estreptomicetos bioactivos que son antagonistas contra el *Colletotrichum*.

En los frutos tratados los síntomas se iniciaron en la superficie el día dos después de la inoculación. Las manchas entre los días cinco y seis se manifestaron de forma redondeada y color castaño oscuro. En el caso de los frutos de los tratamientos testigo, las manchas los cubrieron casi totalmente.

Para la evaluación *in vivo*, los frutos se incubaron en bandejas de huevo separados por tratamiento y repetición; fueron llevados a condiciones de laboratorio, a una temperatura de 27 – 28°C, con una HR de 80 – 90% durante 7 días. En el trabajo realizado por Chávez (2018) utilizó un diseño totalmente aleatorio utilizando 12 tratamientos más un testigo, realizando cinco repeticiones, obteniendo 65 unidades experimentales, donde cada una de las unidades experimentales consistió en 3 plantas pequeñas de frutilla. Para conformar los tratamientos, seleccionaron 12 productos los cuales presentaron un control óptimo del patógeno en la prueba *in vitro*. Las plantas fueron mantenidas en macetas de polietileno de 400 mL, en un invernadero con una temperatura promedio diaria 28,9°C y el riego fue realizada una vez al día.

IV. CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

4.1. Conclusiones:

Del aislamiento in vitro en medio PDA, se desarrolló una colonia del patógeno que presentó las mismas características de crecimiento y morfología del organismo aislado originalmente de los frutos enfermos; por lo antes descrito, se considera que la prueba de patogenicidad resultó positiva, corroborando que el hongo *Colletotrichum spp.* es el causante de la antracnosis en frutos de mango de la variedad 'Haden', y se confirmó la virulencia del patógeno.

En el enfrentamiento dual más de 2 cepas mostraron capacidad inhibitoria, lo que indica que es posible obtener resultados exitosos si se llevan a cabo los siguientes objetivos desarrollados en ésta investigación con otras cepas de *Streptomyces spp.* Durante el enfrentamiento del cultivo puro y el enfrentamiento dual con el extracto *Streptomyces* tuvo diferente comportamiento, ya que en el primer enfrentamiento de la cepa vs el hongo patógeno su % inhibitorio se acercaba al 100% o sobre pasaba el 50%; mientras que en el enfrentamiento dual con el extracto el porcentaje inhibitorio tuvo como máximo un porcentaje del 44%. Esto podría deberse al tipo de solvente o disolvente.

Se encontró que todas las cepas de *Streptomyces spp.* evaluadas presentaron un grado de antagonismo sobre *Colletotrichum spp.*, sin embargo, se muestra que el antagonismo total sobre *Colletotrichum spp.* lo tiene la cepa bacteriana Q84 con 96% de inhibición en el enfrentamiento dual y 44,78% en el enfrentamiento del hongo patógeno con el extracto, que está correlacionada con la actividad antagónica debido a compuestos volátiles, a metabolitos secundarios solubles y al crecimiento asociado a actividad lipasa, proteasa y celulasa de la cepa Q84. La cepa Q32 fue descartada para las pruebas enzimáticas debido a su bajo efecto inhibitorio durante el enfrentamiento dual.

Los estreptomicetos poseen un rango de actividad inhibitoria contra *Colletotrichum spp.* bajo el ensayo in vitro. Además, algunas de estas cepas mostraron producción de lipasa, celulasa y proteasa. La cepa Q84 de *Streptomyces* seleccionada, demostró la capacidad potencial de proteger las plantas de mango de la antracnosis en condiciones de invernadero y podría utilizarse como agentes de control biológico prometedores de la enfermedad de antracnosis en plantas de mango.

4.2. Recomendaciones:

Será necesario realizar más trabajos biotecnológicos y más ensayos de campo para que sea más eficaz y estable para ser utilizado en el control de la enfermedad de *Colletotrichum spp.* y antracnosis.

Para la inducción de la enfermedad en el mango es importante que estos se encuentren con la superficie limpia, ello para evitar el crecimiento de microorganismos ajenos al objetivo en la placa, se puede obtener la cepa *Colletotrichum spp.* de otras fuentes también.

Se recomienda siempre el uso de la Cabina con UV durante las siembras, para evitar la contaminación externa en el cultivo.

Se recomienda realizar la limpieza constante de la incubadora microbiológica y demás equipos, evitar dejar puertas abiertas que permita el ingreso de vectores voladores. Al trabajar con cultivos la limpieza y esterilización de materiales y ambiente de trabajo es sumamente importante.

VI. REFERENCIAS

- Agrios, G. (2005). Patologías de plantas. New York: Elsevier.
- Ampuero, A. (2016). *EVALUACION DE ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA DE STREPTOMYCES SP. 6E3 AISLADO DE MINERALES FRENTE A STAPHYLOCOCCUS AUREUS METICILINO RESISTENTE*. Lima, Perú.: UNIVERSIDAD PERUANA CAYETANO HEREDIA.
- Arias, M. H. (Agosto de 2007). *Agro: La Libertad*. Obtenido de http://www.agrolalibertad.gob.pe/sites/default/files/Manual_Producc_Mango.pdf
- Brecht, J. (2009). *Universidad Autónoma de Querétaro*. Obtenido de file:///C:/Users/mquis/Downloads/2009.Brecht_Yahia.Postharvestphysiology.In.TheMango.pdf
- Carreón., L. S. (2010). Biofungicidas para el control de la antracnosis del mango: Logrando frutos de alta calidad internacional para mercados exigentes. *Claridades Agropecuarias*, 28-37.
- Carrión, L. S. (2010). Biofungicidas para el control de la antracnosis en mango: Logrando frutos de alta calidad internacional para mercados exigentes. *Claridades Agropecuarias*, 10.
- COMEXPERÚ. (23 de Febrero de 2018). Obtenido de <https://www.comexperu.org.pe/articulo/mangos-peruanos-para-el-mundo>
- Fernanda Pérez Rojas, J. L. (2015). Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa. *SCIELO*, 116-139.
- Fernanda Pérez, J. L. (2015). Actinomicetos aislados del compost y su actividad antagonista a fitopatógenos de la papa (*Solanum tuberosum* spp.). *Redalyc*, 25.
- Frutas y Hortalizas. (2005). MANGO, MAGNIFERA INDICA. *Frutas y Hortalizas*, 10.
- Galán, V. (2009). *Physiological Disorders*. Madrid: Mundi-Prensa.

- Gamboa, M. A. (2011). La “antracnosis” (*Colletotrichum* spp.) en viveros forestales. *Revista Forestal Mesoamericana*, 4.
- Gang Liu, K. F. (2013). Molecular Regulation of Antibiotic Biosynthesis in *Streptomyces*. *Microbiology and Molecular Biology Reviews.*, 33.
- Gang, L. e. (Marzo de 2013). *PubMed*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23471619>
- Giraldo., R. V. (2010). Obtención y caracterización de un pasabocas a partir de una pasta a base de mango mediante fritura por inmersión. *CIENCIAS - QUÍMICA*, 16.
- Huete, M. (Agosto de 2007). *USAID*. Obtenido de http://www.agrolibertad.gob.pe/sites/default/files/Manual_Producc_Mango.pdf
- Hyi Jin Kim, e. a. (2014). Biological Control of Anthracnose (*Colletotrichum gloeosporioides*) in Pepper and Cherry Tomato by *Streptomyces* sp. A1022. *Journal of Agricultural Science*, 9.
- JOHNSON, G. I. (1991). Mango stem end rot pathogens - Infection levels between flowering. *Queensland Department of Primary Industries*, 9.
- Murashima, K. (2002). Synergistic Effects on Crystalline Cellulose Degradation between Cellulosomal Cellulases from *Clostridium cellulovorans*. *Journal of bacteriology*.
- P, G. (2012). Cell division and DNA segregation in *Streptomyces*: how to build a septum in the middle of nowhere? *MicroReview*, 12.
- Paola Sanmartín Negredo, e. a. (2012). Análisis del modo de acción y de la capacidad antagónica de *Trichoderma asperellum* sobre *Colletotrichum gloeosporioides*. *Revista Tumbaga*, 21.

- Perdomo, R. (2007). Caracterización y evaluación de virulencia en aislamientos de *Rhizoctonia solani* KUHN, causante de la mancha bandeada de maíz. *Interciencia*, 48-55.
- Perera, S. y. (Agosto de 2007). *Agrocabildo*. Obtenido de http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/subt_134_D_Mango07.pdf
- Perú, S. d. (23 de Febrero de 2018). *ComexPerú*. Obtenido de <https://www.comexperu.org.pe/articulo/mangos-peruanos-para-el-mundo>
- Ploetz, R. C. (2008). Antracnosis en mango: Manejo de la enfermedad más importante pre y postcosecha. *Universidad de Florida*, 11.
- Ploetz, R. y. (2009). *Libros de Google*. Obtenido de https://books.google.com.pe/books?hl=es&lr=&id=oloEhPYqE8QC&oi=fnd&pg=PA231&dq=Foliar,+floral+and+soilborne+diseases.&ots=npY2rnSP_X&sig=ghArmkxr4x7IjzzBBIUaq2cGgM#v=onepage&q=Foliar%2C%20floral%20and%20soilborne%20diseases.&f=false
- Poveda, G. e. (Julio de 2017). *Efecto antimicrobiano del compuesto bioactivo fucoïdan frente a Listeria monocytogenes*. Valencia. Obtenido de <https://riunet.upv.es/handle/10251/87247>
- Quintero, V. (2013). CARACTERIZACIÓN FÍSICOQUÍMICA DEL MANGO COMUN (*Mangifera indica* L.) DURING RIPENING PROCESS. *Bioteología en el Sector Agropecuario y Agroindustrial*, 9.
- Quintero, V. e. (10 de Junio de 2013). *SciELO*. Obtenido de <http://www.scielo.org.co/pdf/bsaa/v11n1/v11n1a02.pdf>
- Rafael Villamizar, G. G. (2010). Obtención y caracterización de un pasabocas a partir de una pasta a base de mango mediante fritura por inmersión. *Tumbaga*, 149-164.
- Raúl Allende, J. A. (2005). Control biológico de antracnosis (*Colletotrichum gloeosporioides*) y su efecto en la Calidad poscosecha del mango. *Redalyc*, 10.

- Redondo, A. P. (2003). *Corpoica*. Obtenido de http://agropecuaria-primotc.hosted.exlibrisgroup.com/primo_library/libweb/action/display.do;jsessionid=ED943EAD9A0479B870F42269C8F09B53?tabs=viewOnlineTab&ct=display&fn=search&doc=dedupmrg4364248180&indx=1&reclds=dedupmrg4364248180&recldxs=0&elementId=0&r
- Redondo, A. R. (2003). *Agronet*. Obtenido de <http://bibliotecadigital.agronet.gov.co/bitstream/11348/6459/1/Manejo%20de%20la%20antracnosis%20en%20mango.pdf>
- Rivera, J. C. (Noviembre de 2017). *Redagrícola*. Obtenido de <http://www.redagricola.com/pe/los-reyes-del-mango/>
- Rodríguez, D. (2009). Potencial efecto fungicida de extractos vegetales en el desarrollo in vitro del hongo *Colletotrichum*. *Bioline*, 7.
- Rodríguez, L. y. (Octubre de 2010). *Agrocabildo*. Obtenido de http://www.agrocabildo.org/publica/Publicaciones/subt_357_manejo%20plant_mango.pdf
- Santamaría, F. a. (31 de Octubre de 2011). *SciELO*. Obtenido de <http://www.scielo.org.mx/pdf/remexca/v2n5/v2n5a1.pdf>
- Santander, A. J. (2012). *USO DE Trichoderma harzianun Rifai Y Bacillus subtilis (Ehrenberg) Cohn PARA EL CONTROL DE (Colletotrichum gloeosporioides Pens.) CAUSANTE DE LA ANTRACNOSIS EN MANGO (Mangifera indica L.)*. Maracay.
- Van Wezel, G. y. (13 de Junio de 2011). *PubMed*. Obtenido de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21611665>
- Wharton, P. S. (2004). The biology of *Colletotrichum acutatum*. *Anales del Jardín Botánico de Madrid*, 20.
- Wildermuth H., H. D. (1970). Mutants of *Sireptomycetes coelicolor* Defective in Sporulation . *Journal of general Microbiology*, 17.

ANEXOS

Anexo 1 – Procedimiento de la Tinción Gram

El procedimiento fue el siguiente:

1. Fijación de la muestra

1.1. Para el hongo

- Con un asa de siembra, se tomó un poco de la colonia que estaba crecida en el medio Agar Avena (evitar tomar parte de agar).
- La muestra fue colocada sobre una lámina portaobjetos. Se homogeneizó con ayuda del asa y se procedió a secar con ayuda del mechero.

1.2. Para las cepas bacterianas

- Se colocó una laminilla cubreobjetos en el medio de cultivo para facilitar la extracción de la cepa antes de su crecimiento.
- Se extrajo la laminilla de la placa con el medio y se colocó en una lámina portaobjetos.

2. Tinción

- La lámina fijada fue puesta sobre un puente de tinción y se procedió a cubrir la muestra fijada con tinte azul de metileno en el orden que sigue:
 - a) Se dejar reposar por 1 minuto, eliminar y enjuagarla lámina con agua.
 - b) Secar la lámina con ayuda del mechero y dejar enfriar.
 - c) Observar a microscopio a un aumento de 1000x con aceite de inmersión.

Anexo 2 – Preparación de medios de cultivo

El contenido de los medios, por litro de agua fue de:

- Caldo Triptina de Soya:
 - Tripteína: 17 gr.
 - Peptona de Soya: 3.0 gr
 - Cloruro de sodio: 5.0 gr
 - Fosfato dipotásico: 2.5 gr
 - Glucosa: 2.5 gr.

- Medio Quitinasa:
 - $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$: 0.3 gr.
 - $(\text{NH}_4)_2 \text{SO}_4$: 3.0 gr.
 - Ácido cítrico: 1.0 gr.
 - Agar: 15 gr.
 - Tween 80: 200 ml.
 - Quitina coloidal: 4.5 gr.
 - Púrpura de Bromocresol: 0.15 gr.

- Medio Proteasa:
 - Peptona: 10 gr.
 - Cloruro de sodio: 5 gr.
 - Extracto de carne: 5 gr.
 - Gelatina: 2.4 gr.
 - Agar: 15 gr.

- Medio Lipasa:
 - Tween 20: 10 ml.
 - Peptona: 10 gr.
 - NaCl: 5gr.
 - $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$: 0.1 gr.

- Medio Celulasa:
 - CMC: 10gr.
 - Agar: 15 gr.

- Medio Agar PDA (Potato Dextrose Agar):
 - Papa: 200 gr.
 - Dextrosa: 20 gr.
 - Agar: 19 gr.

- Medio Agar Avena:
 - Avena: 30 gr.
 - Agar: 20 gr.

Anexo 2 – Preparación de Quitina Coloidal

Preparación de Quitina Coloidal:

- Se pesó 10 gr de Quitina y se mezcló con 150 ml de ácido clorhídrico en un matraz Erlenmeyer. Agitamos a 600 RPM con 90°C por tiempo de 1h y 30 min en el agitador magnético del laboratorio de agrobiotecnología.
- Colocamos 300 ml de agua destilada helada en el matraz y se colocó en la incubadora con agitación a 160 RPM por 12 h.
- Filtramos el contenido en un matraz para obtener la torta.
- A la torta obtenida se le realizaron 4 lavados con agua destilada, colocando 7 ml de torta con 7 ml de agua destilada helada en un tubo falcon y centrifugando a 6000 RPM por 10 min.
- Se eliminó el sobrenadante y el sedimento fue filtrado en un matraz quitasato con papel filtro y una bomba de vacío para obtener la torta que fue nuestra quitina coloidal.
- Se almacenó la quitina coloidal a 12°C.

Anexo 3 – Preparación

Pruebas enzimáticas de las cepas Q60, Q84, Q45B y Q85.

- Para las pruebas enzimáticas se prepararon los medios de cultivo proteasa, lipasa, quitinasa y celulasa.
- Se colocó 15 ml del medio respectivo para cada una de las 48 placas (3 placas por cada cepa).
- Se estriaron las cepas contenidas en las placas con agar PDA.
- Se incubaron a 27°C por 3 días.
- Las reacciones enzimáticas fueron las observadas en las figuras 17, 18, 19 y 20.

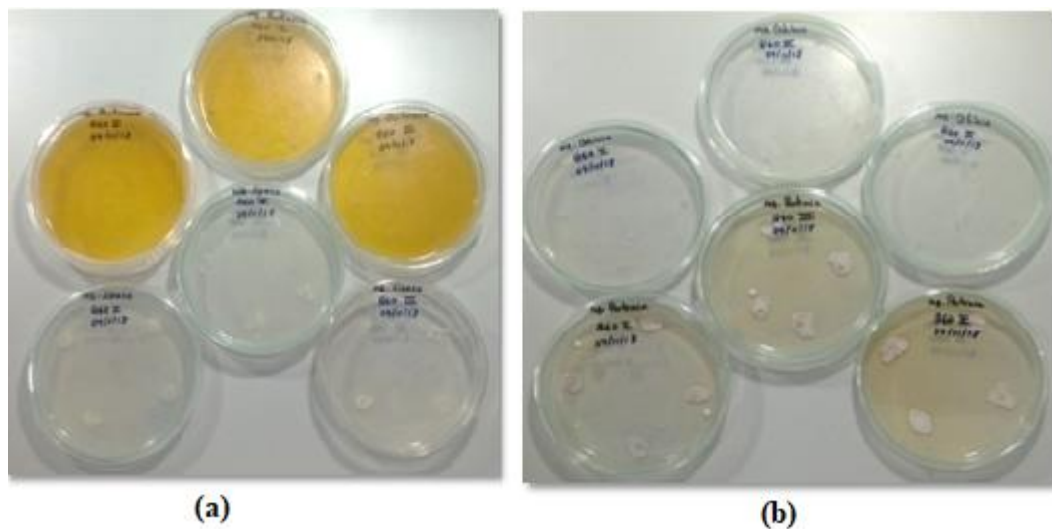
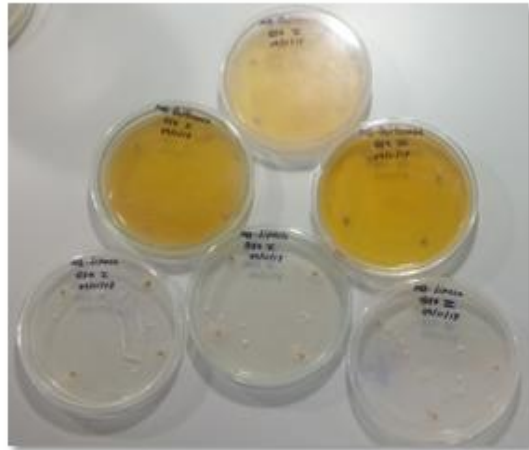
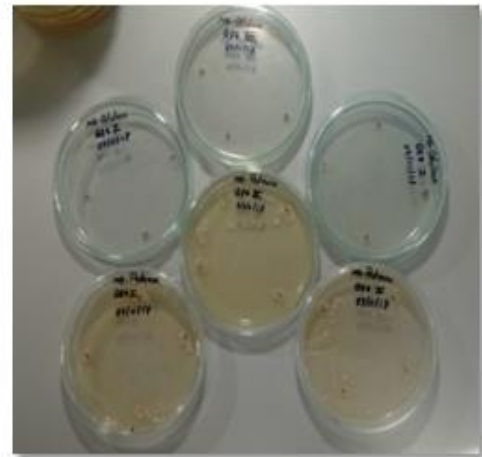


Figura 15. Pruebas enzimáticas de *Streptomyces* spp Q60. (a) quitinasa y lipasa, (b) celulasa y proteasa.

Fuente: Elaboración propia.



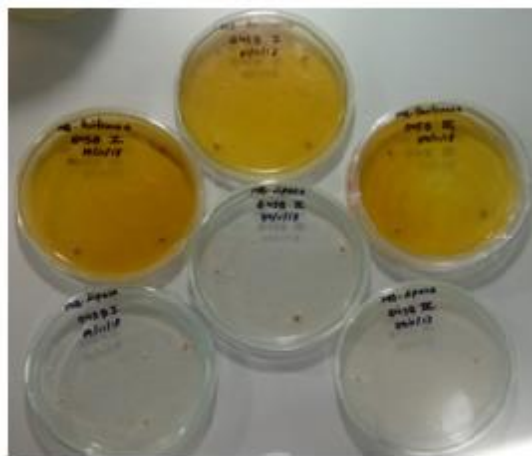
(a)



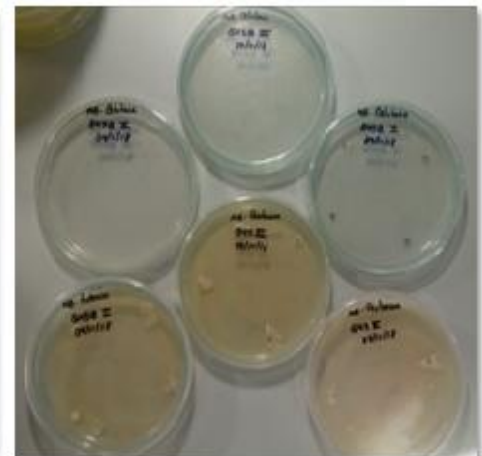
(b)

Figura 16. Pruebas enzimáticas de *Streptomyces spp* Q84. (a) quitinasa y lipasa, (b) celulasa y proteasa.

Fuente: Elaboración propia.



(a)



(b)

Figura 17. Pruebas enzimáticas de *Streptomyces spp* Q45. (a) quitinasa y lipasa, (b) celulasa y proteasa.

Fuente: Elaboración propia.

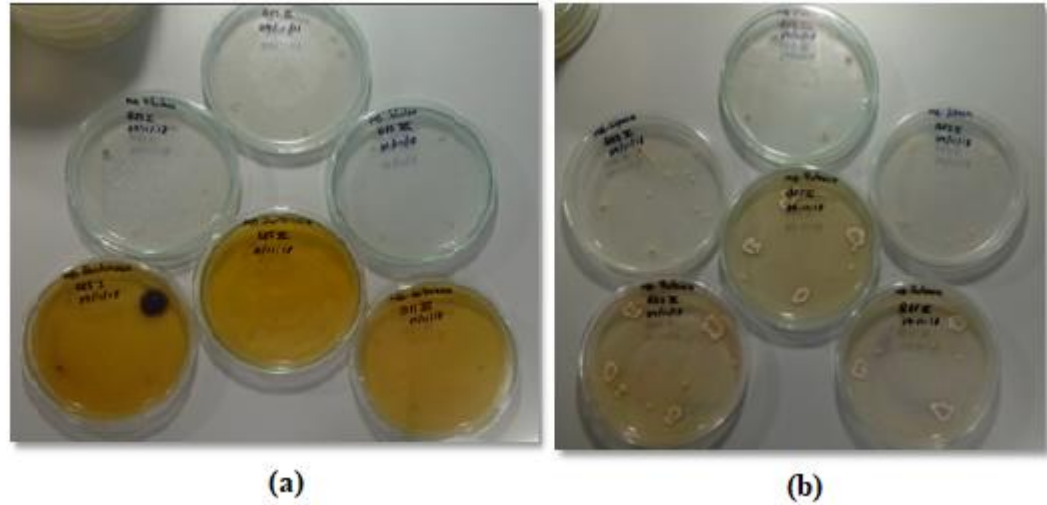


Figura 18. Pruebas enzimáticas de *Streptomyces* spp Q45. (a) quitinasa y lipasa, (b) celulasa y proteasa.

Fuente: Elaboración propia.

Tabla 14. Comparación de medias para determinar las diferencias entre las cepas en estudio.

(I) Cepas bacterianas	(J) Cepas bacterianas	Diferencia de medias (I-J)	Error estándar	Sig.	95% de intervalo de confianza	
					Límite inferior	Límite superior
Q32	Q60	-20,34333 ^a	2,40427	,000	-28,2560	-12,4307
	Q84	-27,42667 ^a	2,40427	,000	-35,3393	-19,5140
	Q45	-24,69333 ^a	2,40427	,000	-32,6060	-16,7807
	Q85	-9,12333 ^a	2,40427	,023	-17,0360	-1,2107
Q60	Q32	20,34333 ^a	2,40427	,000	12,4307	28,2560
	Q84	-7,08333	2,40427	,085	-14,9960	,8293
	Q45	-4,35000	2,40427	,419	-12,2627	3,5627
	Q85	11,22000 ^a	2,40427	,006	3,3073	19,1327
Q84	Q32	27,42667 ^a	2,40427	,000	19,5140	35,3393
	Q60	7,08333	2,40427	,085	-,8293	14,9960
	Q45	2,73333	2,40427	,785	-5,1793	10,6460
	Q85	18,30333 ^a	2,40427	,000	10,3907	26,2160
Q45	Q32	24,69333 ^a	2,40427	,000	16,7807	32,6060
	Q60	4,35000	2,40427	,419	-3,5627	12,2627
	Q84	-2,73333	2,40427	,785	-10,6460	5,1793
	Q85	15,57000 ^a	2,40427	,001	7,6573	23,4827
Q85	Q32	9,12333 ^a	2,40427	,023	1,2107	17,0360
	Q60	-11,22000 ^a	2,40427	,006	-19,1327	-3,3073
	Q84	-18,30333 ^a	2,40427	,000	-26,2160	-10,3907
	Q45	-15,57000 ^a	2,40427	,001	-23,4827	-7,6573

Fuente: SPSS Statistics 22. Elaboración propia.

Tabla 15. Prueba de Tukey para determinar la diferencia significativa

Tratamiento	N	Subconjunto para alfa = 0.05		
		1	2	3
Testigo sin nada	3	,000		
Con bacteria y hongo	3		25,983	
Testigo solo con hongo	3	1,000	1,000	38,767
Sig.				1,000

Fuente: Elaboración propia. SPSS.