



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**

**Universidad del Perú. Decana de América**

**Facultad de Ciencias Biológicas**

**Escuela Profesional de Ciencias Biológicas**

**“Evaluación del potencial antifúngico de los extractos etanólicos de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis* frente al hongo *Botrytis cinerea*”**

**TESIS**

Para optar el Título Profesional de Bióloga con mención en  
Botánica

**AUTOR**

Sheyla Rossana BUSTAMANTE GONZALES

**ASESOR**

Pedro Luis CASTELLANOS SÁNCHEZ

Lima, Perú

2018



Reconocimiento - No Comercial - Compartir Igual - Sin restricciones adicionales

<https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>

Usted puede distribuir, remezclar, retocar, y crear a partir del documento original de modo no comercial, siempre y cuando se dé crédito al autor del documento y se licencien las nuevas creaciones bajo las mismas condiciones. No se permite aplicar términos legales o medidas tecnológicas que restrinjan legalmente a otros a hacer cualquier cosa que permita esta licencia.

## Referencia bibliográfica

---

Bustamante, S. (2018). “*Evaluación del potencial antifúngico de los extractos etanólicos de Phyllanthus niruri y Minthostachys mollis frente al hongo Botrytis cinerea*”. [Tesis de pregrado, Universidad Nacional Mayor de San Marcos, Facultad de Ciencias Biológicas, Escuela Profesional de Ciencias Biológicas]. Repositorio institucional Cybertesis UNMSM.

---



**Universidad Nacional Mayor de San Marcos**  
(Universidad del Perú, Decana de América)

**FACULTAD DE CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**ACTA DE SESIÓN PARA OPTAR AL TÍTULO PROFESIONAL DE  
BIÓLOGA CON MENCIÓN EN BOTÁNICA  
(MODALIDAD: SUSTENTACIÓN DE TESIS)**

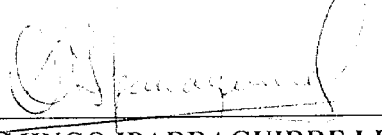
Siendo las 9:05 horas del 04 de octubre de 2018, en el Salón de Grados de la Facultad de Ciencias Biológicas y en presencia del jurado formado por los profesores que suscriben, se dio inicio a la sesión para optar al Título Profesional de Bióloga con mención en Botánica de SHEYLA ROSSANA BUSTAMANTE GONZALES.

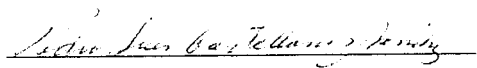
Luego de dar lectura y conformidad al expediente N° 026-EPCB-2018, la titulando expuso su tesis: "EVALUACIÓN DEL POTENCIAL ANTIFÚNGICO DE LOS EXTRACTOS ETANÓLICOS DE *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis* FRENTE AL HONGO *Botrytis cinerea*", y el Jurado efectuó las preguntas del caso calificando la exposición con la nota 1.9, calificativo: Aprobada con máxima honra.

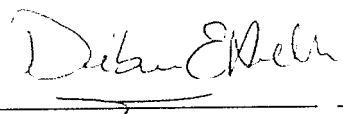
Finalmente, el expediente será enviado a la Escuela Profesional de Ciencias Biológicas y al Consejo de Facultad para que se apruebe otorgar el Título Profesional de Bióloga con mención en Botánica a SHEYLA ROSSANA BUSTAMANTE GONZALES y se eleve lo actuado al Rectorado para conferir el respectivo título, conforme a ley.


Siendo las 10:30 horas se levantó la sesión.

Ciudad Universitaria, 04 de octubre de 2018.

  
Mg. DOMINGO IPARRAGUIRRE LEON  
(PRESIDENTE)

  
Dr. PEDRO CASTELLANOS SANCHEZ  
(ASESOR)

  
Mg. DEBORA ALVARADO IPARRAGUIRRE  
(MIEMBRO)

  
Blga. JASMIN OPISSO MEJIA  
(MIEMBRO)

## **AGRADECIMIENTOS**

En primer lugar, a Dios, quien siempre me da fuerzas y motivos para seguir adelante; asimismo, por permitir que culmine este proyecto y poner en mi camino a grandes personas que están dispuestas a ayudar.

A mi asesor y profesor, PhD. Pedro Luis Castellanos Sánchez, por permitirme formar parte del laboratorio de Micología Aplicada de la UNMSM, por las enseñanzas, la motivación y todos los consejos brindados en el desarrollo de mi tesis y a través de mi desarrollo como investigadora. Muchas gracias por su apoyo incondicional.

Al Dr. Manuel Marín Bravo por su valiosa ayuda en el desarrollo de la parte fitoquímica de esta tesis y por brindarme su ayuda a lo largo de la realización de este proyecto.

Al Vicerrectorado de Investigación y Posgrado de la UNMSM, por el financiamiento económico proporcionado por el Fondo de Promoción de Tesis de Pregrado con código E1700274b y RR N°. 06369-R-17.

A mis padres, Ángel y Shela, por ser el pilar fundamental en mi educación personal y profesional, por su apoyo incondicional durante toda mi vida.

A mi hermano, Jhonnatan, por brindarme su compañía, consejo y apoyarme siempre, te quiero mucho.

A mis mejores amigos, Andrea Arenas, Suham Hurtado, Janet Robles, Carla Muñoz, Xiomy Pinchi y Poll González, quienes me alentaron para poder terminar la tesis.

## ÍNDICE

I.- Introducción .....	1
II.- Marco teórico .....	4
2.1.- Hongos fitopatógenos .....	4
2.2.- <i>Botrytis cinerea</i> .....	5
2.3.- Extractos vegetales en el control de hongos.....	10
2.4.- <i>Phyllanthus niruri</i> (“Chanca piedra”) .....	12
2.5.- <i>Minthostachys mollis</i> (“Muña”) .....	15
III.- Hipótesis y objetivos .....	18
3.1.- Hipótesis.....	18
3.2.- Objetivos .....	18
IV.- Materiales y métodos.....	19
4.1.- Materiales.....	19
4.2.- Métodos.....	20
V.- Resultados.....	28
5.1.- Descripción botánica de las plantas.....	28
5.2.- Obtención del extracto etanólico.....	29
5.3.- Cultivo <i>in vitro</i> del hongo <i>Botrytis cinerea</i> .....	29
5.4.- Evaluación del efecto de los extractos etanólicos contra <i>Botrytis cinerea</i> .....	32
5.5.- Ensayo fitoquímico de <i>Phyllanthus niruri</i> y <i>Minthostachys mollis</i> .....	51
VI.- Discusión .....	52
VII.- Conclusiones .....	57
VIII.- Recomendaciones .....	58
IX.- Referencias bibliográficas .....	59
X.- Anexos .....	72

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Promedio del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> frente a los extractos etanólicos a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10%.....	34
Tabla 2. Promedio del porcentaje de crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> frente a los extractos etanólicos a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10%.....	40
Tabla 3. Promedio del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> frente a los extractos etanólicos a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10%.....	44
Tabla 4. Análisis ANOVA del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> .....	47
Tabla 5. Análisis ANOVA del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Minthostachys mollis</i> . ....	48
Tabla 6. Análisis ANOVA del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> en las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Phyllanthus niruri</i> .....	49
Tabla 7. Análisis ANOVA del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> en las diferentes concentraciones del extracto etanólico de <i>Minthostachys mollis</i> .....	50
Tabla 8. Resultados del screening fitoquímico de los extractos etanólicos de <i>Phyllanthus niruri</i> y <i>Minthostachys mollis</i> .....	51
Tabla 9. Crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10% frente al extracto de <i>Phyllanthus niruri</i> .....	74
Tabla 10. Crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10% frente al extracto de <i>Minthostachys mollis</i> .....	75
Tabla 11. Porcentaje de crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> frente al extracto de <i>Phyllanthus niruri</i> a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10%.....	76
Tabla 12. Porcentaje de crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> frente al extracto de <i>Minthostachys mollis</i> a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10% .....	77
Tabla 13. Porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> frente al extracto de <i>Phyllanthus niruri</i> a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10%.....	78

Tabla 14. Porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> frente al extracto de <i>Minthostachys mollis</i> a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10%.....	79
Tabla 15. Prueba post hoc Tukey del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> frente al extracto de <i>Phyllanthus niruri</i> en medio de APD.....	80
Tabla 16 Prueba post hoc Tukey del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> frente al extracto de <i>Phyllanthus niruri</i> en medio de kiwicha .....	81
Tabla 17. Prueba post hoc Tukey del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> frente al extracto de <i>Minthostachys mollis</i> en medio de APD .....	82
Tabla 18 Prueba post hoc Tukey del crecimiento micelial de <i>Botrytis cinerea</i> frente al extracto de <i>Minthostachys mollis</i> en medio kiwicha.....	83
Tabla 19. Prueba post hoc de Tukey del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> frente al extracto de <i>Phyllanthus niruri</i> en medio APD .....	84
Tabla 20. Prueba post hoc de Tukey del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> frente al extracto de <i>Phyllanthus niruri</i> en medio kiwicha.....	85
Tabla 21. Prueba post hoc de Tukey del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> frente al extracto de <i>Minthostachys mollis</i> en medio de APD .....	86
Tabla 22. Prueba post hoc de Tukey del porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> frente al extracto de <i>Minthostachys mollis</i> en medio kiwicha .....	87
Tabla 23. Tabla de resultados del ensayo fitoquímico .....	88



## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Observación de <i>Botrytis cinerea</i> .....	6
Figura 2. Distribución de <i>Phyllanthus niruri</i> .....	13
Figura 3. Distribución geográfica de <i>Minthostachys mollis</i> .....	16
Figura 4: Colecta de las plantas .....	20
Figura 5: Mapa de ubicación de los puntos de recolección de <i>Phyllanthus niruri</i> y <i>Minthostachys mollis</i> .....	21
Figura 6. Muestras depositadas en el herbario.....	21
Figura 7. Preparación de los extractos etanólicos.. ..	22
Figura 8. Obtención de <i>Botrytis cinerea</i> a partir de aguaymanto .....	24
Figura 9. Observación microscópica de <i>Botrytis cinerea</i> . .....	24
Figura 10. Ensayo fitoquímico preliminar de <i>Phyllanthus niruri</i> .....	27
Figura 11. Ensayo fitoquímico preliminar de <i>Minthostachys mollis</i> .....	27
Figura 12. <i>Botrytis cinerea</i> en APD .....	30
Figura 13. Esclerocios de <i>Botrytis cinerea</i> .....	30
Figura 14. <i>Botrytis cinerea</i> en diferentes medios de cultivo a los siete días de crecimiento.....	31
Figura 15. Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en los medios de APD, kiwicha, kañihua y coca .....	32
Figura 16.. Crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> a diferentes concentraciones en el medio de harina de kiwicha .....	32
Figura 17. Promedio de crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en el extracto de <i>Phyllanthus niruri</i> a las concentraciones de 10%, 7.5%, 5% 2.5%, 1% y 0% en los medios de APD y kiwicha .....	35
Figura 18. Promedio de crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en el extracto de <i>Minthostachys mollis</i> a las concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0% en los medios de APD y kiwicha .....	36

Figura 19. Desarrollo de <i>Botrytis cinerea</i> a diferentes concentraciones de <i>Phyllanthus niruri</i> en medio APD al sétimo día de crecimiento. ....	37
Figura 20. Desarrollo de <i>Botrytis cinerea</i> a diferentes concentraciones de <i>Phyllanthus niruri</i> en medio de kiwicha al sétimo día de crecimiento. ....	37
Figura 21. Desarrollo de <i>Botrytis cinerea</i> a diferentes concentraciones de <i>Minthostachys mollis</i> en medio APD al sétimo día de crecimiento. ....	38
Figura 22. Desarrollo de <i>Botrytis cinerea</i> a diferentes concentraciones de <i>Minthostachys mollis</i> en medio de kiwicha al sétimo día de crecimiento. ....	38
Figura 23. Porcentaje de crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en el extracto de <i>Phyllanthus niruri</i> a las concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0% en los medios de APD y kiwicha .....	41
Figura 24.. Porcentaje de crecimiento de <i>Botrytis cinerea</i> en el extracto de <i>Minthostachys mollis</i> a las concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0% en los medios de APD y kiwicha .....	42
Figura 25. Porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> en el extracto de <i>Phyllanthus niruri</i> a las concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0% en los medios de APD y kiwicha .....	45
Figura 26. Porcentaje de inhibición de <i>Botrytis cinerea</i> en el extracto de <i>Minthostachys mollis</i> a las concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0% en los medios de APD y kiwicha .....	46
Figura 27. Morfología de <i>Phyllanthus niruri</i> .....	72
Figura 28. Morfología de <i>Minthostachys mollis</i> .....	73

## RESUMEN

Los hongos fitopatógenos atacan a los diferentes cultivos agrícolas, y son los principales causantes de enfermedades como la roya, mildiu, podredumbre; siendo muy destructivos por su rápido crecimiento, su reproducción explosiva y su fácil expansión. Actualmente se buscan nuevas técnicas amigables con el ambiente que puedan controlar el ataque de agentes patógenos. Una de estas técnicas innovadoras es el uso de extractos de plantas que producen componentes químicos que tienen el potencial de reducir o detener por completo el crecimiento de hongos fitopatógenos.

El objetivo del presente estudio fue evaluar el efecto antifúngico de los extractos etanólicos de las hojas de *Phyllanthus niruri* ("Chanca piedra") y *Minthostachys mollis* ("Muña") en cultivos *in vitro* de *Botrytis cinerea*. Las plantas fueron recolectadas en el departamento de Cusco, fueron lavadas y secadas en estufa de 45°C durante 5 horas. Luego se prepararon los extractos etanólicos que fueron filtrados, concentrados y esterilizados. El hongo *Botrytis cinerea* fue aislado de aguaymanto con la técnica de cámara húmeda. La evaluación del efecto etanólico se realizó en los medios de Agar Papa Dextrosa (APD) y Agar con harina de kiwicha, cada uno contenía diferentes concentraciones de extractos (0; 1; 2,5; 5; 7,5 y 10 %) y cada concentración estaba compuesta por tres pruebas con cuatro repeticiones cada una.

En total se evaluó 72 placas por cada medio y se tomó cuatro mediciones del crecimiento micelial por placa cada día durante una semana. Se observó que la concentración mínima inhibitoria (CMI) para el extracto de *Phyllanthus niruri* en medio APD y kiwicha es 5% y 2.5% respectivamente, mientras que para el extracto de *Minthostachys mollis* es 5% en ambos medios. Esto puede deberse a que ambos extractos presentan similares metabolitos secundarios como alcaloides y compuestos fenólicos. Los resultados evidencian que los extractos de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis* tienen potencial antifúngico frente a *Botrytis cinerea*.

## ABSTRACT

Phytopathogenic fungi attack different agricultural crops and are the main cause of diseases such as rust, mildew, rot; being very destructive due to their rapid growth, explosive reproduction and easy expansion. At the moment, new environmentally friendly techniques that can control the attack of pathogenic agents have been studied. One of these innovative techniques is the use of plant extracts which produce chemical components potentially active to reduce or completely stop the growth of phytopathogenic fungi.

The objective of the present study was to evaluate the antifungal effect of the ethanolic extracts of *Phyllanthus niruri* ("Chanca piedra") and *Minthostachys mollis* ("muña") leaves, in *in-vitro* cultures of *Botrytis cinerea*. The plants were collected in the department of Cusco; these were washed and dried at 45°C in an oven for 5 hours. Then, the ethanolic extracts were prepared, filtered, concentrated and sterilized. *Botrytis cinerea* was isolated from "Cape gooseberries" (*Physalis peruviana*) using the wet chamber technique. The evaluation of the ethanolic effect was carried out in Papa Dextrose Agar (PDA) and Agar kiwicha (enriched with kiwicha flour), each containing different extract concentrations (0, 1, 2.5, 5, 7.5 and 10%) and each concentration was composed of three tests with four repetitions.

In total, 72 plates were evaluated for each medium and four measurements of mycelial growth per plate were taken each day during a week. It was observed that the minimum inhibitory concentration (MIC) for the extract of *Phyllanthus niruri* in PDA and kiwicha medium is 5% and 2.5% respectively, while for the extract of *Minthostachys mollis* is 5% in both medium. This may be due to the fact that both extracts have similar secondary metabolites such as alkaloids and phenolic compounds. The results show that extracts of *Phyllanthus niruri* and *Minthostachys mollis* have antifungal potential against *Botrytis cinerea*.

## I.- Introducción

El hongo *Botrytis cinerea* es una especie cosmopolita que ataca una amplia variedad de plantas, principalmente a los cultivos de alto valor económico como ornamentales, hortalizas y frutales que se manifiesta mediante la enfermedad conocida como la podredumbre gris o moho gris.

Esta enfermedad se puede presentar en cualquier parte de la planta (raíces, tallos, hojas, frutos y semillas) e incluso en la post cosecha (transporte y almacenamiento), es un hongo que se desarrolla en climas húmedos y frescos produciendo abundantes conidios (Cotrina, 2001 y Espinosa, 2006). Sin control efectivo en pre y pos cosecha ocasiona grandes pérdidas económicas afectando la productividad tanto en términos de cantidad como en calidad del producto cosechado (Benito *et al.*, 2000).

En nuestro país, el hongo *Botrytis cinerea* ataca cultivos de importancia económica como uva y arándanos, debido a que tiene gran facilidad de dispersión y representa un problema fitosanitario a nivel nacional. Para contrarrestar este ataque, los agricultores utilizan grandes cantidades de fungicidas sintéticos, ocasionando problemas en salud pública, contaminación ambiental y la aparición frecuente de cepas resistentes a los fungicidas utilizados.

Frente a este problema, actualmente se buscan nuevas técnicas amigables con el ambiente que puedan controlar el ataque de hongos fitopatógenos. Una de estas técnicas innovadoras es el uso de extractos de plantas que producen componentes químicos que tienen el potencial de reducir o detener por completo el crecimiento de estos hongos (Begum *et al.*, 2016).

A nivel mundial, existen investigaciones sobre el uso de extractos de plantas como controladores de hongos fitopatógenos como lo describen Bautista-Baños *et al.* (2003), Zapata *et al.* (2003), Rodríguez y Sanabria (2005), Lizcano (2007), Bolívar *et al.* (2009), Hussain *et al.* (2010), Mishra *et al.* (2010), Ambikapathy *et al.* (2011), Casado *et al.*

(2011) y Begum *et al.* (2016), los cuales están siendo utilizados en cultivos agrícolas debido a los resultados positivos y a los beneficios que existen frente a los fungicidas sintéticos.

En el Perú recientemente se está desarrollando esta línea de investigación con respecto al uso de extractos vegetales que contengan actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos como lo describen las tesis realizadas por Gómez (2014), Parada (2015), Segura (2015), Bastidas y Llacua (2016) y Espinoza (2016).

El Perú es muy rico y megadiverso en plantas medicinales nativas que son los pilares de la etnofarmacología y la medicina tradicional. Estas plantas son utilizadas en forma empírica debido a sus bondades terapéuticas en el cuidado y restauración de la salud porque contienen propiedades antifúngicas, antibacterianas, insecticidas, entre otras. (Condori y Carrión, 2016)

Son pocas las plantas peruanas que han validado su uso tradicional, una de estas es *Phyllanthus niruri*, conocida popularmente como “Chanca piedra”, la cual es utilizada para tratamientos urinarios, afecciones al hígado, contra la hipertensión y VIH como lo describe Bagalkotkar *et al.* (2006).

Diversos estudios han demostrado que *Phyllanthus niruri* tiene efecto antifúngico contra *Alternaria solani*, *Bipolaris maydis*, *Helminthosporium solani*, *Penicillium notatum* y *Rhizoctonia solani* (Kamalannan *et al.*, 2004; Rodríguez y Sanabria, 2005; Ambikapathy *et al.*, 2011 y Mishra *et al.*, 2010), y efecto antibacteriano frente a *Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli*, *Helicobacter pylori*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Proteus rettgeri*, *Staphylococcus aureus* y *Salmonella typhi* (Ekwenye y Njoku, 2006; Ranilla *et al.*, 2012 e Ibrahim *et al.*, 2013).

También tenemos a *Minthostachys mollis* que es una planta medicinal con uso tradicional y es conocida popularmente como “Muña”, la cual es usada para el tratamiento de dolencias de vías respiratorias y digestivas. Diversos estudios han

demostrado que tiene efecto antibacteriano contra *Bacillus cereus*, *Enterococcus faecalis*, *Listeria monocytogenes*, *Porphyromonas gingivalis*, *Proteus* sp y *Streptococcus mutans* (Inga y Guerra, 2000; Díaz, 2005; Güiza y Rincón, 2007, Cruzado, 2012; Alaba, 2013; Ccallo, 2013 y Baca, 2017), insecticida (Banchio *et al.*, 2005 y Dávila, 2016) y antifúngica frente a *Candida albicans*, *Microsporum canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton tonsurans* (Cano, 2007; Cano *et al.*, 2008; Alcalá-Marcos *et al.*, 2011 y Salas, 2016).

Está comprobado que las hojas de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis* tienen actividad antifúngica frente a hongos fitopatógenos; con esta investigación se demuestra esta propiedad antifúngica frente al hongo *Botrytis cinerea* porque inhibe su crecimiento.

Con este tipo de estudios se busca obtener cultivos libres de hongos fitopatógenos, con mejor calidad, con alto valor comercial, sin la utilización de fungicidas químicos ni contaminantes para el ambiente.

## II.- Marco teórico

### 2.1.- Hongos fitopatógenos

Se conocen cerca de 100 000 especies de hongos, de las cuales la mayoría son saprófitos obligados y solo 8 000 son fitoparásitos. Estos hongos son causantes de dos tercios de las enfermedades en plantas (roya, mildiu, podredumbre). (González, 1989)

Generalmente las plantas pueden ser atacadas por uno o varios hongos, pero un mismo hongo fitopatógeno puede infectar a una o más plantas incluso si estas son de diferentes familias. Estos hongos patógenos pasan la mayor parte de su ciclo de vida en la planta (huésped) y la otra parte en el suelo (saprófito). (Juárez-Becerra *et al.*, 2010)

Los hongos fitopatógenos desarrollan micelios que se extienden dentro de los tejidos del hospedante mientras que las estructuras reproductivas se forman en la superficie ocasionando que las conidias se dispersen rápidamente. (González, 1989)

El ataque de los hongos a las plantas produce efectos que pueden ser de tipo local o generalizado ocasionando diferentes síntomas como abolladuras, agallas, ahogamientos, canchales, cribados, costras, manchas cloróticas y necróticas, marchitamientos, momias, podredumbres húmedas o secas, pústulas y tizones. (Urbina, 2011)

Los hongos fitopatógenos que atacan a cultivos de importancia económica son *Aspergillus* sp, *Blumeria graminis*, *Bremia lactucae*, *Botrytis cinerea*, *Claviceps* sp, *Colletotrichum gloeosporioides*, *Fusarium graminearum*, *Fusarium oxysporum*, *Magnaporthe oryzae*, *Micosphaerella graminicola*, *Moniliophthora roreri*, *Mucor* sp, *Peronospora* sp, *Phytium* sp, *Phytophthora* sp, *Plasmopara viticola*, *Puccinia* sp, *Rhizopus* sp y *Sclerotinia sclerotiorum*. (Agrios, 2004)



## **2.2.- *Botrytis cinerea***

### **2.2.1.- Clasificación taxonómica**

El género *Botrytis* fue descrito por primera vez por Micheli en 1729 y desde entonces es un grupo de interés para la agricultura porque son los responsables de provocar enfermedades que son destructivas a plantas de importancia económica. (Coley-Smith, 1980)

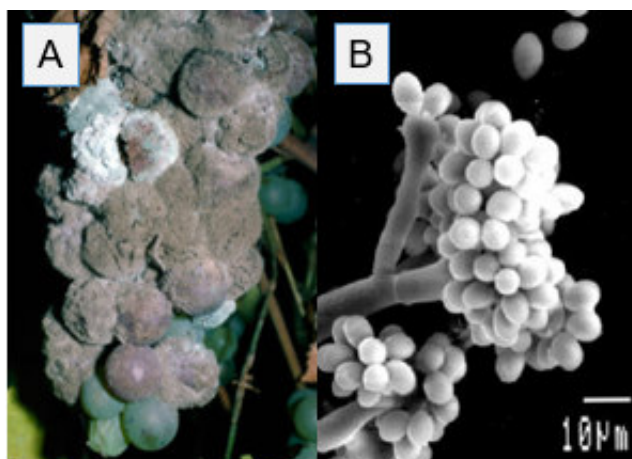
Reino	: Fungi
División	: Ascomycota
Clase	: Leotiomycetes
Orden	: Helotiales
Familia	: Sclerotiniaceae
Género	: <i>Botrytis</i>
Especie	: <i>Botrytis cinerea</i>

Fuente: Mycobank.org

Según Ainworth (1961) y Agrios (2004), *Botrytis cinerea* es la fase imperfecta (anamorfa) de *Botryotinia fuckeliana* que corresponde a la fase perfecta (teleomorfo).

### **2.2.2.- Características**

*Botrytis cinerea* se caracteriza por desarrollar micelio grisáceo y estar constituido por hifas tabicadas. Los conidióforos son largos, delgados, hialinos y se ramifican en la zona apical. En esta zona forma una vesícula donde se disponen los conidios siendo estos la principal estructura de dispersión del hongo. Los conidios son estructuras ovaladas, elípticas o globosas. (Espinosa, 2006; Moreno, 2011; Laurencio, 2015)



Fuente: Espinosa, 2006

**Figura 1. Observación de *Botrytis cinerea*. A) Características macroscópicas  
B) Características microscópicas**

Cuando el clima es húmedo y fresco, *Botrytis cinerea* produce numerosos conidios que ocasionan infecciones, siendo 17-18°C la temperatura óptima de esporulación mientras que a los 25°C presenta poca esporulación y a los 30°C no se observa esporulación (Cotrina, 2001). Sin embargo, este fitopatógeno presenta actividad a bajas temperaturas produciendo importantes pérdidas en cosechas incluso cuando los productos han estado almacenados durante largos periodos a temperaturas entre 0 y 10°C. (Agrios, 2004)

Todo esto nos indica que *Botrytis cinerea* tiene gran adaptación a las diferentes condiciones climáticas, produciendo gran cantidad de conidios que afectan a los productos y que solamente pueden ser inhibidas en condiciones secas.

En cambio, cuando las condiciones climáticas son desfavorables para *Botrytis cinerea*, este desarrolla estructuras de resistencia llamados esclerocios. Estos son órganos pluricelulares de coloración negruzca, muy compactos y contienen gran acumulación de sustancias nutritivas (75% de carbohidratos, 10% de proteínas, 5% de glucosamina y 0.21% de lípidos), el cual proporciona condiciones favorables para soportar las bajas temperaturas en invierno y posteriormente germinar con un nuevo micelio en primavera. (Grindle, 1979 y Espinosa, 2006)

### **2.2.3.- Síntomas**

Los síntomas de la enfermedad producida por *Botrytis cinerea* depende de la especie de planta que ataca, generalmente produce lesiones de aspecto húmedo y de color grisáceo. (Laurencio, 2015)

*Botrytis cinerea* aparece principalmente en forma de tizones de inflorescencias y pudriciones de fruto, pero también como canchales o pudriciones del tallo, anegamiento de plántulas, manchas foliares y pudriciones del tubérculo. (Rivera, 2007)

La enfermedad más importante causada por *Botrytis cinerea* es la podredumbre gris que puede afectar a raíces, bulbos, plántulas, tallos, hojas, flores, frutos y semillas. Además, este hongo no solo ataca a los cultivos que están en el campo, sino que también provoca enfermedades post cosecha porque mantiene una infección latente en el cultivo y se desarrolla en la recolección, transporte y almacenamiento (Agris, 2004; Espinosa, 2006).

### **2.2.4.- Cultivos a los que ataca**

*Botrytis cinerea* ataca a una gran variedad de plantas como, ornamentales (rosa, geranio, tulipán, clavel, violeta africana, begonia, ciclamino, crisantemo, dalia, lirio, alhelí), frutales, (uva, fresa, arándano, kiwi, aguaymanto, plátano, manzana, pera, frambuesa, toronja, mora), hortalizas (alcachofas, frijoles, beterragas, col, zanahoria, pepino, berenjena) y verduras (lechuga, cebolla, pimiento, calabaza, tomate) (Agris, 2004; Espinosa, 2006).

En el Perú, *B. cinerea* ataca principalmente a los cultivos de tomate, vid, arándanos y fresa, ocasionando a los agricultores grandes pérdidas económicas.

### 2.2.5.- Control

El control de *Botrytis cinerea* no es sencillo porque este hongo tiene la capacidad de afectar a cultivos en diferentes estados de desarrollo (incluida post cosecha), infecta cualquier órgano vegetal, crece a temperaturas de almacenamiento muy bajas (0-10°C) y es genética y morfológicamente heterogéneo (Espinosa, 2006); tradicionalmente se ha utilizado fungicidas químicos siendo los más comunes benomilo, carbendazima y diclofuanida.

Williamson *et al.* (2007) afirmaron que *Botrytis cinerea* ataca a más de 200 cultivos en el mundo existiendo fungicidas para su control, pero muchas de estos no tienen efecto debido a que el hongo tiene plasticidad genética.

En todos los países, *Botrytis cinerea* puede ser controlada por fungicidas sintéticos, pero Elad *et al.* (1992) demostraron que este hongo desarrolla resistencia a ciertos fungicidas específicos en un corto tiempo; es por esta razón que Agrios (2004) recomienda el uso de diferentes fungicidas o combinaciones de estos para que pueda disminuir la aparición y establecimiento de cepas resistentes.

Chávez (2016), comparó el control de *Botrytis cinerea* con fungicidas químicos (Carbendazim e Iprodione) y biológicos (*Trichoderma harzianum* y *Bacillus subtilis*), siendo Iprodione el que inhibió en un 100% el crecimiento del patógeno.

En países avanzados se emplean plantas resistentes para el control de *Botrytis cinerea*. En Alemania, Hain *et al.* (1993) lograron transformar células de tabaco con un gen estilbenosintasa de uva aumentando la resistencia de la planta frente a *B. cinerea*. También se utilizan otros agentes de biocontrol por ejemplo *Trichoderma* porque son capaces de provocar una reducción en la elongación y germinación de los tubos germinativos en las hojas de los frejoles que son atacadas por *B. cinerea*. (Kapat *et al.* 1998)

Cabello (2005) señala que el control de las enfermedades causadas por *Botrytis cinerea* se logra mediante la eliminación de restos de plantas infectadas, buena ventilación y desecación rápida tanto para las plantas como para sus productos.

Dos Santos *et al.* (2010), demostraron que el aceite esencial de *Schinus molle* es letal contra *Botrytis* sp. en diluciones inferiores al 10%; mientras que la dosis letal de *Schinus terebinthifolius* para *Botrytis* sp. es mayor al 25%.

En el Perú, se ha estado buscando nuevos métodos de control para *Botrytis cinerea* puesto que este es un hongo fitopatógeno que trae muchos problemas en la agricultura. Así Ricaldi (2013), determinó la acción antagónica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* procedente de cultivos de *Fragaria vesca*, obteniendo la inhibición del crecimiento de *B. cinerea* en un 46.1%.

En Trujillo, Espinoza (2016) comparó el aceite esencial y extracto acuoso de las hojas de *Schinus molle* sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea*, obteniendo una mejor inhibición de *B. cinerea* empleando el aceite esencial a una concentración del 15%.

#### **2.2.6.- Daño económico**

*Botrytis cinerea* es un hongo con peligro potencial porque se puede desarrollar en regiones de climas templados, zonas secas, zonas desérticas y regiones frías como Alaska (Anderson *et al.*, 1924). Se estima que el 20% de las cosechas a nivel mundial se encuentran afectadas por *B. cinerea*, lo cual ocasiona un gasto de aproximadamente de 10 a 100 billones de euros al año y el costo de su manejo representa el 10% de la venta mundial de fungicidas. (Genoscope, 2005)

La presencia de *Lobesia botrana* (polilla de la vid) es un gran problema debido a que esta plaga incrementa la vulnerabilidad de infección de *B. cinerea* en los racimos de uva llegando a mermar la producción en un 60%. En el Perú, SENASA

realiza monitoreos preventivos de *L. botrana* lo que ha permitido que la producción de uva se haya incrementado en los últimos años al 100% debido a la exportación a EEUU, Holanda, Hong Kong, Rusia y China. (SENASA, 2018)

### **2.3.- Extractos vegetales en el control de hongos**

Actualmente, la resistencia de los hongos frente a los fungicidas químicos está generando que los científicos busquen nuevas alternativas para el control de estos agentes patógenos que atacan cultivos de importancia económica. En los últimos años se ha venido investigando el uso de extractos vegetales como fungicidas, obteniendo resultados muy prometedores con especies de plantas que son abundantes en la naturaleza y se encuentren en diferentes ambientes ecológicos.

En este contexto, Duke *et al.* (1990) confirmaron que algunas plantas contienen propiedades antifúngicas que son utilizadas a partir de los extractos crudos y semi-purificados. También Baruah *et al.* (1996) determinaron que los metabolitos secundarios de las plantas son degradados rápidamente del suelo; por lo tanto, no son tóxicos para los mamíferos y tienen un rol efectivo en la agricultura sustentable y ecológica.

En Costa Rica, Rodríguez y Montilla (2002) evaluaron el efecto del extracto de semilla de *Citrus paradisi* sobre la marchitez causada por *Fusarium oxysporum in vitro* y sobre la marchitez causada por el mismo patógeno en tomate. Teniendo como resultado un efecto reductor del extracto de *C. paradisi* sobre el crecimiento del micelio de *F. oxysporum in vitro*; y en tomate, logró reducir un 85% la marchitez. Concluyendo que existe una alta posibilidad de controlar patógenos del suelo con el uso de extractos de semillas de *C. paradisi*.

En Venezuela, Zapata *et al.* (2003) evaluaron la reducción del crecimiento de 10 hongos fitopatógenos con extractos de *Cereus deficiens*, obteniendo la reducción significativa del crecimiento micelial entre 70-94% especialmente en *Phytophthora*

*infestans* y *Sclerotium rolfsii*, siendo el efecto reductor directamente proporcional a la concentración empleada.

Rodríguez y Sanabria (2005), evaluaron el efecto del extracto de *Phyllanthus niruri*, *Heliotropium indicum* y *Lippia organoides* sobre los hongos *Rhizoctonia solani* y *Bipolaris maydis* que atacan el cultivo de maíz; obteniendo que los 3 extractos de plantas presentan metabolitos secundarios que inhiben el crecimiento de estos 2 hongos tanto en pruebas *in vitro* como *in vivo* (vivero) reduciendo entre el 30 y 80% la enfermedad.

Recientemente en el Perú se está empleando el uso de extractos de plantas como controladores de hongos por ejemplo Ruiz (2013), determinó la actividad antifúngica *in vitro* de los extractos metanólicos, etanólicos e hidroalcohólicos de ocho plantas (*Cassia reticulata*, *Hypericum laricifolium*, *Ilex guayusa*, *Juglans neotropica*, *Piper lineatum*, *Piper* sp., *Psidium guajava* y *Terminalia catappa*) frente a tres hongos (*Aspergillus niger*, *Candida albicans* y *Microsporum canis*); obteniendo actividad antifúngica importante en todos los extractos frente a *C. albicans* y *M. canis*; mientras que ninguno tuvo actividad frente a *A. niger*. Asimismo, los extractos de *J. neotropica*, *P. guajava* y *T. catappa* exhibieron mayor actividad antifúngica.

En Lima, Huamaní y Ruíz (2005) determinaron la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales del Perú, obteniendo que los extractos de *Hypericum laricifolium*, *Juglans neotropica*, *Piper* sp., *Psidium guajava*, *Schinus molle* y *Spartium junceum* tienen actividad antifúngica significativa contra *C. albicans*; mientras que los extractos de *J. neotropica* y *Piper* sp. tienen una débil actividad contra *A. niger*.

En Iquitos, Scavino y Saldaña (2015) evaluaron la actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* frente a los hongos

*Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*, obteniendo mayor actividad antifúngica frente a *T. rubrum* con una concentración mínima inhibitoria de 0.39 mg/mL.

En Trujillo, Segura (2015) evaluó la actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* frente a *Lasiodiplodia theobromae*, obteniendo mayor inhibición a la concentración del 30%.

En Juliaca, Parada (2015) determinó la actividad antifúngica del extracto acuoso de las hojas de la Jarilla (*Larrea* sp) frente a la tiña capitis (*Trichophyton mentagrophytes*), obteniendo que el grado de inhibición a las 72 horas fue del 100%.

## **2.4.- *Phyllanthus niruri* (“Chanca piedra”)**

### **2.4.1.- Clasificación taxonómica**

Reino : Plantae

División : Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Subclase: Rosidae

Orden : Euphorbiales

Familia : Euphorbiaceae

Género : *Phyllanthus*

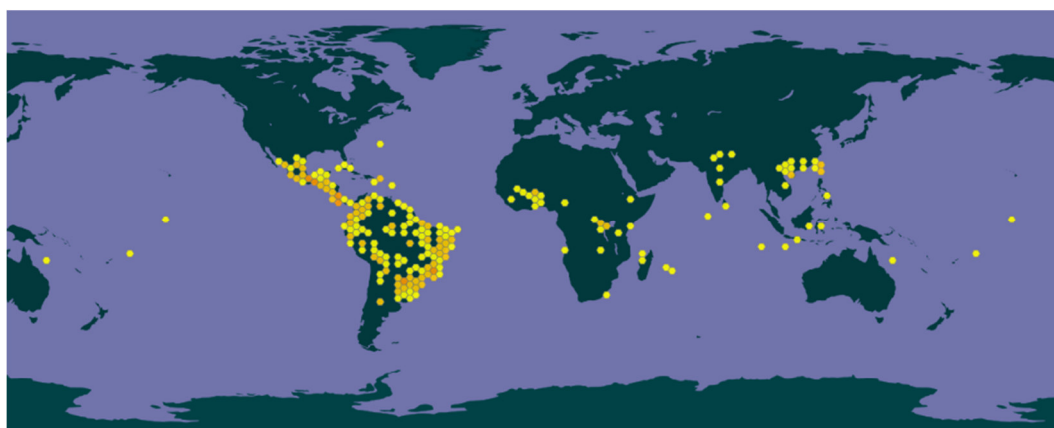
Especie : *Phyllanthus niruri* Linn

Sistema de clasificación según Cronquist (1981)



### 2.4.2.- Distribución geográfica

*Phyllanthus niruri* es una planta nativa de América y se encuentra distribuida en las zonas tropicales y sub tropicales especialmente en bosques lluviosos (Castillo, 2011). Se adapta a diferentes suelos y pisos ecológicos hasta los 3 000 msnm y en Perú es abundante en todas las zonas tropicales creciendo de forma silvestre en lugares húmedos y sombreados. En el Perú, Macbride y Dahlgren (1936) reportaron a *P. niruri* en los departamentos de Amazonas, Cusco, Cajamarca, Loreto y San Martín entre los 500-3000 msnm.



Fuente: Base de datos GBIF

**Figura 2. Distribución de *Phyllanthus niruri***

### 2.4.3.- Usos medicinales

*Phyllanthus niruri* es usado para el tratamiento de diferentes dolencias por los diversos componentes que contiene. Presenta acción en el tracto urinario (inhibe la formación de cálculos renales), actividad hepática (acción protectora y contra virus de Hepatitis B), actividad antiretroviral (contra VIH-1), acción antimalárica, antiinflamatoria, antilipémica e antidiabética. (Eudes do nascimento, 2008)

Moreira *et al.* (2014) reportaron propiedades astringentes, sedantes y tónicas, asimismo, para las infecciones de boca y garganta actúa como hepatoprotectoras y paliativas.

En la medicina tradicional de la India (Ayurveda) es usado en tratamientos contra disentería, influenza, diabetes, cálculos renales, tumores, hepatotoxicidad e hiperglicemia (Berlowski *et al.*, 2013). También Paithankar *et al.* (2011) recomendaron su uso contra bronquitis, lepra, anemia, asma y enfermedades del hígado.

En Brasil es considerado un excelente remedio para hidropesía e infecciones urinarias (Bagalkotkar *et al.*, 2006) y en Perú se utiliza como antiinflamatorio y contra afecciones renales de cálculos en riñones. (Isla, 2016)

#### **2.4.4.- Metabolitos secundarios**

*Phyllanthus niruri* tiene una gran variedad de compuestos químicos como alcaloides (nirurina), cumarinas (ácido elágico), flavonoides (quercetina, rutina, astragalina, nirurina, niruriflavona, quercetol), lignanos (filantina, hipofilantina), taninos (geranin, corilagina), triterpenos (limoneno, filantenol), esteroides (estradiol), ftalato, lípidos y saponinas. (Bagalkotkar *et al.*, 2006 y Lee *et al.*, 2016)

Arboleda *et al.* (2007), determinaron que *Phyllanthus niruri* tiene poca cantidad de flavonoides y leucoantocianinas, mediana cantidad de compuestos fenólicos, taninos, triterpenoides y quinonas y abundante cantidad de aminoácidos. En cambio, Bolívar *et al.* (2009) encontraron que *P. niruri* contiene alcaloides, aceites esenciales, polifenoles y taninos, antraquinonas y flavonoides.

Do Rosario *et al.* (2016), realizaron un análisis fitoquímico de *P. niruri* encontrando esteroides y triterpenos, alcaloides, depsideos e depsidonas, azúcares reductores y antraquinonas.

Isla (2016), evaluó el contenido de compuestos fenólicos de la hoja de *Phyllanthus niruri*, usando la técnica de Folin- Ciocalteu, obteniendo que esta planta presenta un alto contenido de polifenoles totales.

## **2.5.- *Minthostachys mollis* (“Muña”)**

### **2.5.1.- Clasificación taxonómica**

Reino : Plantae

División : Magnoliophyta

Clase : Magnoliopsida

Subclase: Asteridae

Orden : Lamiales

Familia : Lamiaceae

Género : *Minthostachys*

Especie : *Minthostachys mollis* Griseb.

Sistema de clasificación según Cronquist (1981)

### **2.5.2.- Distribución geográfica**

*Minthostachys mollis* es una planta nativa de la cordillera de los Andes (desde Venezuela hasta Bolivia) y se encuentra a una altitud entre 1000 – 3400 msnm (Castillo, 2010). Se desarrolla en suelos franco areno-arcilloso, franco limo-arcilloso, arcilloso y areno-arcilloso; habita en laderas rocosas y pedregosas, bordes de carreteras, laderas de arbustos, borde de campos de cultivo. (Salas, 2016)

Es una planta oriunda del Perú y muy difundido en las regiones andinas (Apurímac, Ayacucho, Cusco, Huancavelica y Puno) y se encuentra en los diferentes pisos ecológicos de nuestra sierra con mayor abundancia entre 2500 y 3500 msnm. (Baca, 2017)



Fuente: Base de datos GBIF

**Figura 3. Distribución geográfica de *Minthostachys mollis***

### **2.5.3.- Usos medicinales**

Esta planta se conoce desde tiempos preincaicos por sus propiedades medicinales, comestibles y en la conservación de tubérculos contra plagas (insectos). (Cano, 2007)

Fuertes y Munguía (2001), afirman que *Minthostachys mollis* es reconocida tradicionalmente por sus propiedades digestivas (cólicos, vómitos, diarrea, flatulencias, úlceras), antiasmático, expectorante, antireumático, antiinflamatorio, antiséptica, analgésico, tratamiento de tumores, contra jaquecas y soroche. (Huamaní, 2015)

### **2.5.4.- Metabolitos secundarios**

El aceite esencial de *Minthostachys mollis* está compuesto principalmente por terpenos como pulegona (19.3%), mentona (18.4%), carvona (1.7%) y en menor concentración por limoneno, eucaliptol e isomentona. (Salas, 2016)

En Ecuador, Alkire *et al.* (1994) identificaron 19 componentes del aceite esencial de *Minthostachys mollis* compuesto por neomentol (29.3%), mentona (24%) y mentol (20,6%).

En Venezuela, Rojas y Usubillaga (1995) determinaron que pulegona es el principal componente del aceite esencial de *M. mollis* con 79.3% y 75.2% en plantas cosechadas a 3600 y 1600 msnm respectivamente. Asimismo, en Perú, Senatore (1998) y Maquera *et al.* (2009) reportaron que el aceite esencial de *M. mollis* estaba compuesto principalmente por pulegona y mentona.

### **III.- Hipótesis y objetivos**

#### **3.1.- Hipótesis**

El extracto etanólico de las hojas de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis* tienen actividad antifúngica contra el cultivo *in vitro* del hongo *Botrytis cinerea*

#### **3.2.- Objetivos**

##### **3.2.1.- Generales**

Evaluar el efecto antifúngico de los extractos etanólicos de las hojas de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis* frente a cultivos de *Botrytis cinerea*

##### **3.2.2.- Específicos**

- Establecer las condiciones del cultivo *in vitro* de *Botrytis cinerea*
- Determinar la concentración mínima inhibitoria de los extractos etanólicos que contenga la actividad antifúngica.
- Establecer qué extracto etanólico tiene el mayor efecto antifúngico en el crecimiento del hongo *Botrytis cinerea*.

## **IV.- Materiales y métodos**

### **4.1.- Materiales**

#### **4.1.1.- Material biológico**

Hojas de *Phyllanthus niruri* Linn, hojas de *Minthostachys mollis* Griseb, hongo *Botrytis cinerea* Pers y fruto de *Physalis peruviana* L.

#### **4.1.2.- Material de laboratorio**

2 frascos ámbar de 1000 mL, 24 frascos de 250 mL, 3 frascos ámbar de 250 mL, 2 bolsas de plástico grande, 288 placas Petri pequeñas, 2 placas Petri grandes, 16 tubos de ensayo de 10x100 mm, matraz de Erlenmeyer, 4 pocillos de plástico, medio de cultivo agar papa dextrosa (APD), medio sabouraud, medio malta, medio con harina de kiwicha, kañihua y coca, agar microbiológico, pipetas de 1mL, 5mL y 10 mL, membrana esterilizada de 0.45 µm, papel Whatman N° 1, pinzas punta fina, 4 táperes de plástico cuadrado, bisturí N° 16, lejía 10%, olla, cucharas, asa de siembra, tiras de papel de pH, embudos, gasa, algodón, agua bidestilada estéril, láminas, laminillas, papel milimetrado y mechero Bunsen.

#### **4.1.3.- Productos químicos**

1000 mL de etanol de 95°, alcohol 96° y 70°, reactivo Dragendorff, reactivo Mayer, HCl concentrado y 1%, limaduras de Magnesio, FeCl<sub>3</sub> 1% y azul de lactofenol.

#### **4.1.4.- Equipos de laboratorio**

Bomba de vacío, baño maría, horno, Phmetro, autoclave, microscopio, estereoscopio, balanza analítica y de precisión, refrigeradora y horno microondas.

## 4.2.- Métodos

### 4.2.1.- Recolección de las plantas

Se utilizaron técnicas estándares para la colecta, herborización y posterior manejo de plantas siguiendo las recomendaciones de Cerrate (1969) (Fig.4).



**Figura 4: Colecta de las plantas**

Las dos plantas fueron recolectadas en el departamento de Cusco en setiembre del 2017. La planta *Phyllanthus niruri* fue recolectada en la provincia de La Convención, distrito de Echarate, caserío de Cochapampa alta, Pomabambilla. Las coordenadas fueron 12° 42' 17.7" S 72° 34' 8.7" O a una altitud de 1348 msnm.

La planta *Minthostachys mollis* fue recolectada en la provincia de Calca, distrito de Pisac, camino a Viaccia. Las coordenadas fueron 13°25'1.62"S 71°50'56.99"O a una altitud de 2980 msnm (Fig. 5).

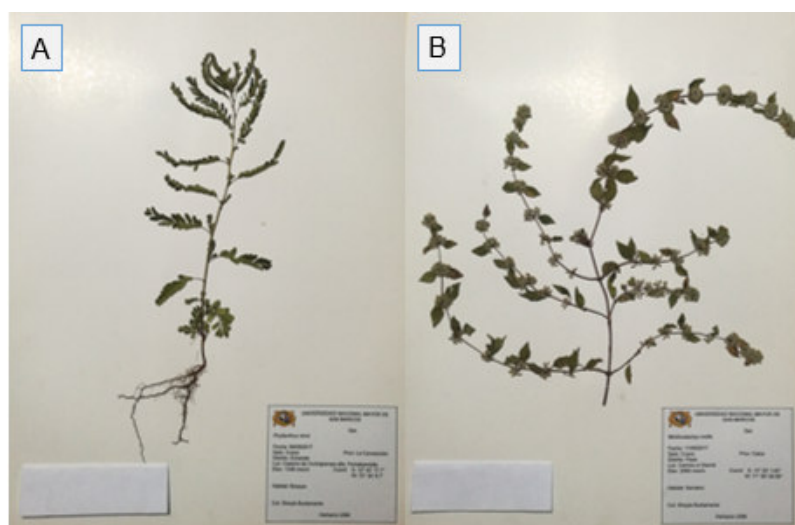




**Figura 5: Mapa de ubicación de los puntos de recolección de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis***

#### **4.2.2.- Identificación y descripción botánica**

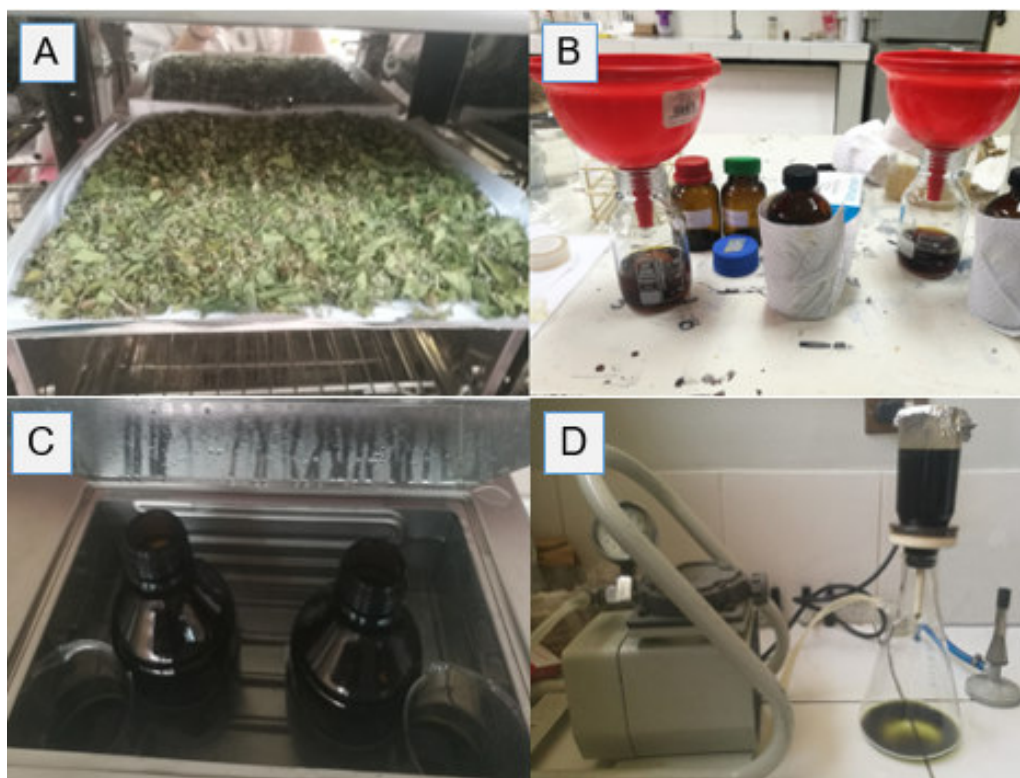
Para la determinación de las plantas se emplearon claves taxonómicas y descripciones botánicas, teniendo como base las publicaciones de *Flora of Perú* (Macbride y Dahlgren, 1936), *A Field Guide to the Families and Genera of Woody Plants of North West South America* (Gentry, 1993) y *Curso de Botánica* (Fernández *et al.* 2004). Luego las muestras fueron acreditadas en el Herbario San Marcos (USM) del Museo de Historia Natural y fueron depositadas en esta colección (Fig. 6).



**Figura 6. Muestras depositadas en el herbario. A) *Phyllanthus niruri* B) *Minthostachys mollis***

#### 4.2.3.- Preparación de los extractos etanólicos

Para la preparación de los extractos se empleó la metodología utilizada por Ogbulie *et al.* (2007). Las plantas recolectadas fueron lavadas y secadas en estufa a 45°C durante 5 horas. Luego las hojas fueron separadas y pulverizadas manualmente, depositándolas en frascos color ámbar. Se agregó etanol de 95° en la proporción de 20g/250mL, estos fueron agitados cada 30 minutos durante 6 horas y se dejó reposar durante 48 horas. Después cada extracto se pasó por papel filtro Whatman N°1 y se colocó en baño maría a 78.3 °C por el punto de ebullición del etanol de 95° durante 4 días para su concentración. Se esterilizaron los extractos reducidos usando una bomba de vacío, al cual se le colocó una membrana esterilizada de 0.45 µm. Finalmente, los extractos fueron guardados en frascos de color ámbar y almacenados en refrigeración hasta su uso. (Fig. 7)



**Figura 7. Preparación de los extractos etanólicos. A) Plantas secadas en estufa a 45°C. B) Filtración de los extractos con papel Whatman N° 1 C) Concentración de los extractos en baño maría a 78.3° D) Esterilización de los extractos en bomba de vacío.**

#### 4.2.4.- Obtención y cultivo *in vitro* del hongo *Botrytis cinerea*

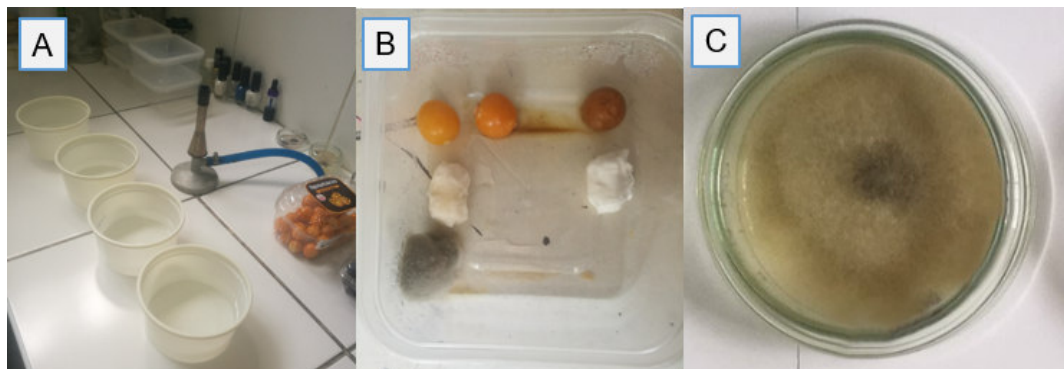
El hongo *Botrytis cinerea* fue aislado de aguaymanto con la técnica de cámara húmeda según la metodología descrita en el libro *Fungal Plant Pathogens* (Lane *et al.*, 2012).

Se preparó 200 mL de lejía al 10% y se colocó en un pocillo; así mismo, en cada uno de los tres pocillos se agregó 200 mL de agua bidestilada estéril. Se procesaron 16 aguaymantos (sin cáliz), estos fueron lavados con abundante agua de caño. Luego cada aguaymanto se pasó por el pocillo con lejía y después por los otros tres pocillos durante 15 segundos en cada pocillo con movimiento constante. Cada aguaymanto estéril se colocó en los táperes previamente desinfectados con alcohol de 70° y se agregó un algodón con agua destilada estéril. Se incubó a temperatura ambiente y a los cinco días se observó un crecimiento micelial grisáceo que es característico de *Botrytis cinerea* (Fig. 8).

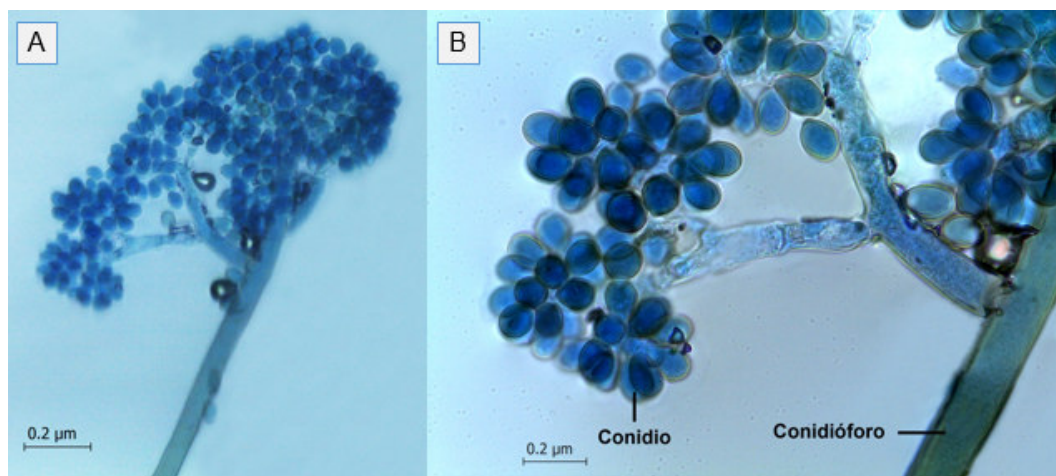
Para la identificación se utilizó la técnica de microcultivo descrita en el libro *Micología Médica Ilustrada* (Arenas, 2014) que consistió en cortar con la ayuda de un bisturí trozos de APD de 0.8 x 0.8 cm y se depositó sobre una lámina portaobjeto. Luego con el asa de siembra en ángulo recto se recogió una pequeña porción del cultivo y se depositó en el centro de uno de los lados del agar; esto se repitió en los tres lados restantes. Después se cubrió con una laminilla y se depositó un trozo de algodón estéril húmedo dentro de la placa Petri. Se incubó a temperatura ambiente durante siete días, se montó las laminillas con azul de lactofenol y se observó las estructuras reproductivas al microscopio (Fig. 9). También se emplearon claves taxonómicas y descripciones micológicas teniendo como base el libro *Pictorial atlas of soil and seed fungi* (Watanabe, 2010).

Se cultivó *Botrytis cinerea* en diferentes medios de cultivo (Agar papa dextrosa, Agar sabouraud, Agar malta, Agar con harina de kiwicha, kañihua y coca)

siguiendo la metodología descrita en el libro *Fungal Plant Pathogens* (Lane *et al.*, 2012) (Anexo 7).



**Figura 8. Obtención de *Botrytis cinerea* a partir de aguaymanto. A) Desinfección de los aguaymantos. B) *B. cinerea* aislado con la técnica de cámara húmeda. C) *B. cinerea* aislado en medio APD**



**Figura 9. Observación microscópica de *Botrytis cinerea*. A) Aumento 400X B) Aumento 1000X**

#### **4.2.5.- Evaluación del efecto de los extractos etanólicos contra *Botrytis cinerea***

Para esta evaluación se adaptó la metodología de Rodríguez y Sanabria (2005) y se midió el halo de crecimiento del hongo en los diferentes tratamientos. Se evaluó el crecimiento de *Botrytis cinerea* en los medios de APD y agar con harina de kiwicha conteniendo en cada medio las concentraciones (v/v) de 0; 1; 2,5; 5; 7,5 y 10 % para los extractos de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis*. (Anexo 7)

A partir de cultivos de *Botrytis cinerea* de siete días de crecimiento se sembró por punción en las placas que contenían las diferentes concentraciones de los extractos en ambos medios. Estas placas fueron incubadas a temperatura ambiente y se midió el diámetro de la colonia a los 2, 3, 4, 5, 6 y 7 días después de la inoculación.

Se realizaron tres pruebas con cuatro repeticiones en diferentes tiempos para cada concentración y por cada placa se tomaron 4 mediciones con ayuda del programa Image J. Estos datos se promediaron y se calcularon los porcentajes de crecimiento e inhibición micelial con las siguientes fórmulas.

$$\% \text{ de crecimiento} = \frac{\text{Diámetro de crecimiento del hongo en el extracto} \times 100}{\text{Diámetro de crecimiento del hongo en el control}}$$

$$\% \text{ de inhibición} = 100 - \% \text{ de crecimiento}$$

Se realizaron cuadros y gráficos con los datos obtenidos. Los datos del séptimo día fueron sometidos al análisis de varianza (ANOVA) y la comparación de medias de los diferentes tratamientos fueron analizadas con el método de Tukey, utilizando el programa IBM SPSS Statistics 21.

#### **4.2.6.- Ensayo fitoquímico de *Phyllanthus niruri* y *Mintostachys mollis***

Para realizar este ensayo se siguió la metodología estandarizada de CYTED (1995). Se realizaron pruebas de colorimetría en tubos de ensayo (Fig. 10 y Fig. 11) para determinar cualitativamente la presencia de los principales grupos metabólicos mediante la formación de precipitados y coloraciones:

- Tricloruro férrico (Compuestos fenólicos)

En un tubo de ensayo se colocó 0,5 mL del extracto. Se adicionó una gota de FeCl<sub>3</sub>. Se considera positiva si la coloración cambia a:

- Verde para taninos catéquicos
- Azul para taninos gálicos
- Rojo vino para compuestos fenólicos libres.

- Shinoda (Flavonoides)

En un tubo de ensayo se colocó 0,5 mL del extracto. Con ayuda de una pinza se agregó limaduras de Magnesio y una gota de HCl concentrado. La prueba se considera positiva cuando se observa una coloración amarilla, naranja, rosado o rojo y guinda.

- Dragendorff (Alcaloides)

En un tubo de ensayo se colocó 0,5 mL del extracto. Se agregó 0,5 mL de HCl al 1%, luego se adicionó 2 a 3 gotas de reactivo Dragendorff. La prueba se considera positiva si se observa un precipitado naranja: ausencia (-), leve (+), moderado (++) , abundante (+++).

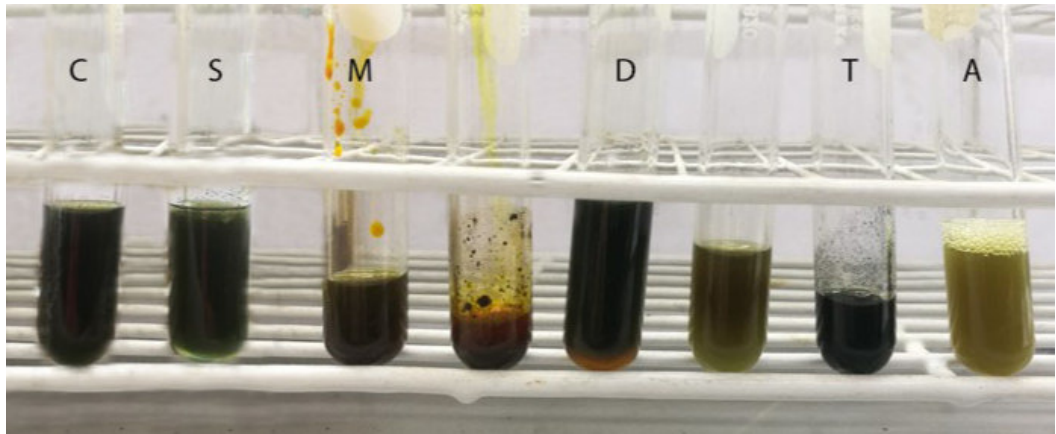
- Mayer (Alcaloides)

En un tubo de ensayo se colocó 0,5 mL del extracto. Se adicionó 0,5 mL de HCl al 1%, luego se agregó de 2 a 3 gotas de reactivo Mayer. La reacción es positiva si se observa: opalescencia (+), turbidez definida (++) y precipitado (+++).

- Afrosimétrica (Saponinas)

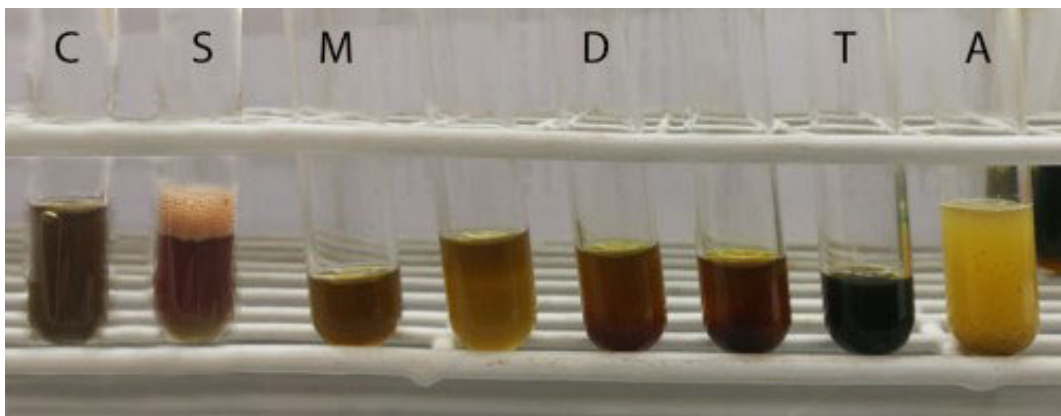
En un tubo de ensayo se colocó 0,5 mL del extracto. Se añadió 1 mL de agua destilada y se agitó vigorosamente, Se observó la presencia de espuma persistente, la persistencia en minutos de la espuma se clasifica en: 5 – 20 min. (+), 20 – 25 min. (++) , 30 – Más (+++).





Leyenda: Control (C), Shinoda (S), Mayer (M), Dragendorff (D), Tricloruro férrico (T), Afrosimétrica (A)

**Figura 10. Ensayo fitoquímico preliminar de *Phyllanthus niruri***



Leyenda: Control (C), Shinoda (S), Mayer (M), Dragendorff (D), Tricloruro férrico (T), Afrosimétrica (A)

**Figura 11. Ensayo fitoquímico preliminar de *Minthostachys mollis***

## **V.- Resultados**

### **5.1.- Descripción botánica de las plantas**

#### **5.1.1.- *Phyllanthus niruri* Linn**

Nombres comunes: “chanca piedra”, “quiebra piedra”, “dormilona”

Es una planta de porte herbáceo de 20 - 50 cm de alto con crecimiento monopódico. Tiene una ramificación alterna y no presenta pubescencia en toda la planta.

Las hojas son simples, alternas y oblongas, tienen margen entero, el ápice es redondeado, la base es aguda y presenta estípulas; pinnatinervias y débiles. Las hojas tienen pequeñas puntuaciones de color negro en las zonas donde se encuentran las flores y frutos.

La inflorescencia es axilar y tiene flores pequeñas de coloración blanquecina. El cáliz es regular con 5 sépalos de coloración verde con bordes blanquecinos. El gineceo es sincárpico y tricarpelar.

El fruto es en forma de cápsula de color verde que contiene semillas con líneas dorsales longitudinales. (Anexo 1: Fig. 27)

#### **5.1.2.- *Minthostachys mollis* Griseb.**

Nombres comunes: “muña”, “coa”, “huaycha”, “coz”, “muña-muña”, “arash muña”

Es una planta de porte arbustivo ligeramente leñosa con crecimiento monopódico. El tallo es cuadrangular, presenta ramificación opuesta. y la disposición de las hojas son decusadas; presenta pubescencia en toda la planta y es aromático.

Las hojas son simples y opuestas, de forma elíptica con margen entero o ligeramente aserrado, el ápice es acuminado, la base es aguda y carece de



estípulas. También presenta pubescencia en el envés de la hoja y peciolo. Las nervaduras son pinnadas.

La inflorescencia es compuesta de forma verticilastro con flores amarillas. El cáliz es actinomorfo y pentámero con pubescencia externa de color verde. La corola es gamopétala labiada. El androceo está formado por 4 estambres que están soldados a la corola. El gineceo es sincárpico bicarpelar, tiene ovario súpero. (Anexo 1: Fig. 28)

### **5.2.- Obtención del extracto etanólico**

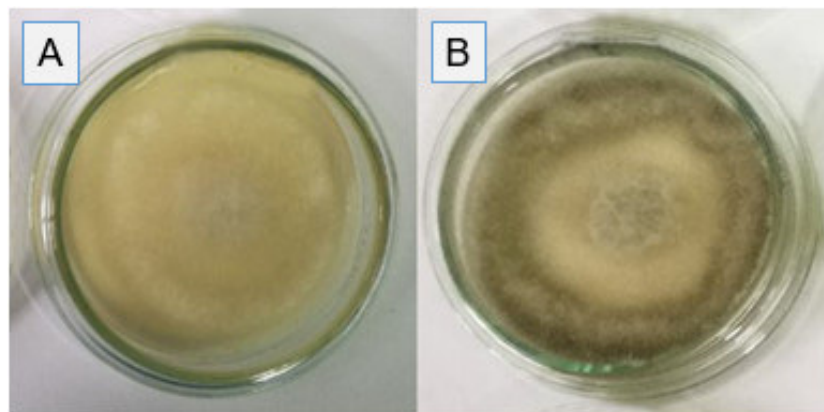
Para esta etapa se utilizaron 60,8 g de *Phyllanthus niruri* y 56,6 g *Minthostachys mollis* de hojas pulverizadas y se le agregó 760 mL y 707,5 mL de etanol al 95° respectivamente. Luego estos extractos fueron concentrados, filtrados y esterilizados obteniendo 265 mL y 130 mL del extracto de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis* respectivamente.

### **5.3.- Cultivo *in vitro* del hongo *Botrytis cinerea***

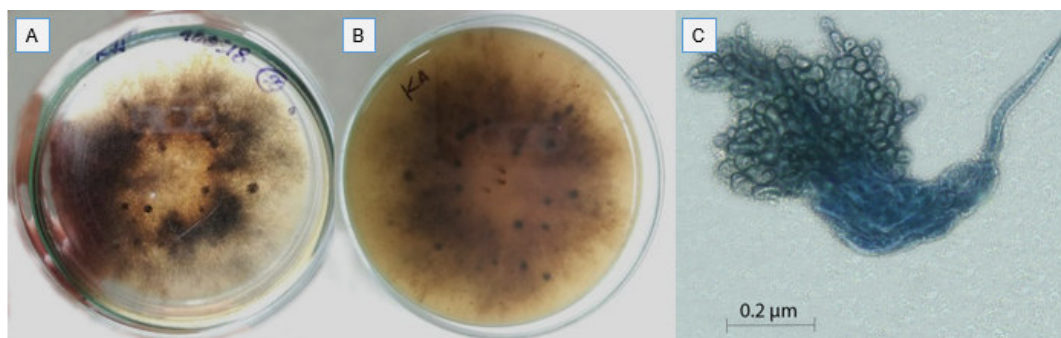
Las características fisiológicas y culturales de *Botrytis cinerea* depende del organismo de donde ha sido aislado. Inicialmente *B. cinerea* se aisló de raíces de lechuga y se observó que dentro de los 30 días su viabilidad se había perdido; sin embargo, cuando fue aislado de aguaymanto se obtuvo cepas activas. Las características observadas en medio APD al cuarto día presentaban una coloración blanquecina y al quinto día empezaba a tornarse grisáceo debido a la formación de sus conidios (Fig. 12). También se observó que aproximadamente a los 30 días de sembrado, *Botrytis cinerea* formaba pequeños esclerocios de color negruzco. (Fig. 13)

El hongo se sembró en diferentes medios de cultivo (sabouraud, malta y agar con diferentes harinas como kiwicha, kañihua y coca) para determinar en qué medio

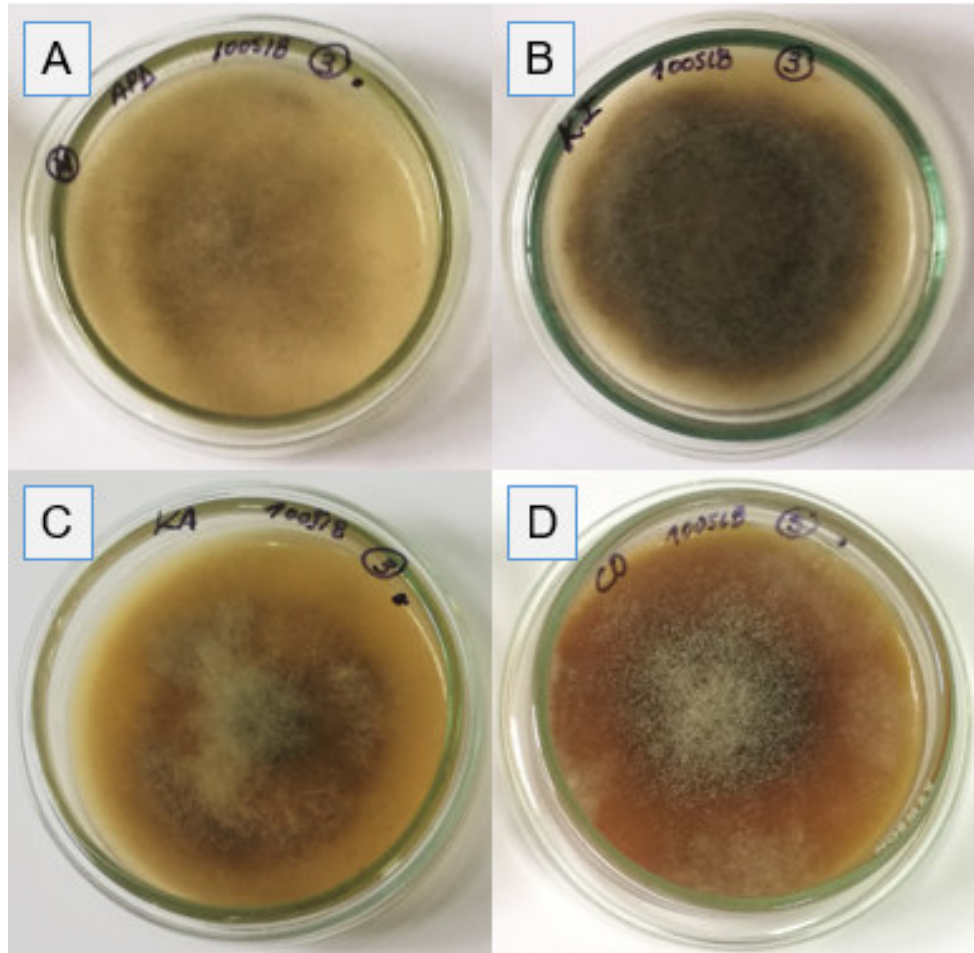
se desarrollaba mejor. Se observó que en el medio sabouraud, *B. cinerea* no desarrollaba mucho micelio, sino que el hongo formaba una especie de lámina pegada al medio que iba de una coloración blanca a gris o negruzca dependiendo del tiempo de desarrollo. El hongo en medio malta desarrollaba un crecimiento micelial medio teniendo un color blanquecino con presencia de algunos parches grisáceos-negruzcos. En el medio con harina de kiwicha se observó que *B. cinerea* desarrollaba más rápido sus estructuras reproductivas ocasionando que la placa se encuentre más gris-negruzca en menos tiempo. En el medio con harina de kañihua se observó que este hongo tenía poco desarrollo micelial tornándose grisáceo con bordes más oscuros. En el medio con harina de coca se observó que *B. cinerea* presentaba un crecimiento micelial blanquecino teniendo una tonalidad verduzca en el centro (Fig. 14).



**Figura 12. *Botrytis cinerea* en APD. A) Dos días de crecimiento. B) Siete días de crecimiento**



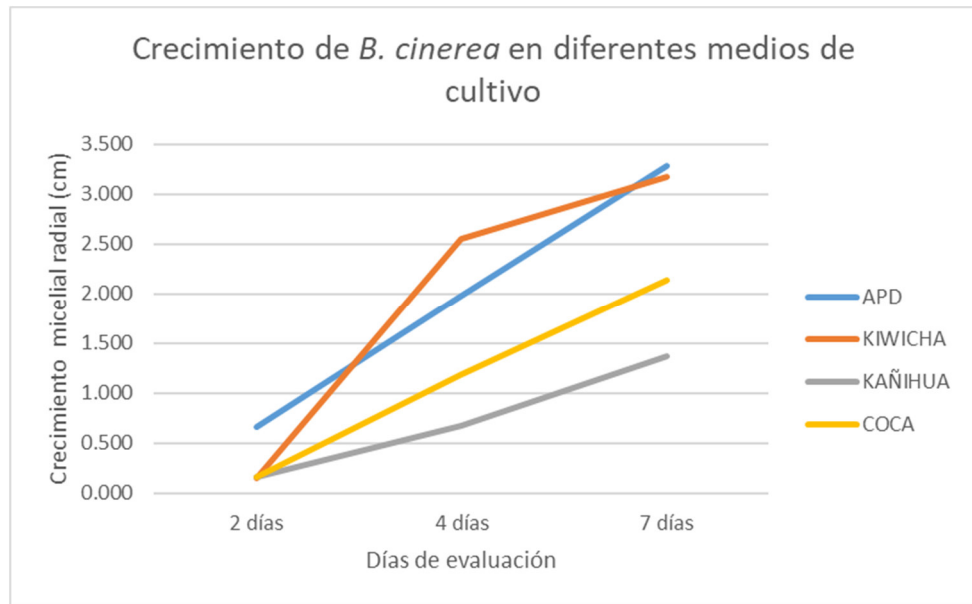
**Figura 13. Esclerocios de *Botrytis cinerea*. A) Vista frontal B) Vista posterior C) Observación a microscopio (400X)**



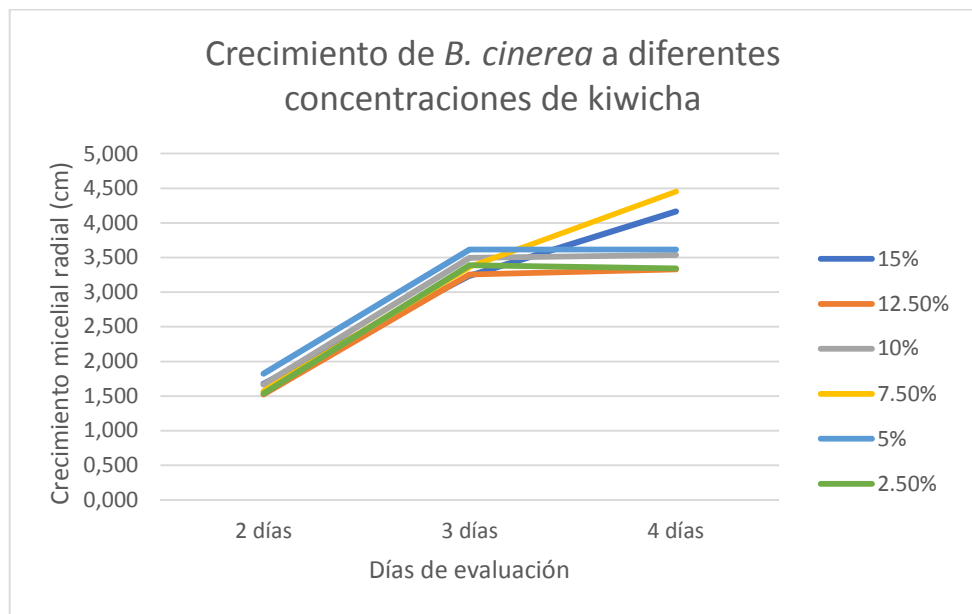
**Figura 14. *Botrytis cinerea* en diferentes medios de cultivo a los siete días de crecimiento. A) APD B) Kiwicha C) Kañihua D) Coca**

Luego se realizó una prueba piloto para saber cómo se desarrollaba *Botrytis cinerea* en los medios de APD, harina de kiwicha, harina de kañihua y harina de coca, se evaluó a los 2, 4 y 7 días de sembrado obteniendo que *B. cinerea* tiene un mejor desarrollo en los medios de APD y kiwicha. (Fig. 15)

Finalmente se realizó otra prueba para determinar a qué concentración (v/v) de harina de kiwicha (15; 12,5; 10; 7,5; 5 y 2,5%), *B. cinerea* tiene un mejor crecimiento. Se evaluó a los 2, 3 y 4 días de sembrado (Fig. 16), obteniendo que a la concentración de 7,5% el hongo tenía un mayor crecimiento y desarrollaba más conidios.



**Figura 15. Crecimiento de *Botrytis cinerea* en los medios de APD, kiwicha, kañihua y coca**



**Figura 16. Crecimiento de *Botrytis cinerea* a diferentes concentraciones en el medio de harina de kiwicha**

#### 5.4.- Evaluación del efecto de los extractos etanólicos contra *Botrytis cinerea*

La evaluación del efecto de los extractos de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis* frente a *Botrytis cinerea* se realizó en el medio de APD y harina de kiwicha a la concentración (v/v) de 7.5% durante seis días siendo la primera evaluación a los dos días de sembrado.

#### **5.4.1.- Crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* a las concentraciones de 2.5%, 1% y 0% en cm**

Los datos obtenidos fueron promediados de cuatro repeticiones para cada prueba (Anexo 2: Tabla 9 y Tabla 10) y luego para cada concentración en los dos medios de cultivo (APD y kiwicha) con los respectivos extractos etanólicos. (Tabla 1)

Se observa que el extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* no permite el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* en ambos medios de cultivo a la concentración de 5%. Además, en medio de kiwicha hay un mayor desarrollo de conidios que en medio APD. También se observó que *B. cinerea* empieza a tener coloración grisácea al cuarto y quinto día en medio de kiwicha y APD respectivamente. (Fig. 17, Fig. 19 y Fig. 20)

El extracto etanólico de *Minthostachys mollis* no permite el crecimiento de *B. cinerea* en medio APD y kiwicha a la concentración de 5% y 7.5% respectivamente. Además *B. cinerea* no creció a la concentración de 5% el primer día de evaluación. También se observó que el hongo al tercer y cuarto día empezó a tener una coloración grisácea en los medios de kiwicha y APD respectivamente. Por último, en ambos medios se observó una pigmentación anaranjada alrededor del hongo acentuándose en la concentración de 5% en el medio de kiwicha. (Fig. 18, Fig. 21 y Fig. 22)

Tabla 1. Promedio del crecimiento micelial en cm de *Botrytis cinerea* frente a los extractos etanólicos (*Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis*) a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10%

Extracto	Medio	Concentración	Promedio crecimiento micelial (cm)					
			2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
<i>Phyllanthus niruri</i>	APD	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	0.781	0.954	1.006	1.045	1.106	1.170
		1%	0.914	3.062	3.873	4.085	4.783	5.253
	0%	3.178	5.021	5.300	5.300	5.300	5.300	
	KIWICHA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	0.726	0.990	1.232	1.252	1.267	1.544
1%		2.028	3.232	4.205	4.222	4.231	4.511	
0%	2.922	4.871	5.300	5.300	5.300	5.300		
<i>Minthostachys mollis</i>	APD	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	0.845	1.175	1.542	1.980	2.332	2.629
		1%	1.293	2.057	2.912	3.456	3.937	4.418
	0%	2.603	4.273	4.909	5.193	5.275	5.300	
	KIWICHA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.572	0.764	0.848	1.008	1.168
		2.5%	1.167	2.189	2.945	3.418	3.580	3.743
1%		1.974	3.347	4.607	5.269	5.300	5.300	
0%	2.536	4.402	5.144	5.300	5.300	5.300		

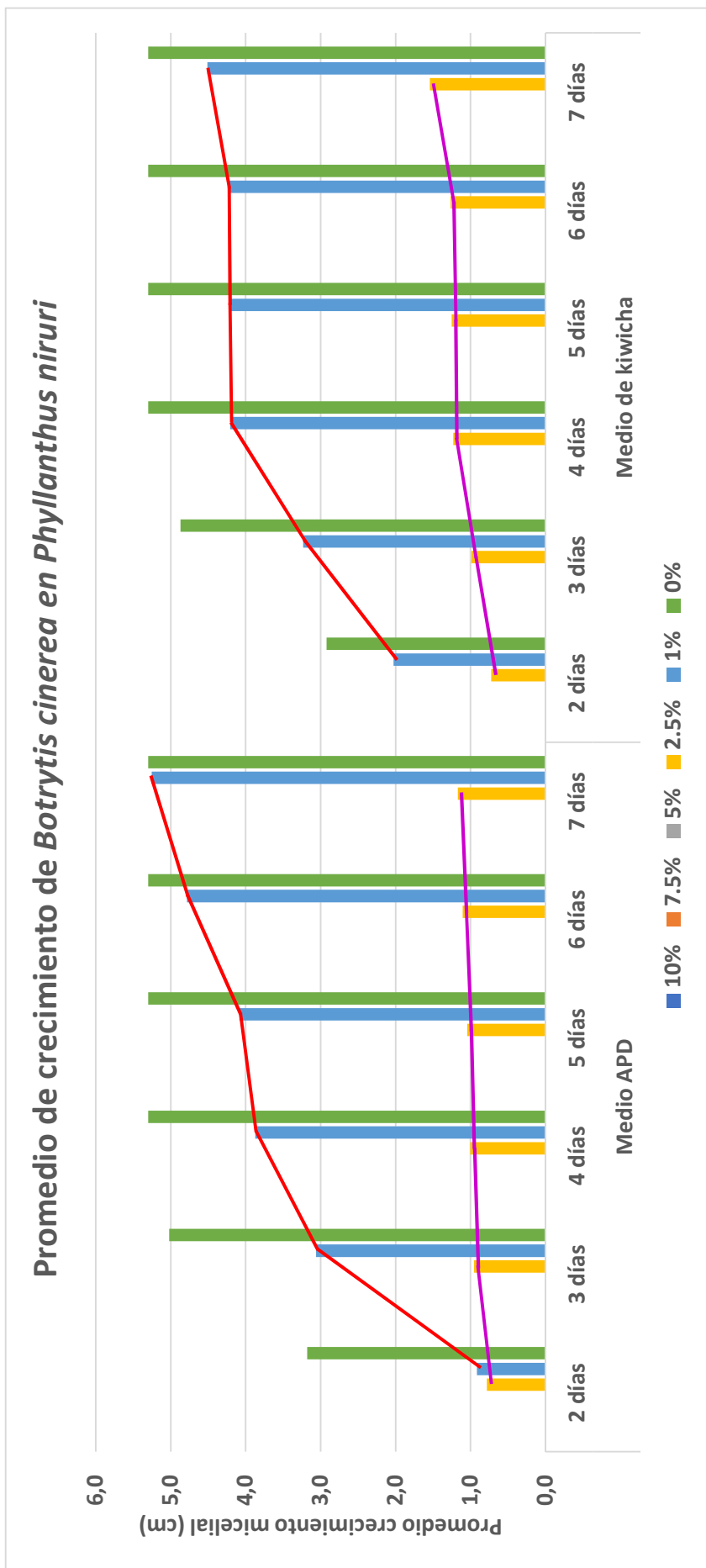
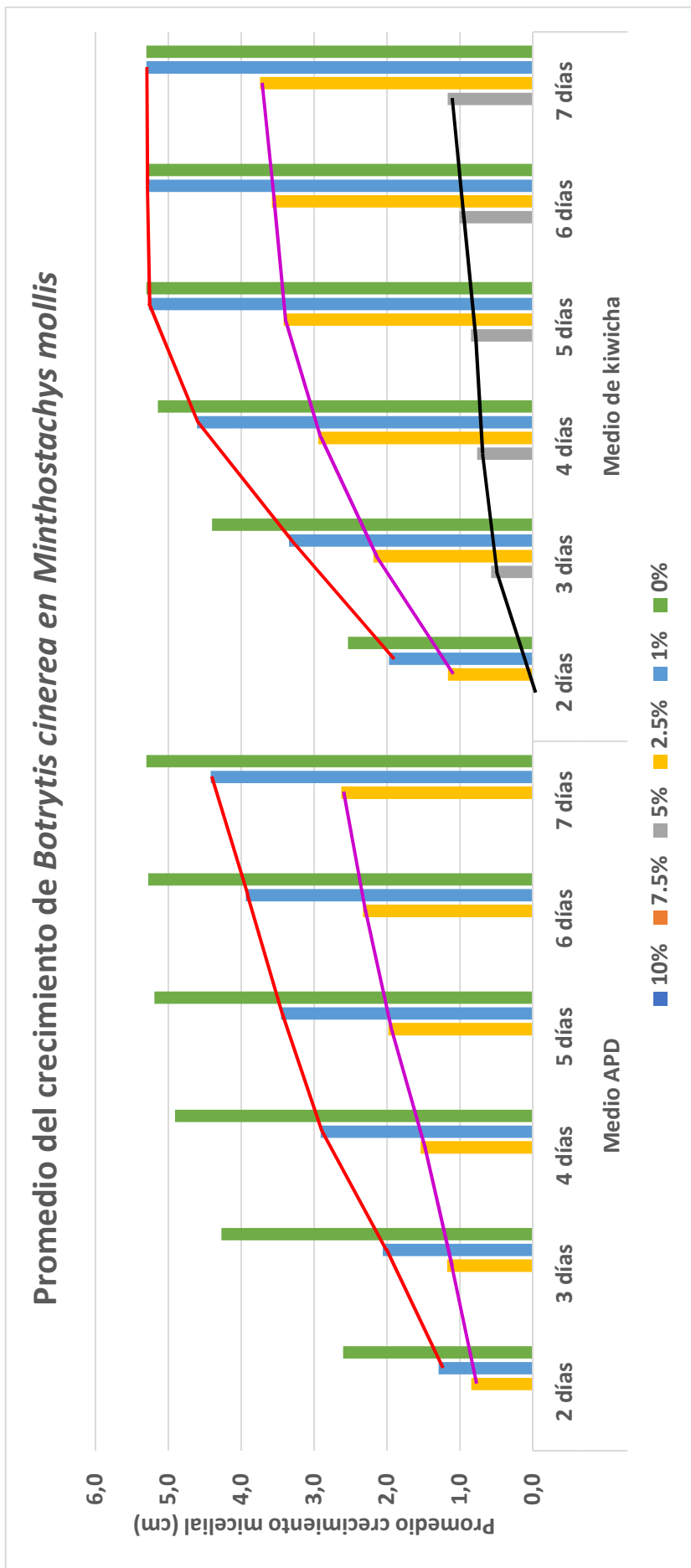


Figura 17. Promedio de crecimiento de *Botrytis cinerea* en el extracto de *Phyllanthus niruri* a las concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0% en los medios de APD y kiwicha



**Figura 18. Promedio de crecimiento de *Botrytis cinerea* en el extracto de *Minthostachys mollis* a las concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0% en los medios de APD y kiwicha**



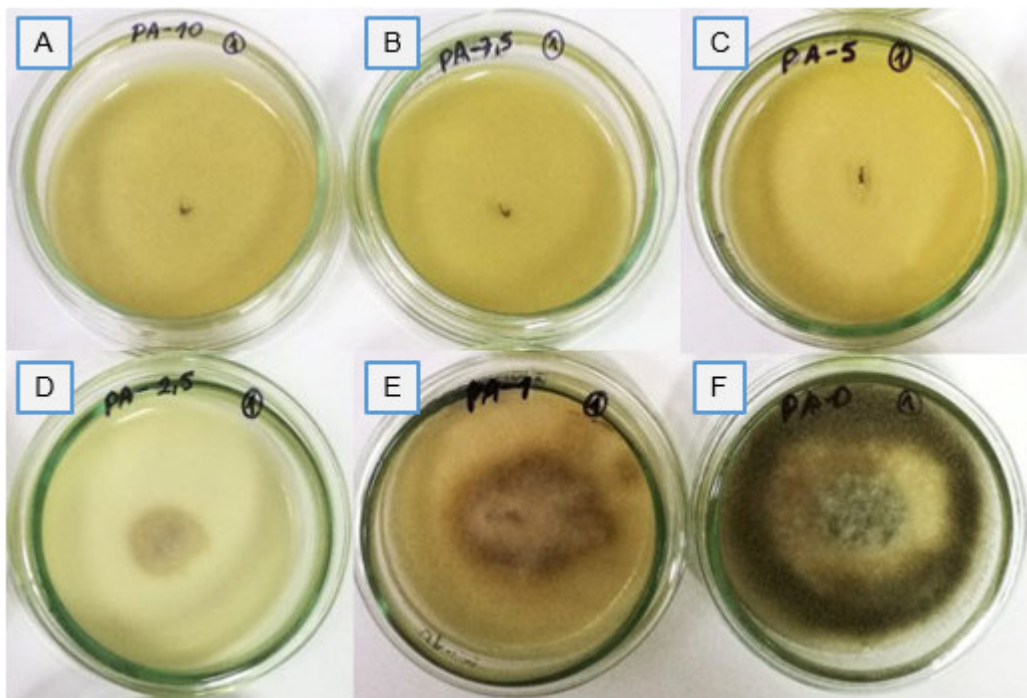


Figura 19. Desarrollo de *Botrytis cinerea* a diferentes concentraciones de *Phyllanthus niruri* en medio APD al séptimo día de crecimiento.  
A)10% B) 7.5% C) 5% D) 2,5% E) 1% F) 0% (control)

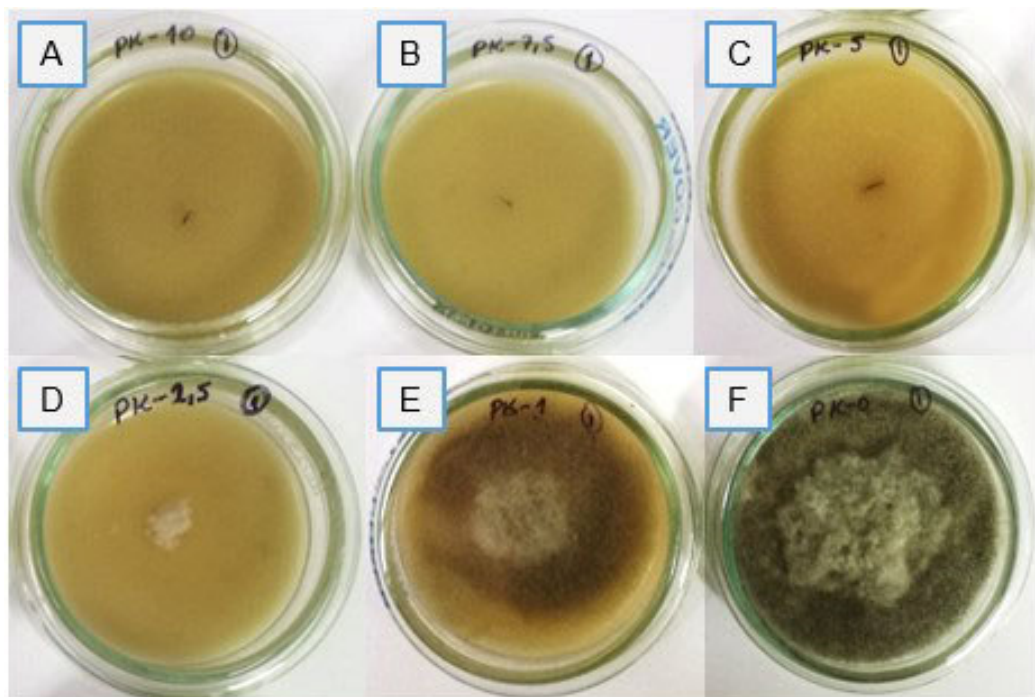


Figura 20. Desarrollo de *Botrytis cinerea* a diferentes concentraciones de *Phyllanthus niruri* en medio de kiwicha al séptimo día de crecimiento.  
A)10% B) 7.5% C) 5% D) 2,5% E) 1% F) 0% (control)

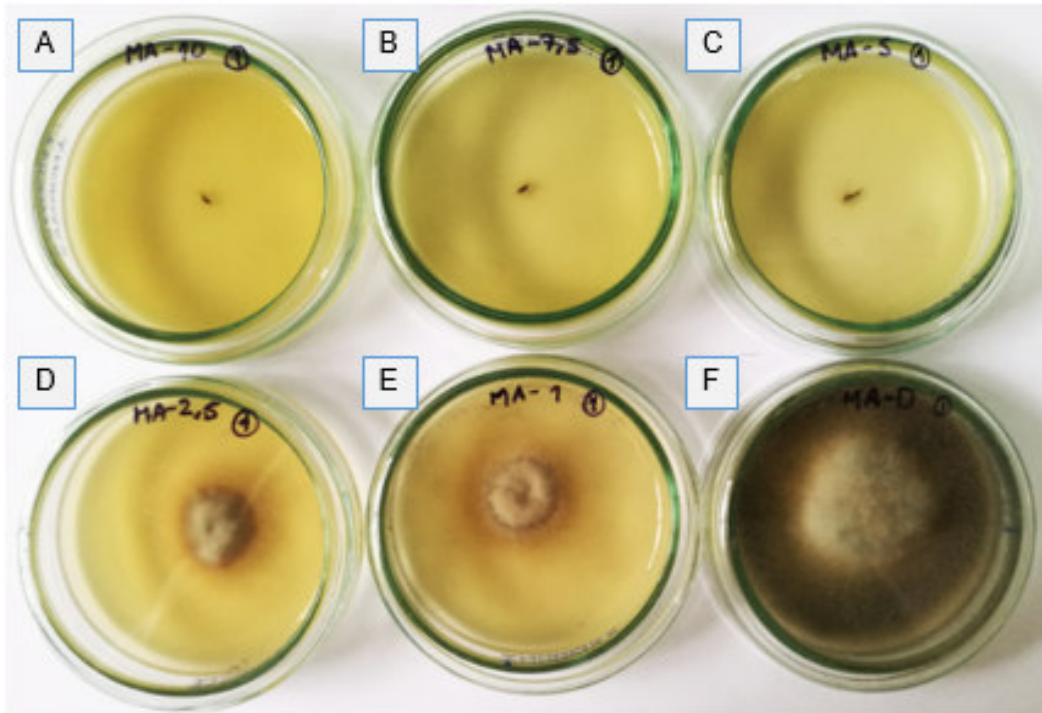


Figura 21. Desarrollo de *Botrytis cinerea* a diferentes concentraciones de *Minthostachys mollis* en medio APD al séptimo día de crecimiento.  
 A)10% B) 7.5% C) 5% D) 2,5% E) 1% F) 0% (control)

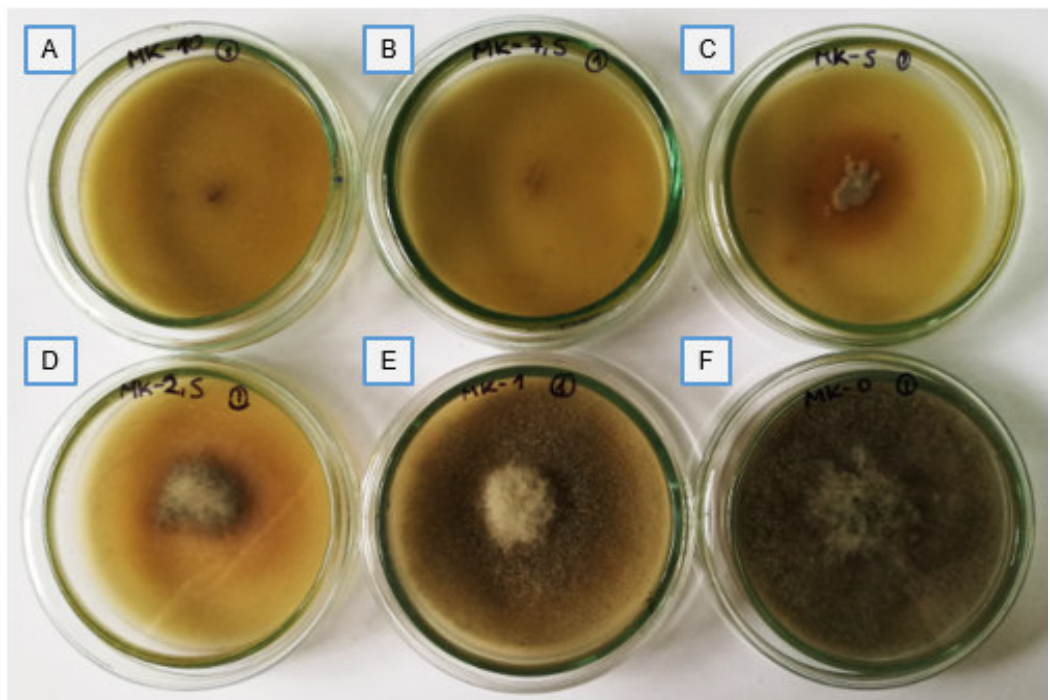


Figura 22. Desarrollo de *Botrytis cinerea* a diferentes concentraciones de *Minthostachys mollis* en medio de kiwicha al séptimo día de crecimiento.  
 A)10% B) 7.5% C) 5% D) 2,5% E) 1% F) 0% (control)

#### **5.4.2.- Crecimiento de *Botrytis cinerea* (en porcentajes) frente a los extractos etanólicos**

Los datos obtenidos fueron promediados de cuatro repeticiones para cada prueba (Anexo 3: Tabla 11 y Tabla 12) y luego para cada concentración en los dos medios de cultivo (APD y kiwicha) con los respectivos extractos etanólicos. (Tabla 2)

Se observa que el porcentaje de crecimiento del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* es 0% a las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% durante los siete días de evaluación. En la concentración de 2.5% se observa el menor porcentaje de crecimiento en medio kiwicha y APD al tercer y cuarto día de sembrado respectivamente.

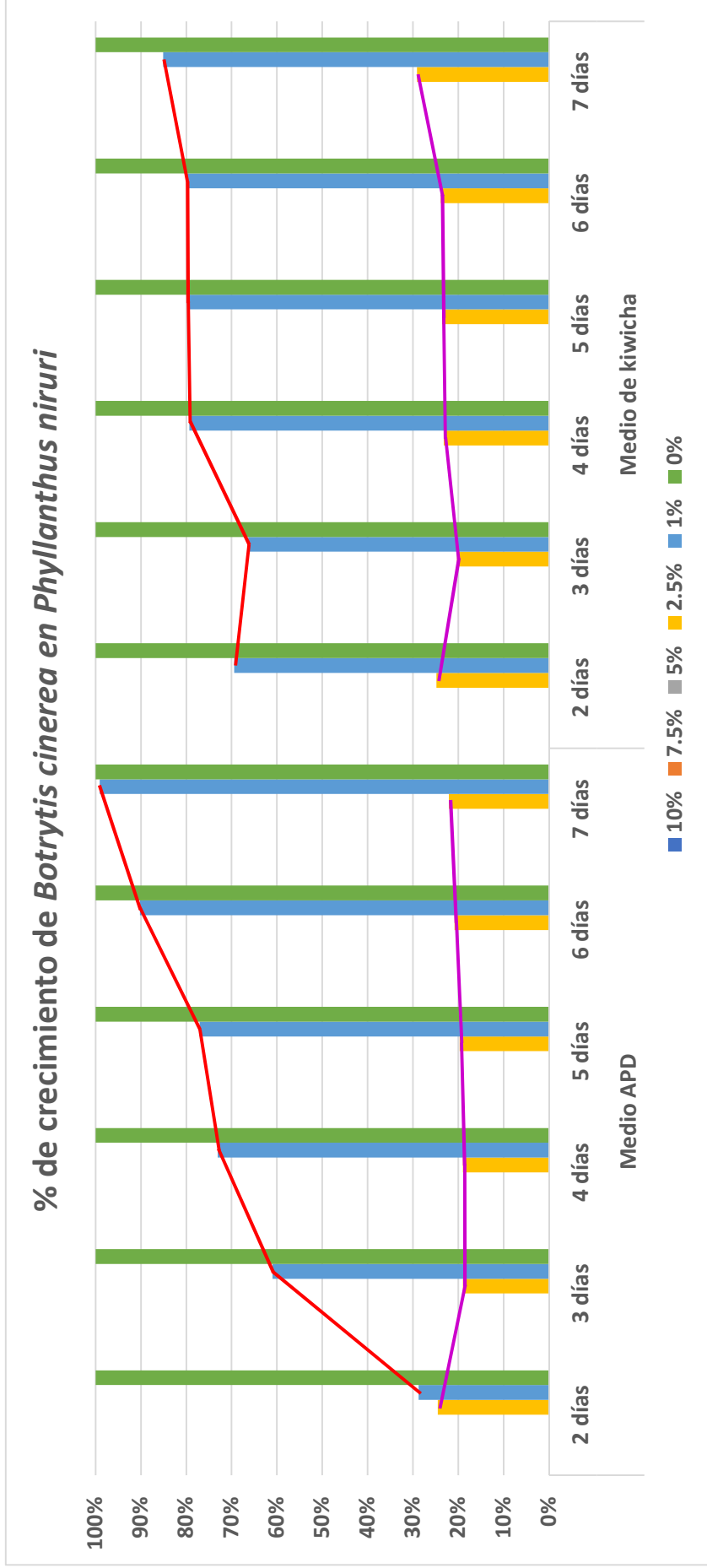
En medio APD a la concentración de 1% del extracto de *P. niruri* se observa que el porcentaje de crecimiento va aumentando progresivamente durante los siete días, alcanzando al sétimo día el 99% de crecimiento. En cambio, en medio kiwicha el porcentaje de crecimiento máximo es de 85% al sétimo día. (Fig. 23)

En el caso del extracto etanólico de *Minthostachys mollis* se observa que el porcentaje de crecimiento es 0% en las concentraciones de 10% y 7.5% durante los siete días. En la concentración de 5% se observa que en medio APD no hay crecimiento, pero en medio de kiwicha sí hay crecimiento alcanzando un máximo de 22% al sétimo día. En la concentración de 2.5% se observa que el porcentaje de crecimiento en medio APD al tercer día disminuye ligeramente hasta 27% y luego va aumentando progresivamente hasta 50% al sétimo día. En cambio, en medio de kiwicha se observa que hay un aumento progresivo desde 46% el segundo día hasta 71% el sétimo día. En la concentración de 1% se observa que el segundo día el porcentaje de crecimiento es 50% y 79% en medio APD y kiwicha respectivamente disminuyendo ligeramente el segundo día de evaluación. El

porcentaje de crecimiento al sétimo día es 83% y 100% en medio APD y kiwicha respectivamente. (Fig. 24)

Tabla 2. Promedio del porcentaje de crecimiento de *Botrytis cinerea* frente a los extractos etanólicos (*Phyllanthus niruri* y *Mintostachys mollis*) a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10%

Extracto	Medio	Concentración	% Crecimiento					
			2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
<i>Phyllanthus niruri</i>	APD	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	24.564	19.006	18.981	19.724	20.869	22.083
		1%	28.745	60.991	73.077	77.072	90.238	99.112
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	KIWICHA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	24.856	20.321	23.244	23.613	23.913	29.129
		1%	69.408	66.348	79.347	79.655	79.830	85.116
0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000		
<i>Mintostachys mollis</i>	APD	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	32.473	27.496	31.409	38.128	44.217	49.603
		1%	49.649	48.139	59.326	66.553	74.634	83.351
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	KIWICHA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	12.992	14.861	16.000	19.015	22.030
		2.5%	46.024	49.728	57.241	64.483	67.553	70.623
		1%	77.850	76.038	89.549	99.408	100.000	100.000
0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000		



**Figura 23. Porcentaje de crecimiento de *Botrytis cinerea* en el extracto de *Phyllanthus niruri* a las concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0% en los medios de APD y kiwicha**

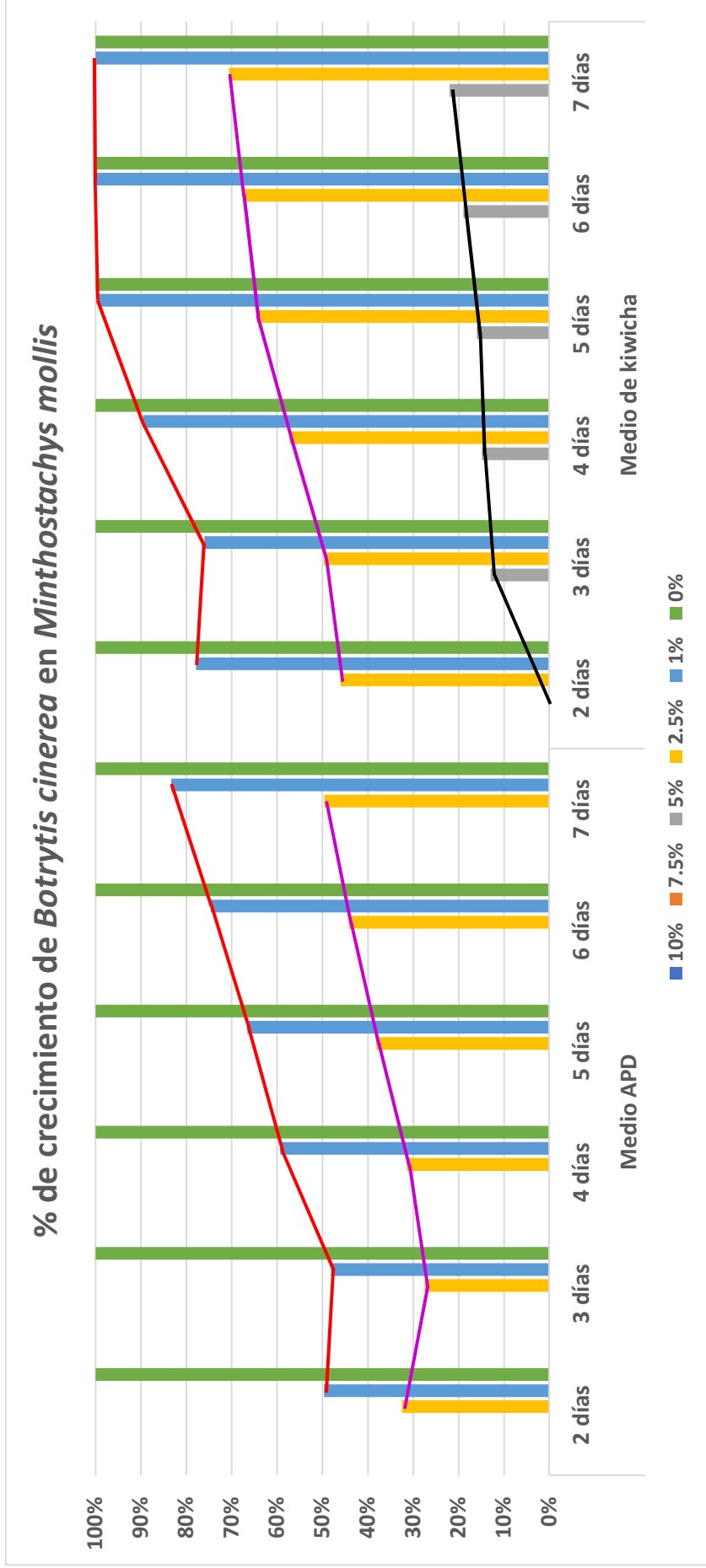


Figura 24.. Porcentaje de crecimiento de *Botrytis cinerea* en el extracto de *Minthostachys mollis* a las concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0% en los medios de APD y kiwicha

#### **5.4.3.- Porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* frente a los extractos etanólicos**

Los datos obtenidos fueron promediados de cuatro repeticiones para cada prueba (Anexo 4: Tabla 13 y Tabla 14) y luego para cada concentración en los dos medios de cultivo (APD y kiwicha) con los respectivos extractos etanólicos. (Tabla 3)

Se observa que el porcentaje de inhibición del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* es 100% en las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% durante los siete días. En la concentración de 2.5% se observa que el porcentaje de inhibición aumenta ligeramente al tercer día (81% en APD y 80% en medio de kiwicha), luego va disminuyendo progresivamente hasta 78% y 71% en medio APD y kiwicha respectivamente.

En medio APD a la concentración de 1% del extracto de *P. niruri* se observa que el porcentaje de inhibición va disminuyendo progresivamente desde 71% hasta 1% durante los siete días. En cambio, en medio kiwicha el porcentaje de inhibición aumenta ligeramente al tercer día (34%) y luego va disminuyendo hasta 15% al sétimo día. (Fig. 25)

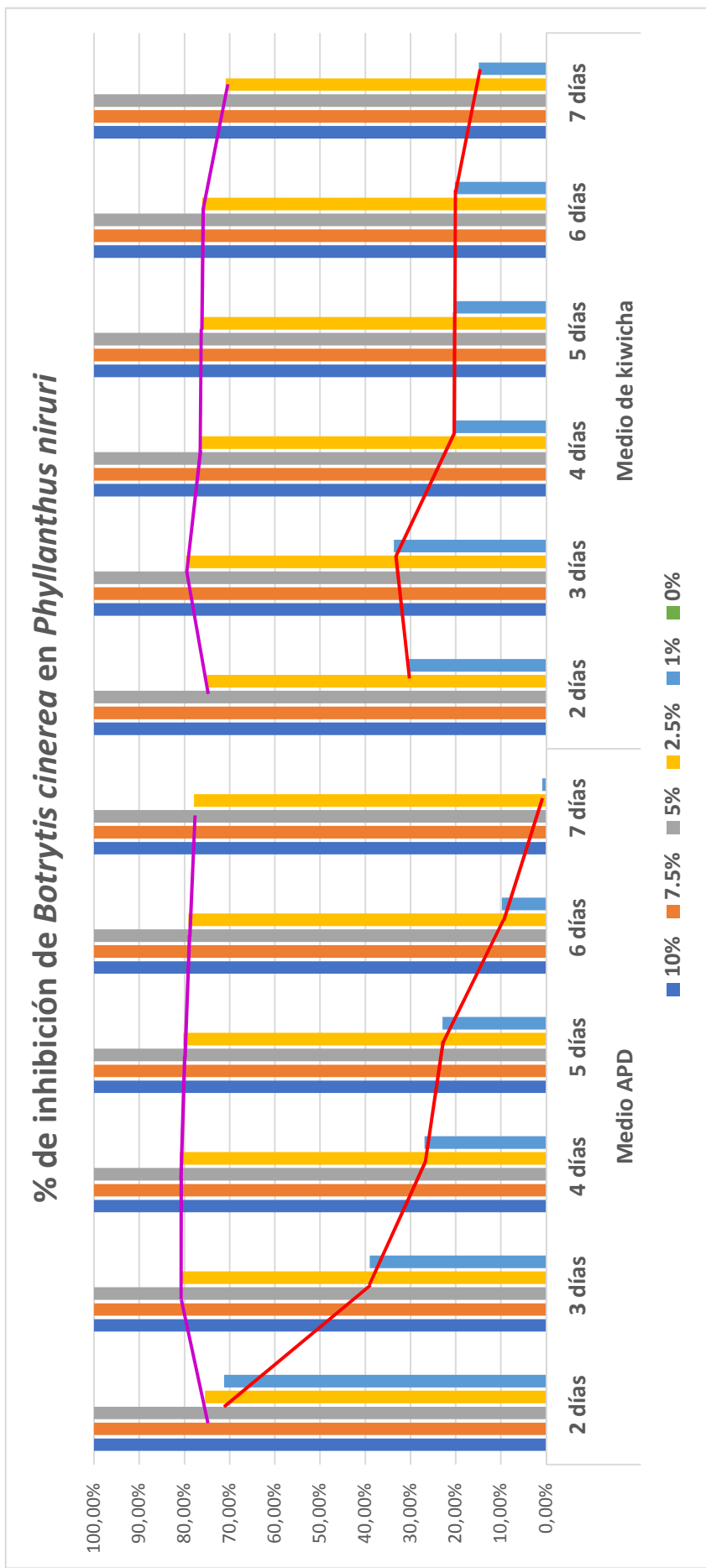
En el caso del extracto etanólico de *Minthostachys mollis* se observa que el porcentaje de inhibición es 100% en las concentraciones de 10% y 7.5% durante los siete días. En la concentración de 5% se observa que en medio APD no hay inhibición, pero en medio de kiwicha hay inhibición al 100% en el segundo día y va disminuyendo hasta 78% al sétimo día. En la concentración de 2.5% se observa que el porcentaje de inhibición aumenta ligeramente al cuarto día (68% en APD y 54% en medio de kiwicha), luego va disminuyendo progresivamente hasta 50% y 29% en medio APD y kiwicha respectivamente. En la concentración de 1% se observa que el porcentaje de inhibición al segundo día es 50% y 22% en medio APD y kiwicha respectivamente, teniendo un ligero aumento en el tercer día. El

último día de evaluación, el porcentaje de inhibición fue 17% y 0% en medio APD y kiwicha respectivamente. (Fig. 26)

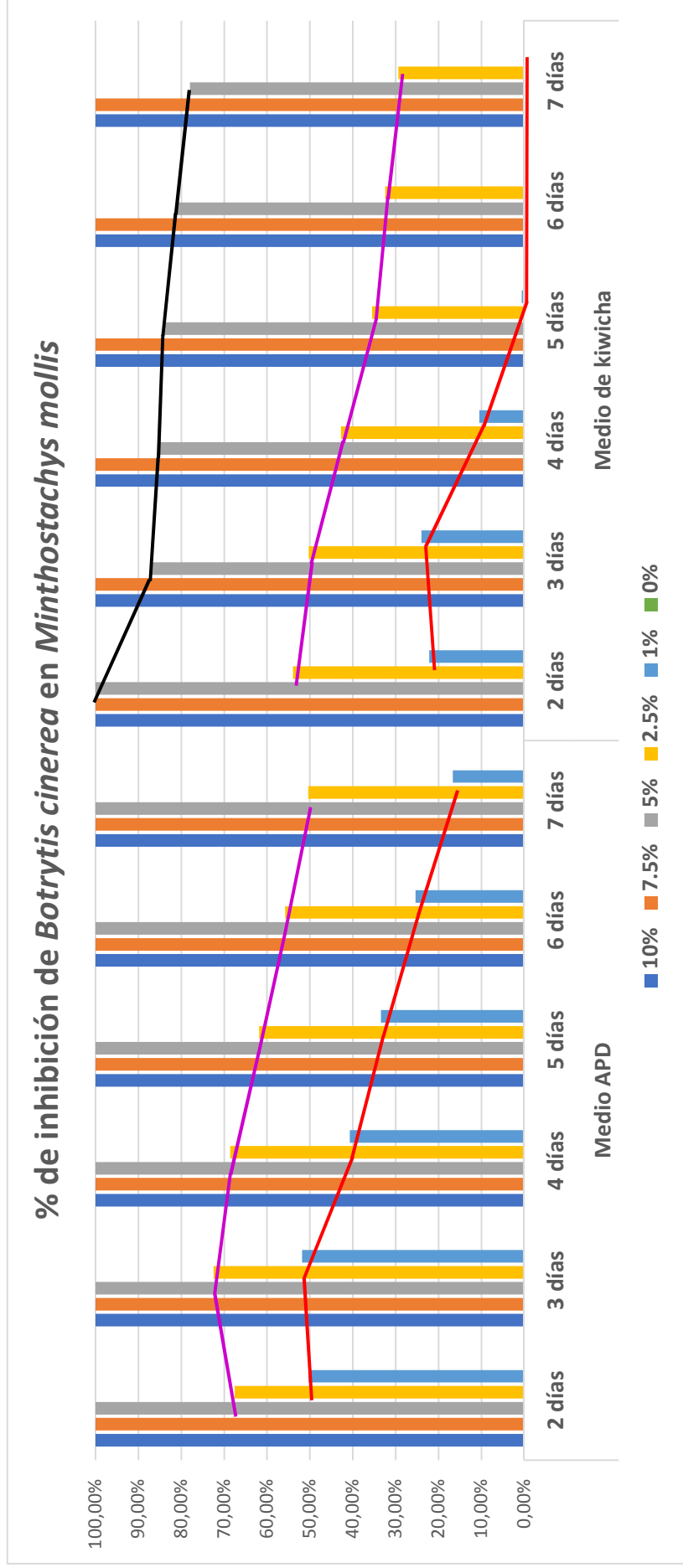
Tabla 3. Promedio del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* frente a los extractos etanólicos (*Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis*) a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10%

Extracto	Medio	Concentración	% Inhibición					
			2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
PN	APD	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	75.436	80.994	81.019	80.276	79.131	77.917
		1%	71.255	39.009	26.923	22.928	9.762	0.888
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	KIWICHA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	75.144	79.679	76.756	76.387	76.087	70.871
		1%	30.592	33.652	20.653	20.345	20.170	14.884
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
MM	APD	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	67.527	72.504	68.591	61.872	55.783	50.397
		1%	50.351	51.861	40.674	33.447	25.366	16.649
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	KIWICHA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	87.008	85.139	84.000	80.985	77.970
		2.5%	53.976	50.272	42.759	35.517	32.447	29.377
		1%	22.150	23.962	10.451	0.592	0.000	0.000
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000





**Figura 25. Porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* en el extracto de *Phyllanthus niruri* a las concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0% en los medios de APD y kiwicha**



**Figura 26. Porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* en el extracto de *Minthostachys mollis* a las concentraciones de 10%, 7.5%, 5%, 2.5%, 1% y 0% en los medios de APD y kiwicha**

#### 5.4.4.- Análisis de varianza (ANOVA) y prueba de comparaciones múltiples de Tukey

El análisis de ANOVA para el crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* se realizó al sétimo día para cada planta independientemente.

Para el extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* se observa que el análisis de ANOVA para ambos medios es menor a 0.05, lo cual indica que la media de las diferentes concentraciones del extracto con respecto al crecimiento micelial son diferentes. (Tabla 4)

La prueba Tukey en medio APD indica la formación de tres grupos, el cual demuestra que no existe una diferencia significativa entre las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% debido a que no hay crecimiento. Asimismo, las concentraciones de 1% y 0% tampoco tienen una diferencia significativa. (Anexo 5: Tabla 15)

En cambio, para el medio de kiwicha se observa que se forman dos grupos, donde no hay diferencias significativas en las concentraciones de 1% y 0%; asimismo, al no evidenciarse el crecimiento de *B. cinerea* en las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% no hay diferencias significativas entre ellas. (Anexo 5: Tabla 16)

Tabla 4. Análisis ANOVA del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri*

**ANOVA de un factor**

Crecimiento micelial de *B. cinerea*

Medio		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
APD	Inter-grupos	102,443	5	20,489	6608,028	,000
	Intra-grupos	,037	12	,003		
	Total	102,480	17			
Kiwicha	Inter-grupos	88,001	5	17,600	29,094	,000
	Intra-grupos	7,259	12	,605		
	Total	95,261	17			

Para el extracto etanólico de *Minthostachys mollis* se observa que el análisis de ANOVA para ambos medios es menor a 0.05, el cual indica que la media de las diferentes concentraciones del extracto con respecto al crecimiento micelial son diferentes. (Tabla 5)

La prueba Tukey en medio APD indica la formación de cuatro grupos, el cual demuestra que no hay una diferencia significativa en las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% esto se debe a la ausencia del crecimiento de *B. cinerea*. Con respecto a las otras concentraciones, se observa que el crecimiento micelial de *B. cinerea* presenta diferencias significativas entre sí. (Anexo 5: Tabla 17)

En cambio, para el medio de kiwicha se observa la formación de tres grupos, en los cuales no existe diferencias significativas en las concentraciones de 1% y 0%; asimismo, al no evidenciarse el crecimiento de *B. cinerea* en las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% no hay diferencias significativas entre ellas. (Anexo 5: Tabla 18)

Tabla 5. Análisis ANOVA del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* a las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Minthostachys mollis*.

**ANOVA de un factor**

Crecimiento micelial a los 7 días

Medio		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
APD	Inter-grupos	87,327	5	17,465	3340,617	,000
	Intra-grupos	,063	12	,005		
	Total	87,390	17			
Kiwicha	Inter-grupos	98,058	5	19,612	210,624	,000
	Intra-grupos	1,117	12	,093		
	Total	99,175	17			

El análisis de ANOVA para el porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* se realizó al sétimo día para cada planta independientemente.

Para el extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* se observa que el análisis de ANOVA para ambos medios es menor a 0.05, lo cual indica que la media de las diferentes concentraciones del extracto con respecto al crecimiento micelial son diferentes. (Tabla 6)

La prueba Tukey en medio APD indica la formación de tres grupos, el cual demuestra que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% debido a que el porcentaje de inhibiciones 100%. También se observa que en las concentraciones de 1% y 0% tampoco existe diferencia significativa. (Anexo 5: Tabla 19)

En el medio de kiwicha se observa que se forman dos grupos donde no hay diferencias significativas entre las concentraciones de 10%, 7.5%, 5% y 2.5%. Asimismo, tampoco existe diferencias significativas en las concentraciones de 1% y 0%. (Anexo 5: Tabla 20)

Tabla 6. Análisis ANOVA del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* en las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Phyllanthus niruri*

**ANOVA de un factor**

Porcentaje de inhibición a los 7 días

Medio		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
APD	Inter-grupos	36469,082	5	7293,816	6620,147	,000
	Intra-grupos	13,221	12	1,102		
	Total	36482,303	17			
Kiwicha	Inter-grupos	31329,137	5	6265,827	29,102	,000
	Intra-grupos	2583,702	12	215,309		
	Total	33912,840	17			

Para el extracto etanólico de *Minthostachys mollis* se observa que el análisis de ANOVA para ambos medios es menor a 0.05, el cual indica que la media de las diferentes concentraciones del extracto con respecto al crecimiento micelial son diferentes. (Tabla 7)

La prueba Tukey en medio APD indica la formación de cuatros grupos, el cual demuestra que no hay diferencia significativa entre las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% porque el porcentaje de inhibición es 100%. Con respecto a las otras concentraciones (2.5%, 1% y 0%), se observa que el porcentaje de inhibición de *B. cinerea* tiene diferencias significativas entre sí. (Anexo 5: Tabla 21)

En el medio de kiwicha se observa que se forman tres grupos donde no existe diferencias significativas entre las concentraciones de 10%, 7.5% y 5%. Asimismo, tampoco hay diferencias significativas en las concentraciones de 1% y 0%. (Anexo 5: Tabla 22)

Tabla 7. Análisis ANOVA del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* en las diferentes concentraciones del extracto etanólico de *Minthostachys mollis*

**ANOVA de un factor**

Porcentaje de inhibición a los 7 días

Medio		Suma de cuadrados	gl	Media cuadrática	F	Sig.
APD	Inter-grupos	31089,690	5	6217,938	3336,570	,000
	Intra-grupos	22,363	12	1,864		
	Total	31112,053	17			
Kiwicha	Inter-grupos	34909,116	5	6981,823	210,646	,000
	Intra-grupos	397,738	12	33,145		
	Total	35306,854	17			

### 5.5.- Ensayo fitoquímico de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis*

Esta prueba reveló la presencia de compuestos fenólicos, alcaloides y saponinas para el extracto de *Phyllanthus niruri* y la presencia de compuestos fenólicos, flavonoides y alcaloides para el extracto de *Minthostachys mollis*. (Tabla 8 y Anexo 6: Tabla 23)

Tabla 8. Resultados del screening fitoquímico de los extractos etanólicos de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis*

Prueba	Metabolitos	Extracto de <i>Phyllanthus niruri</i>	Extracto de <i>Minthostachys mollis</i>
Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos	+++	+++
Shinoda	Flavonoides	-	+++
Dragendorff	Alcaloides	+++	+++
Mayer	Alcaloides	+++	+++
Afrosimétrica	Saponinas	++	-

Leyenda: Negativo (-), leve (+), moderado (++) , abundante (+++).

## VI.- Discusión

Se determinó las condiciones *in vitro* de *Botrytis cinerea*, en medio APD presenta una coloración grisácea al quinto día y aproximadamente a los 30 días aparecen esclerocios (Fig. 12 y Fig. 13). Mientras tanto *B. cinerea* en medio kiwicha presenta una coloración grisácea y negruzca al tercer y sétimo día respectivamente (Fig. 14). Asimismo, *B. cinerea* tiene mayor crecimiento y desarrollo de conidios a la concentración de 7.5% (Fig. 16).

El crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* en ambos extractos etanólicos se va incrementando en el transcurso de los días, siendo la concentración de 2.5% de *Phyllanthus niruri* la que presenta menor crecimiento micelial al sétimo día para ambos medios y se observa que no hay crecimiento de *B. cinerea* a las concentraciones de 10%, 7.5% y 5%. En cambio, el menor crecimiento de *B. cinerea* para el extracto de *Minthostachys mollis* en medio APD y kiwicha es a las concentraciones de 2.5% y 5% respectivamente y se observa que no presenta crecimiento en las otras concentraciones (10%, 7.5% y 5% en APD y 10% y 7.5% en kiwicha). (Tabla 1)

Estadísticamente el crecimiento micelial de *B. cinerea* no presenta diferencias significativas a las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% para ambos medios y extractos. También se observa que no existe diferencias significativas en las concentraciones de 1% y 0% para el extracto de *P. niruri* en ambos medios y *M. mollis* en medio kiwicha. La concentración de 2.5% presenta diferencias significativas con todas las concentraciones. (Anexo 5: Tabla 15, Tabla 16, Tabla 17 y Tabla 18)

El porcentaje de crecimiento de *Botrytis cinerea* para ambos extractos y medios es 0% a las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% excepto en la prueba de *Minthostachys mollis* al 5% en medio kiwicha pues al sétimo día tiene un 22% de crecimiento. En las pruebas restantes, el porcentaje de crecimiento al tercer día disminuye ligeramente en la



concentración de 2.5% mientras que a la concentración de 1% este va aumentando en el transcurso de los días. (Tabla 2)

El porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* para ambos extractos y medios es 100% a las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% menos en la prueba de *Minthostachys mollis* a la concentración de 5% en medio kiwicha que presenta 78% de inhibición al sétimo día. En las pruebas restantes, el porcentaje de inhibición aumenta ligeramente al tercer día a la concentración de 2.5% mientras que a la concentración de 1% el porcentaje de inhibición va disminuyendo. (Tabla 3)

Estadísticamente el porcentaje de inhibición de *B. cinerea* no presenta diferencias significativas a las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% para ambos medios frente al extracto de *M. mollis* y para la prueba de *P. niruri* con medio APD; en cambio, para la prueba de *P. niruri* en medio kiwicha las concentraciones de 10%, 7.5%, 5% y 2.5% no presenta diferencias significativas. También se observa que no existe diferencias significativas en las concentraciones de 1% y 0% para el extracto de *P. niruri* en ambos medios y *M. mollis* en medio kiwicha. (Anexo 5: Tabla 19, Tabla 20, Tabla 21 y Tabla 22)

La inhibición al 100% del crecimiento micelial de *Botrytis cinerea* en las pruebas mencionadas puede deberse a la presencia de diversos metabolitos secundarios que se encuentran a determinadas concentraciones en ambos extractos etanólicos (Espinosa-García, 2001). Cabe mencionar que no todos los extractos de plantas tienen la capacidad de inhibir el crecimiento de patógenos, así como lo demuestra Stauffer *et al.* (2000) quienes evaluaron 98 extractos vegetales y tan solo el 10% presentó actividad contra hongos.

Las propiedades antifúngicas presentes en extractos vegetales pueden estar relacionadas con compuestos originados del metabolito secundario como alcaloides y

terpenoides, los cuales tienen acción contra diversos hongos fitopatógenos. (Montes-Belmont, 2000)

Asimismo, los extractos de *Allium sativum*, *Capsicum* sp, *Ephedra breana*, *Fragaria vesca*, *Hyssopus officinalis*, *Nolana sedifolia*, *Quillaja saponaria*, *Satureja hortensis*, *Schinus molle* y *Vitis* sp inhiben el crecimiento de *Botrytis cinerea*. (Wilson *et al.*, 1997; Ribera *et al.*, 2008; Álvarez, 2012; Vio-Michaelis *et al.*, 2012; Sesan *et al.*, 2015; Espinoza, 2016; Apolonio-Rodríguez *et al.*, 2017)

Con los resultados obtenidos, se observa que el extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* presenta acción antifúngica contra *Botrytis cinerea*. Esto concuerda con los estudios de Kamalannan *et al.* (2004); Rodríguez y Sanabria. (2005) y Mishra *et al.* (2010), quienes demostraron la acción antifúngica *P. niruri* al inhibir el crecimiento de *Alternaria solani*, *Bipolaris maydis*, *Helminthosporium solani*, *Penicillium notatum* y *Rhizoctonia solani*.

Los resultados del screening fitoquímico de *Phyllanthus niruri* muestran que este extracto está compuesto por saponinas, alcaloides y compuestos fenólicos del tipo gálico, pero no hay presencia de flavonoides. (Tabla 8 y Anexo 6: Tabla 23)

Algunos de estos resultados concuerdan con Arboleda *et al.* (2007) quienes determinaron que *P. niruri* presenta gran cantidad de aminoácidos, mediana cantidad de compuestos fenólicos, taninos, triterpenoides y quinonas y poca cantidad de flavonoides y leucoantocianinas. Otros resultados concuerdan con Do Rosario *et al.* (2016), quienes realizaron un test fitoquímico de *P. niruri*, en el cual dio positivo para esteroides y triterpenoides, alcaloides, depsideos y depsidonas, azúcares reductores y antraquinonas.

También con los resultados obtenidos, se observa que el extracto etanólico de *Minthostachys mollis* presenta acción antifúngica contra *Botrytis cinerea*, este resultado concuerda con los estudios realizados por Cano (2007); Cano *et al.* (2008); Alcalá-Marcos *et al.* (2011) y Salas (2016); quienes demuestran la actividad antifúngica de *M.*

*mollis* contra *Candida albicans*, *Microsporium canis*, *Trichophyton mentagrophytes* y *Trichophyton tonsurans*.

Los resultados del screening fitoquímico de *Minthostachys mollis* muestran que este extracto está compuesto en gran cantidad por flavonoides, compuestos fenólicos y alcaloides, pero no hay presencia de saponinas. (Tabla 8 y Anexo 6: Tabla 23)

La mayoría de estos resultados concuerdan con Castillo (2010), quien realizó pruebas fitoquímicas dando positivo para compuestos fenólicos, taninos, saponinas, flavonoides, esteroides y leucoantocianidinas.

Los diferentes resultados de presencia o ausencia de algunos de los metabolitos secundarios se atribuyen a las características del suelo donde fueron colectadas las plantas (Fuertes y Mungía, 2001; Bagalkotkar *et al.*, 2006). También una posible variación en la composición química y toxicidad puede deberse a los métodos de extracción y al porcentaje de humedad de la planta recolectada (Cano, 2007).

El ensayo fitoquímico de *Phyllanthus niruri* presenta compuestos fenólicos, alcaloides y saponinas, y de *Minthostachys mollis* presenta compuestos fenólicos, alcaloides y flavonoides. La actividad antifúngica de *P. niruri* y *M. mollis* frente a *Botrytis cinerea* puede deberse a la presencia de los compuestos fenólicos. Lagrouh *et al.* (2017) afirman que la acción antifúngica de los compuestos fenólicos se realiza a través de la disrupción de la membrana celular.

Se ha reportado algunos metabolitos secundarios como el resveratrol de las hojas de uva y los flavonoides y proantocianidinas del *Aloe vera* inhiben la esporulación de *B. cinerea* en 50% y 95% respectivamente. (Domingo y López-Brea, 2003; Van Baarlen *et al.*, 2007)

Todo esto indica que la concentración mínima inhibitoria contra *B. cinerea* tanto para el extracto de *P. niruri* en medio APD como de *M. mollis* en ambos medios es 5%; mientras que la concentración mínima inhibitoria para el extracto de *P. niruri* en medio kiwicha es

2.5%. Esto puede deberse a que estos dos extractos tienen similares metabolitos secundarios como compuestos fenólicos y alcaloides que inhiben de igual manera el crecimiento de *B. cinerea*. Con respecto a las diferencias en la CMI en el extracto de *P. niruri*, esto puede deberse a que la kiwicha contiene lisina que aporta nitrógeno y esta forma parte de las estructuras antifúngicas como lo afirma Lyman y Walsh (1992).

Los extractos etanólicos de *Phyllanthus niruri* y *Minthostachys mollis* tienen potencial antifúngico frente a cultivos *in vitro* de *Botrytis cinerea*; siendo necesario la comprobación en cultivos agrícolas. En un futuro, esto dará origen a cultivos libres de hongos fitopatógenos, con mejor calidad, con alto valor comercial, sin la utilización de fungicidas químicos ni contaminantes para el ambiente.

## VII.- Conclusiones

- El hongo *Botrytis cinerea* tiene mejor crecimiento y desarrollo de sus conidios en los medios de APD y kiwicha a la concentración de 7.5%.
- La concentración mínima inhibitoria (CMI) para el extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* en medio APD y kiwicha es 5% y 2.5% respectivamente y para el extracto etanólico de *Minthostachys mollis* es 5% para el medio APD y kiwicha.
- El extracto etanólico de *Phyllanthus niruri* inhibe el crecimiento de *Botrytis cinerea* al 100% a las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% en los medios de APD y kiwicha; el extracto etanólico de *Minthostachys mollis* inhibe el crecimiento de *B. cinerea* al 100% a las concentraciones de 10%, 7.5% y 5% en el medio APD y 10% y 7.5% en el medio de kiwicha.

## VIII.- Recomendaciones

- Realizar pruebas con el extracto de *Phyllanthus niruri* entre las concentraciones de 2.5% y 5% en medios de APD y kiwicha. Asimismo, realizar pruebas con *Minthostachys mollis* en medio APD y kiwicha entre las concentraciones de 2.5% - 5% y 5% - 7.5%.
- Realizar cromatografía de capa fina para analizar de manera específica los metabolitos secundarios identificados con el ensayo fitoquímico realizado.

## IX.- Referencias bibliográficas

AGRIOS, G. N. *Losses caused by plant diseases*. Plant Pathology. UK, Oxford: Elsevier, 2004, p. 29-45, 273, 284, 285

AINWORTH, G. Dictionary of the fungi. Commonwealth Micological Inst. Kew. Great Britain, Surrey. 1961. p. 230

ALABA CASTAÑEDA, Wesley. "Efecto inhibitorio *in vitro* del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) sobre *Enterococcus faecalis* ATCC 29212". Tesis de Maestría. UNT, EP Estomatología, Trujillo, 2013.

ALCALÁ-MARCOS, Katherine M., *et al.* Actividad antimicótica del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña) comparado con el Fluconazol en cultivo de *Candida albicans*. CIMEL Ciencia e Investigación Médica Estudiantil Latinoamericana, 2011, vol. 16, n° 2.

ALKIRE, Ben; TUCKER, Arthur & MACIARELLO, Michael. Tipo, *Minthostachys mollis* (lamiaceae): an Ecuadorian mint. Economic Botany, 1994, vol. 48, n° 1, p. 60-64.

ÁLVAREZ GÓMEZ, Tania. "Biocontrol de *Botrytis cinerea* a partir de extractos fenólicos de fresa". Tesis Magistral. IPN, Ciencias en producción agrícola, México, 2012.

AMBIKAPATHY, V., GOMATHI, S. and PANNEERSELVAM, A. Effect of antifungal activity of some medicinal plants against *Pythium debaryanum* (Hesse). Asian journal plant science and research, 2011, vol. 1, n° 3, p. 131-134.

ANDERSON, Jacob *et al.* *Botrytis cinerea* in Alaska. Phytopathology, 1924, vol. 14, n°3.

APOLONIO-RODRÍGUEZ, Isela *et al.* *In vitro* inhibition of *Botrytis cinerea* with extracts of wild grapevine (*Vitis* spp.) leaves. Revista Mexicana de Fitopatología, 2017, vol. 35, n° 2.

ARBOLEDA, David *et al.* Evaluación de la actividad antiviral *in vitro* de cuatro extractos de las especies *Caryodendron orinocense* y *Phyllanthus niruri* de la familia Euphorbiaceae contra los virus Herpes Bovino tipo 1 y Herpes Simplex tipo 2. *Vitae*, 2007, vol. 14, n° 1.

ARENAS, Roberto. *Micología Médica Ilustrada*. Capítulo 5: Diagnóstico de laboratorio. Cultivo en lámina o microcultivo. Editorial Mc Graw Hill, 5ta Edición. 2014. pp 49-50.

BACA MELO, Cynthia Madeleine. “Efecto inhibitorio del aceite esencial “muña” *Minthostachys mollis* sobre el género *Proteus*, causantes de infecciones del tracto urinario”. Tesis Título Profesional. UNA, EAP Biología, Puno, 2017.

BAGALKOTKAR, G. *et al.* Phytochemicals from *Phyllanthus niruri* Linn. and their pharmacological properties: a review. *Journal of pharmacy and pharmacology*, 2006, vol. 58, n° 12, p. 1559-1570.

BANCHIO, Erika, ZYGADLO, Julio & VALLADARES, Graciela. Quantitative variations in the essential oil of *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb. in response to insects with different feeding habits. *Journal of agricultural and food chemistry*, 2005, vol. 53, n° 17, p. 6903-6906.

BARUAH, P. *et al.* Fungicidal activity of some naturally occurring essential oils against *Fusarium moniliforme*. *Journal of essential oil research*, 1996, vol. 8, n° 4, p. 411-412.

BASTIDAS, Yuli y LLACUA, Lousset. “Evaluación de la actividad antimicrobiana del extracto metanólico de las flores de la especie vegetal mastuerzo (*Tropaeolum majus* L.) frente al crecimiento del microorganismo *Penicillium* sp.”. Tesis Título Profesional. UNCP, Facultad de Ingeniería en industrias alimentarias, Huancayo, 2016.

BAUTISTA-BAÑOS, Silvia *et al.* Seasonal evaluation of the postharvest fungicidal activity of powders and extracts of Huamuchil (*Pithecellobium dulce*): action against



*Botrytis cinerea*, *Penicillium digitatum* and *Rhizopus stolonifer* of strawberry fruit. Postharvest biology and technology, 2003, vol. 29, n° 1, p. 81-92.

BEGUM, Hussan *et al.* Phytochemical analysis, antifungal bioassay and folklore uses of selected medicinal plants of family Rosaceae. Pure and applied biology, 2016, vol. 5, n° 2, p. 183.

BENITO, Ernesto P.; ARRANZ, Mónica & ESLAVA, A. Factores de patogenicidad de *Botrytis cinerea*. Revista iberoamericana de micología, 2000, vol. 17, p. 43-46.

BERŁOWSKI, Adam *et al.* Antioxidant properties of medicinal plants from Peru. Food and Nutrition Sciences, 2013, vol. 4, n° 8, p. 71.

BOLÍVAR, Karina *et al.* 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. Revista Científica UDO Agrícola, 2009, vol. 9, n° 1, p. 175-181.

CABELLO STOM, Daniel.” Evaluación de cuatro fungicidas, en el control de *Botrytis cinerea* Pers. ex Fr. endógena en frutos de arándanos (*Vaccinium corymbosum* L.), cultivar Blue Jay”. Tesis Título Profesional. UACH, EP Agronomía, Chile, 2005.

CANO, Carlos *et al.* Actividad antimicótica *in vitro* y metabolitos del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* (muña). Revista peruana de medicina experimental y salud pública, 2008, vol. 25, n° 3, p. 298-301

CANO PÉREZ, Carlos. “Actividad antimicótica *in vitro* y elucidación estructural del aceite esencial de las hojas de *Minthostachys mollis* “muña””. Tesis de Maestría. UNMSM, Facultad de Farmacia y Bioquímica, Lima, 2007.

CASADO, Raquel *et al.* Anti-inflammatory, antioxidant and antifungal activity of *Chuquiraga spinosa*. Pharmaceutical biology, 2011, vol. 49, n° 6, p. 620-626.

CASTILLO SAAVEDRA, Ericson. “Análisis fitoquímico y efecto sinérgico protector de las hojas de *Minthostachys mollis* y *Malva sylvestris* sobre la mucosa gástrica de *Rattus rattus* var. *albinus*”. Tesis Doctoral. UNT, Facultad Ciencias Biomédicas, Trujillo, 2010.

CASTILLO, Segundo *et al.* Efecto diurético de *Phyllanthus niruri* “chanca piedra” y niveles de excreción de sodio en *Rattus rattus* var. *albinus*. UCV-SCIENTIA, 2011, vol. 3, n° 1, p. 11-17.

CCALLO LAUCATA, Sofía Nancy. “Concentración mínima inhibitoria del aceite esencial del *Minthostachys mollis* (muña), frente a la actividad bacteriana de *Streptococcus mutans* y *Porphyromonas gingivalis*”. Tesis Título Profesional. UNA, Facultad de Odontología, Puno, 2013.

CERRATE, E. (1969). Manera de preparar plantas para un herbario. Museo de Historia Natural, Serie de Divulgación, (1), 10.

CHÁVEZ INFANTE, Pamela Alejandra. “Control del moho gris (*Botrytis cinerea* Pers.) en *Begonia rex* con fungicidas químicos y biológicos”. Tesis Título Profesional. UNALM, Facultad Agronomía, Lima, 2016.

COLEY-SMITH, J. The biology of *Botrytis*. Academic Press. London, England. 1980. p. 318

CONDORI, Ivón & CARRIÓN, Luzmila. Evaluación de la actividad antimicótica de los aceites esenciales de plantas aromáticas. Revista Científica Investigación Andina. 2016. vol. 14, n° 2.

COTRINA, J. “Uso de *Gliocladium roseum* para el control de *Botrytis cinerea* en fresa”. Tesis Título Profesional. UNHEVAL, EAP Agronomía, Huánuco, 2001.

CRONQUIST, Arthur. An integrated system of classification of flowering plants. Columbia University Press, 1981.

CRUZADO DONATO, Jimmy. "Concentración inhibitoria mínima *in vitro*" del *Minthostachys mollis* (muña) frente al *Streptococcus mutans* ATCC 35668". Tesis Título Profesional. UNT, EAP Estomatología, Trujillo, 2012.

CYTED, Programa Iberoamericano de Ciencia; PARA EL DESARROLLO, Tecnología. Manual de Técnicas de Investigación. Editado por CYTED, 1995.

DÁVILA GUERRA, Carlos. "Actividad repelente del aceite esencial de *Minthostachys mollis* Grisebach; y elaboración de una crema repelente contra insectos adultos de la familia Culicidae". Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Farmacia y Bioquímica, Lima, 2016.

DÍAZ LEDESMA, Karin. "Determinación de la actividad antibacteriana *in vitro*" de *Minthostachys mollis* Griseb (muña) frente a bacterias orales de importancia estomatológica". Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP. Odontología, Lima, 2005.

DO ROSÁRIO, Ana *et al.* Análise fitoquímica da espécie *Phyllanthus niruri* L.(quebra-pedra). *Estação Científica (UNIFAP)*, 2016, vol. 6, nº 1, p. 35-41.

DOMINGO, D & LÓPEZ-BREA, M. Plantas con acción antimicrobiana. *Revista Española de Quimioterapia*, 2003, vol. 16, nº 4, p. 385-393.

DOS SANTOS, Ana *et al.* Efeito fungicida dos óleos essenciais de *Schinus molle* L. e *Schinus terebinthifolius* Raddi, Anacardiaceae, do Rio Grande do Sul. *Rev. Bras. Farmacogn*, 2010, vol. 20, p. 154-159.

DUKE, Stephen *et al.* Natural pesticides from plants. En *Advances in new crops. Proceedings of the first national symposium 'New crops: research, development, economics'*, Indianapolis, Indiana, USA, 23-26 October 1988. Timber Press, 1990. p. 511-517.

EKWENYE, Uchechi & NJOKU, Njoku. Antibacterial effect of *Phyllanthus niruri* (Chanca Piedra) on three enteropathogens in Man. International Journal of Molecular Medicine and Advance Sciences, 2006, vol. 2, n° 2, p. 184-189.

ELAD, Y.; YUNIS, H. & KATAN, T. Multiple fungicide resistance to benzimidazoles, dicarboximides and diethofencarb in field isolates of *Botrytis cinerea* in Israel. Plant Pathology, 1992, vol. 41, n° 1, p. 41-46.

ESPINOSA-GARCÍA, F. J. La diversidad de los metabolitos secundarios y la teoría de la defensa vegetal. Relaciones Químicas entre Organismos. Aspectos Básicos y Perspectivas de su Aplicación. Universidad Nacional Autónoma de México y Plaza y Valdés. México, DF pp, 2001, p. 231-249.

ESPINOSA DE LOS MONTEROS, María. "Estudio de la variabilidad genética y organización cromosómica en el hongo fitopatógeno *Botrytis cinerea*". Tesis Doctoral. UCA, Facultad de Ciencias del Mar y Ambientales, España, 2006.

ESPINOZA PANTIGOZO, Kelly. "Efecto comparativo de aceite esencial y extracto acuoso de hojas de *Schinus molle* L. "molle" sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea*". Tesis Título Profesional. UNT, EAP Ciencias Biológicas, Trujillo, 2016.

EUDES DO NASCIMENTO, João. "Estudo comparativo de três espécies de *Phyllanthus* (Phyllanthaceae) conhecidas por quebra-pedra (*Phyllanthus niruri* L., *Phyllanthus amarus* Schum & Thonn. e *Phyllanthus tenellus* Roxb.)". Tesis Doctoral. UFPE, Ciências Farmacéuticas, Recife, 2008.

FERNÁNDEZ, José; DÍAZ, Tomas & FERNANDEZ-CARVAJAL, María. *Curso de Botánica*. España: Trea, 2004.

FUERTES, César & MUNGUÍA, Yolanda. Estudio comparativo del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (Kunth) Griseb" Muña" de tres regiones peruanas por

cromatografía de gases y espectrometría de masas. *Ciencia e Investigación*, 2001, vol. 4, n° 1, p. 23-39.

GENOSCOPE. Sequencing projects of *Botrytis cinerea*. Estimated losses for vineyards in France amount to 15-40% of the harvest, depending on climatic conditions. 2005. [online]

GENTRY, Alwyn H. *A field guide to the families and genera of woody plants of Northwest South America*. Conservation International, Washington, DC, 1993.

GÓMEZ CISNEROS, Karina. "Actividad antifúngica del aceite esencial de cáscara de naranja (*Citrus aurantium* L.) frente al hongo *Fusarium semitectum*". Tesis Título Profesional. UNSCH, EP Ingeniería Agroindustrial, Ayacucho, 2014.

GONZÁLEZ, Luis Carlos. *Introducción a la Fitopatología*. Bib. Orton IICA/CATIE, 1989.

GRINDLE, M. Phenotypic differences between natural and induced variants of *Botrytis cinerea*. *Journal of General Microbiology*. 1979, vol. 111, p.109-120.

GÜIZA, Diana & RINCÓN, Lina. "Estudio del efecto antimicrobiano del aceite esencial de *Minthostachys mollis* combinado con inactivación térmica sobre cepas de *Listeria monocytogenes* y *Bacillus cereus*". Tesis Título Profesional. PUJ, EAP Microbiología Industrial, Bogotá, 2007.

HAIN, Rüdiger *et al.* Disease resistance results from foreign phytoalexin expression in a novel plant. *Nature*, 1993, vol. 361, n° 6408, p. 153.

HUAMANÍ, María y RUIZ, Julio. "Determinación de la actividad antifúngica contra *Candida albicans* y *Aspergillus niger* de 10 plantas medicinales de 3 departamentos del Perú". Tesis Título Profesional. UNMSM, EAP Farmacia y Bioquímica, Lima, 2005.

HUAMANÍ QUINTE, William. "Estudio de compuestos bioactivos del aceite esencial de muña (*Minthostachys mollis*) por cromatografía de gases. Espectrometría de masas en

tres niveles altitudinales del distrito de Huando”. Tesis Título Profesional. UNH, EAP Agroindustrias, Huancavelica, 2015.

HUSSAIN, Farrukh *et al.* Antibacterial, antifungal and insecticidal activities of some selected medicinal plants of polygonaceae. African Journal of Biotechnology, 2010, vol. 9, n° 31, p. 5032-5036.

IBRAHIM, Darah; HONG, Lim & KUPPAN, Ninthianantham. Antimicrobial activity of crude methanolic extract from *Phyllanthus niruri*. Natural product communications, 2013, vol. 8, n° 4, p. 493-496.

INGA, B. A. & GUERRA, M. B. Efecto del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) contra algunas bacterias y hongos de interés en la salud. Tesis de Licenciatura. UNMSM, EAP Farmacia y Bioquímica, Lima, 2000.

ISLA RAMOS, María M. Cuantificación de polifenoles totales en hoja de *Phyllanthus niruri*. Tesis Título Profesional. ULADECH, EAP Farmacia y Bioquímica, Chimbote, 2016.

JUÁREZ-BECERRA, G.; SOSA-MORALES, M. & LÓPEZ-MALO, A. Hongos fitopatógenos de alta importancia económica: descripción y métodos de control. *Temas selectos de ingeniería de alimentos*. 2010. p. 2-3.

KAMALANNAN, A. *et al.* Biocontrol agents induce disease resistance in *Phyllanthus niruri* Linn against damping-off disease caused by *Rhizoctonia solani*. Phytopathologia Mediterranea, 2004, vol. 43, n° 2, p. 187-194.

KAPAT, Arnab; ZIMAND & Gilly & ELAD, Yigal. Biosynthesis of pathogenicity hydrolytic enzymes by *Botrytis cinerea* during infection of bean leaves and *in vitro*. Mycological Research, 1998, vol. 102, n° 8, p. 1017-1024.

LAGROUH, F.; DAKKA, N.; BAKRI, Y. The antifungal activity of Moroccan plants and the mechanism of action of secondary metabolites from plants. *Journal de mycologie medicale*, 2017, vol. 27, n° 3, p. 303-311.

LANE, Charles; BEALES, Paul & HUGHES, Kelvin. *Fungal plant pathogens*. CABI, 2012.

LAURENCIO AQUINO, Juan. "Efecto de *Trichoderma harzianum* en el control de *Botrytis cinerea* en granadilla (*Passiflora ligularis* Juss) en condiciones climáticas de Miraflores, Molino". Tesis Título Profesional. UNHEVAL, EAP Agronomía, Huánuco, 2015.

LEE, Nathanael *et al.* The pharmacological potential of *Phyllanthus niruri*. *Journal of Pharmacy and Pharmacology*, 2016, vol. 68, n° 8, p. 953-969.

LIZCANO GONZÁLEZ, María Carolina. Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de tomillo (*Thymus vulgaris*) contra *Botrytis cinerea*, *Fusarium oxysporum* y *Sclerotinia sclerotiorum*. Tesis de Licenciatura. Pontificia Universidad Javeriana, EAP Microbiología Agrícola y Veterinaria, Bogotá, 2007.

LYMAN, Caron & WALSH, Thomas. Systemically administered antifungal agents. *Drugs*, 1992, vol. 44, n° 1, p. 9-35.

MACBRIDE, J. F. & DAHLGREN, B. E. *Flora Of Peru* (Part-VI). 1936. Vol. 13. p.34-47, 744-749.

MAQUERA, D.; TELLO, M.; ROMERO, S. & COTACALLAPA, D. Componentes químicos de los aceites esenciales de muña *Minthostachys mollis* (Kunth.) Griseb en Huánuco. Universidad Nacional Hermilio Valdizán, Facultad de Ciencias Agrarias. En *Revista Investigación. Valdizana*. 2009, vol. 3, n° 2

MISHRA, M. *et al.* Antifungal potential of *Phyllanthus niruri* linn. Aerial parts. *International Journal of Pharmacology and Biological Sciences*. *International Journal of Pharmacology and Biological Sciences*. 2010, vol. 4, n° 2, p. 51-56

MOLINA MERCADER, Gloria, *et al.* Selección de hongos antagonistas para el control biológico de *Botrytis cinerea* en viveros forestales en Chile. Bosque (Valdivia), 2006, vol. 27, n° 2, p. 126-134.

MONTES-BELMONT, Roberto *et al.* Propiedades antifúngicas en plantas superiores. Análisis retrospectivo de investigaciones. Revista Mexicana de Fitopatología, 2000, vol. 18, n° 2.

MOREIRA, Ileana *et al.* Estudio de cuatro plantas con uso medicinal tradicional cultivadas en las regiones Huetar Norte y Atlántica de Costa Rica. Tecnología en marcha, 2014, vol. 27, n° 4, p. 69-77.

MORENO LÓPEZ, Jenny. “Actividad antifúngica de los extractos vegetales de *Piper eriopodon* y *Zanthoxylum monophyllum* y sus metabolitos secundarios mayoritarios sobre dos hongos fitopatógenos de clavel (*Dianthus caryophyllus*)”. Título de Maestría. UNAL, Facultad de Agronomía, Bogotá, 2011.

MYCOBANK. 2018. [online] <http://www.mycobank.org/BioMICSDetails.aspx?Rec=3370>

OGBULIE, J. N. *et al.* Antibacterial activities and toxicological potentials of crude ethanolic extracts of *Euphorbia hirta*. African Journal of Biotechnology, 2007, vol. 6, n° 13.

PAITHANKAR, V. *et al.* *Phyllanthus niruri*: a magic herb. Research in Pharmacy, 2011, vol. 1, n° 4.

PARADA JARA, Carmen Zoila. “Evaluación de la actividad antifúngica del extracto de las hojas de Jarilla frente a cepas de Tiña Capitis. Tesis Título Profesional. UANCV, EAP Farmacia y Bioquímica, Juliaca, 2015.

RANILLA, Lena Gálvez; APOSTOLIDIS, Emmanouil & SHETTY, Kalidas. Antimicrobial activity of an amazon medicinal plant (Chancapiedra) (*Phyllanthus niruri* L.) against



*Helicobacter pylori* and lactic acid bacteria. *Phytotherapy research*, 2012, vol. 26, n° 6, p. 791-799.

RICALDI GUADALUPE, Roberto. "Acción antagónica *in vitro* de *Trichoderma harzianum* Rifai. sobre el crecimiento de *Botrytis cinerea* Pers F. en cultivo de *Fragaria vesca* L. "fresa" procedente del caserío de Quirihuac - distrito de Laredo, Provincia de Trujillo". Tesis Título Profesional. UNT, EAP Ciencias Biológicas, Trujillo, 2013.

RIBERA, Alejandra; COTORAS, Milena & ZÚÑIGA, Gustavo E. Effect of extracts from *in vitro*-grown shoots of *Quillaja saponaria* Mol. on *Botrytis cinerea* Pers. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 2008, vol. 24, n° 9, p. 1803.

RIVERA F. "Evaluación y caracterización de la actividad antifúngica de la especie *Quillaja saponaria* Mol. cultivada *in vitro* en *Botrytis cinerea* Pers". Facultad de Ingeniería, Ciencias y Administración, Chile, 2007.

RODRÍGUEZ, D. & MONTILLA, José. Disminución de la marchitez causada por *Fusarium* en tomate con extracto de *Citrus paradisi*. *Manejo Integrado de Plagas*. Costa Rica, 2002, vol. 63, p. 46-50.

RODRÍGUEZ, Dorian A. & SANABRIA, María E. Efecto del extracto de tres plantas silvestres sobre la rizoctoniosis, la mancha sureña del maíz y los patógenos que las causan. *Interciencia*, 2005, vol. 30, n° 12, p. 739-744.

ROJAS, Luis & USUBILLAGA, Alfredo N. Essential oil of *Minthostachys mollis* Grisebach from Venezuela. *Journal of Essential Oil Research*, 1995, vol. 7, n° 2, p. 211-213.

RUIZ QUIROZ, Julio Reynaldo. "Actividad antifúngica *in vitro* y concentración mínima inhibitoria mediante microdilución de ocho plantas medicinales". Tesis de Maestría en Microbiología. UNMSM. Farmacia y Bioquímica, Lima, 2013.

SALAS APAZA, Alex. “Efecto antimicótico del aceite esencial de *Minthostachys mollis* (muña) en cepas de *Candida albicans*”. Tesis Título Profesional. UNA, EAP Biología, Puno, 2016.

SEGURA CONTRERAS, Silvia Roxana. “Actividad antifúngica del extracto etanólico de las hojas de *Schinus molle* L. “molle” sobre el crecimiento de *Lasiodiplodia theobromae* (Pat.) Griffon & Maubl., en condiciones de laboratorio”. Tesis Título Profesional. UNT, EAP Ciencias Biológicas, Trujillo, 2015.

SENASA. San Martín: SENASA resguarda producción de uva de plagas cuarentenarias. 2018. [online] <https://www.senasa.gob.pe/senasacontigo/san-martin-senasa-resguarda-produccion-de-uva-de-plagas-cuarentenarias/>

SENATORE, Felice. Volatile constituents of *Minthostachys setosa* (Briq.) Epl. (Lamiaceae) from Peru. Flavour and fragrance journal, 1998, vol. 13, n° 4, p. 263-265.

ŞESAN, Tatiana Eugenia, *et al.* Antifungal activity of some plant extracts against *Botrytis cinerea* Pers. in the blackcurrant crop (*Ribes nigrum* L.). Acta Sci. Pol., Hortorum Cultus, 2015, vol. 14, n° 1, p. 29-43.

SCAVINO, Roy & SALDAÑA, Claudio. “Evaluación de la actividad antifúngica *in vitro* del extracto etanólico de la corteza de *Byrsonima crassifolia* (Indano) frente a *Candida albicans* y *Trichophyton rubrum*, por el método de macrodilución. Tesis Título Profesional. UNAP, EAP Farmacia y Bioquímica, Iquitos, 2015.

STAUFFER, Alfredo; ORREGO, Aida & AQUINO, Alicia. Selección de extractos vegetales con efecto fungicida y/o bactericida. Revista de Ciencia y Tecnología, 2000, vol. 1, n° 2, p. 29-33.

UKOIMA, H. N.; IKATA, M. & PEPPLER, G. A. Control of *Lasiodiplodia theobromae* (PAT) on *Rhizophora racemosa* using plants extracts. American Journal of Biotechnology and Molecular Sciences, 2013, vol. 3, n° 1, p. 1-7.

URBINA CHAVARRIA, Martin. Enfermedades causadas por hongos. *Fitopatología general*. UCATSE. Nicaragua. 2011. p.3

VAN BAARLEN, Peter; LEGENDRE, Laurent & VAN KAN, Jan. Plant defence compounds against *Botrytis* infection. En *Botrytis: Biology, pathology and control*. Springer, Dordrecht, 2007. p. 143-161.

VIO-MICHAELIS, Sofía *et al.* Antifungal activity of three Chilean plant extracts on *Botrytis cinerea*. *Botanical Sciences*, 2012, vol. 90, n° 2, p. 179-183.

WATANABE, Tsuneo. *Pictorial atlas of soil and seed fungi: morphologies of cultured fungi and key to species*. CRC press, 2010.

WILLIAMSON, Brian *et al.* *Botrytis cinerea*: the cause of grey mould disease. *Molecular plant pathology*, 2007, vol. 8, n° 5, p. 561-580

WILSON, C. L. *et al.* Rapid evaluation of plant extracts and essential oils for antifungal activity against *Botrytis cinerea*. *Plant disease*, 1997, vol. 81, n° 2, p. 204-210.

ZAPATA, Renzo; SANABRIA, María E. & RODRÍGUEZ, Dorian. Reducción del desarrollo de hongos fitopatógenos con extracto de cardón lefaria (*Cereus deficiens* otto & diert). *Interciencia*, 2003, vol. 28, n° 5, p. 302-306.

## X.- Anexos

### ANEXO 1. Observaciones botánicas de las plantas

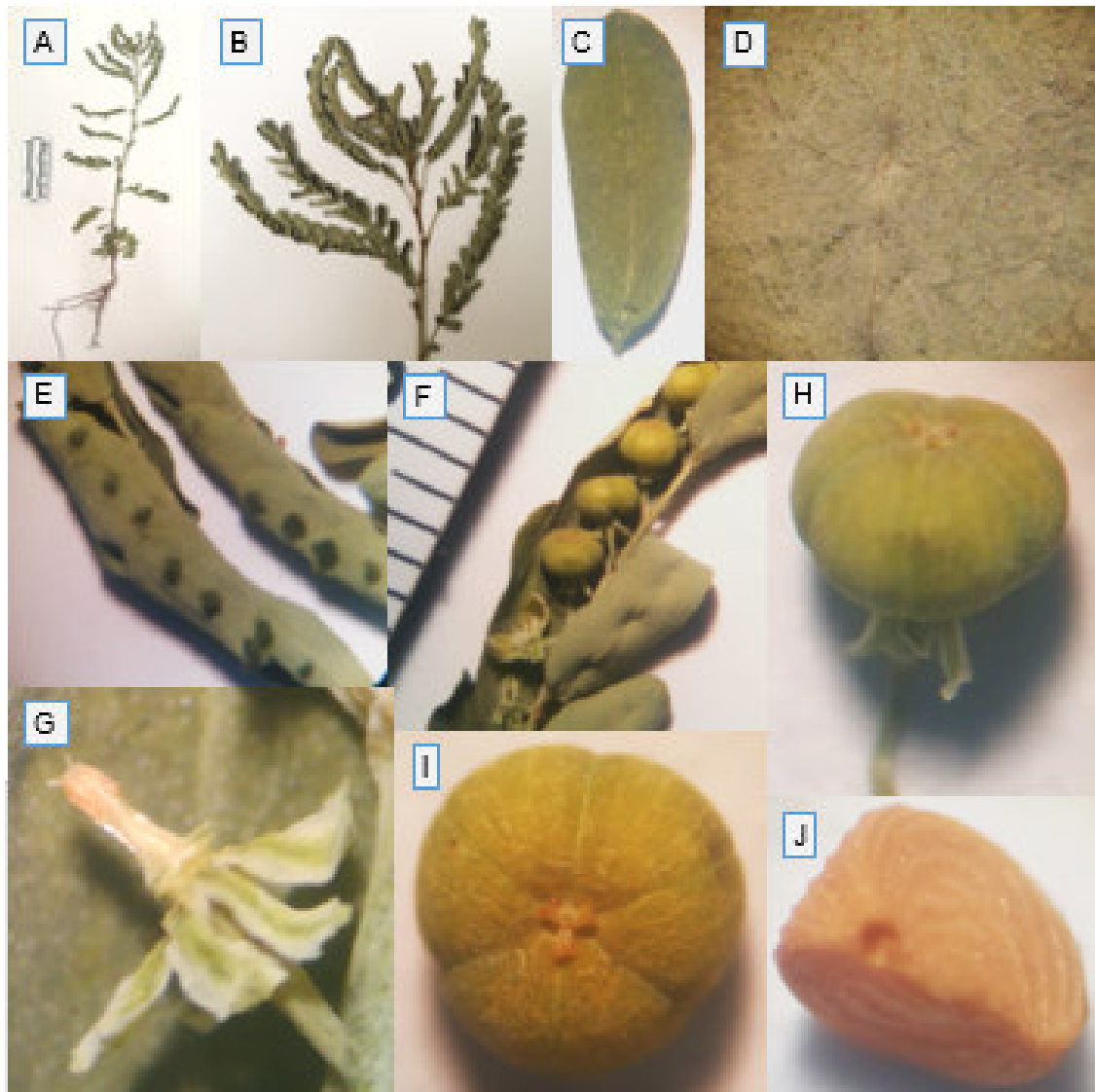
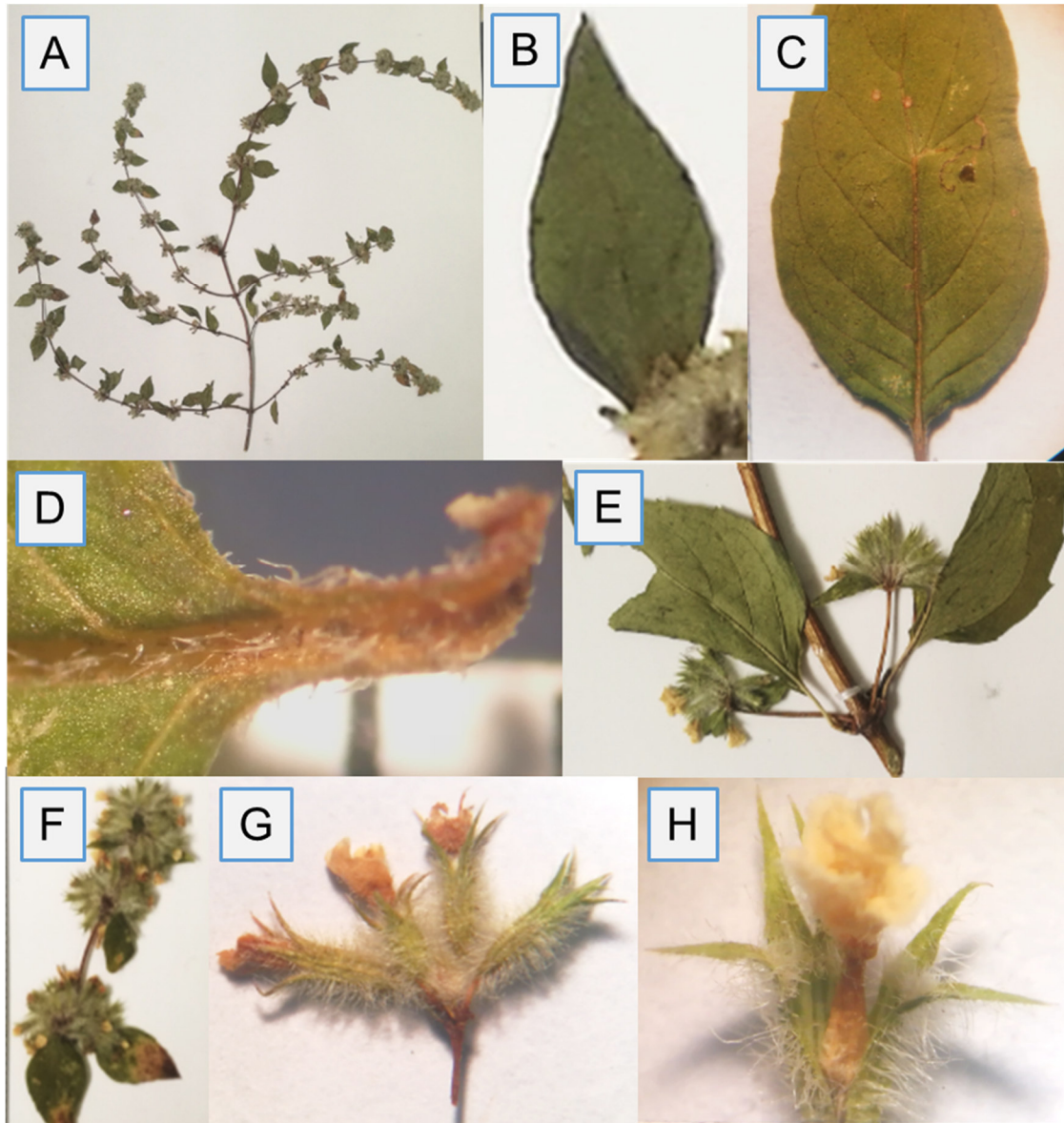


Figura 27. Morfología de *Phyllanthus niruri*. A) Porte B) Disposición de hojas terminales C) Hoja D) Nervadura E) Pigmentación en hojas F) Disposición de flores y frutos G) Flor H) y I) Fruto J) Semilla



**Figura 28. Morfología de *Minthostachys mollis*. A) Porte B) Hoja C) Nervadura  
 D) Pubescencia en envés de hoja E) y F) Disposición de inflorescencia  
 G) Inflorescencia H) Flor**

**ANEXO 2. Crecimiento micelial (en cm) de *Botrytis cinerea* de las tres pruebas frente a los extractos etanólicos**

Tabla 9. Crecimiento micelial (en cm) de *Botrytis cinerea* a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10% frente al extracto de *Phyllanthus niruri* durante 7 días

Medio	PRUEBA	Concentración	Crecimiento micelial (cm)					
			2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
APD	1° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	0.768	0.956	1.107	1.118	1.142	1.194
		1%	1.163	2.320	3.096	3.178	4.327	5.159
	0%	3.021	5.063	5.300	5.300	5.300	5.300	
	2° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	0.850	1.024	1.052	1.049	1.057	1.051
		1%	0.840	3.292	4.446	4.402	4.721	5.300
	0%	3.275	5.000	5.300	5.300	5.300	5.300	
	3° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2.5%		0.723	0.883	0.858	0.969	1.120	1.266	
1%		0.737	3.575	4.077	4.674	5.300	5.300	
0%	3.238	5.000	5.300	5.300	5.300	5.300		
KIWICHA	1° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	0.606	0.637	0.712	0.714	0.724	0.678
		1%	2.191	3.538	5.300	5.300	5.099	5.259
	0%	2.845	4.769	5.300	5.300	5.300	5.300	
	2° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	0.971	1.694	2.333	2.384	2.410	3.115
		1%	2.361	4.053	5.159	5.170	5.300	5.300
	0%	2.919	4.801	5.300	5.300	5.300	5.300	
	3° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
2.5%		0.602	0.639	0.651	0.657	0.668	0.839	
1%		1.533	2.105	2.157	2.196	2.294	2.974	
0%	3.003	5.043	5.300	5.300	5.300	5.300		

Tabla 10. Crecimiento micelial (en cm) de *Botrytis cinerea* a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10% frente al extracto de *Minthostachys mollis* durante 7 días

Medio	PRUEBA	Concentración	Crecimiento micelial (cm)					
			2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
APD	1° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	0.863	1.210	1.675	2.103	2.351	2.598
		1%	1.256	1.939	2.858	3.529	4.035	4.540
		0%	2.691	4.261	5.025	5.300	5.300	5.300
	2° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	0.795	1.143	1.499	2.062	2.480	2.731
		1%	1.276	2.139	3.022	3.493	3.979	4.465
		0%	2.354	3.965	4.597	4.978	5.224	5.300
	3° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	0.878	1.172	1.452	1.774	2.166	2.558
		1%	1.345	2.094	2.857	3.345	3.796	4.247
		0%	2.765	4.594	5.105	5.300	5.300	5.300
KIWICHA	1° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5.0%	0.000	0.667	0.725	0.860	1.060	1.260
		2.5%	1.273	2.314	3.155	3.540	3.791	4.042
		1%	1.592	3.056	4.195	5.300	5.300	5.300
		0%	2.611	4.609	5.092	5.300	5.300	5.300
	2° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	1.190	2.292	3.141	3.587	3.675	3.762
		1%	2.187	3.433	4.699	5.231	5.300	5.300
		0%	2.454	4.475	5.300	5.300	5.300	5.300
	3° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5.0%	0.000	0.477	0.804	0.836	0.956	1.075
		2.5%	1.038	1.961	2.537	3.126	3.275	3.424
		1%	2.143	3.554	4.926	5.275	5.300	5.300
		0%	2.543	4.123	5.040	5.300	5.300	5.300

**ANEXO 3. Crecimiento micelial (en porcentajes) de *Botrytis cinerea* de las tres pruebas frente a los extractos etanólicos**

Tabla 11. Porcentaje de crecimiento de *Botrytis cinerea* frente al extracto de *Phyllanthus niruri* a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10% durante 7 días

Medio	PRUEBA	Concentración	% CRECIMIENTO					
			2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
APD	1° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	25.432	18.874	20.895	21.101	21.545	22.524
		1%	38.493	45.832	58.423	59.962	81.633	97.337
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	2° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	25.969	20.488	19.857	19.791	19.937	19.837
		1%	25.658	65.831	83.883	83.064	89.081	100.000
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	3° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	22.334	17.658	16.190	18.280	21.126	23.887
		1%	22.774	71.499	76.925	88.189	100.000	100.000
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
KIWICHA	1° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	21.304	13.353	13.433	13.473	13.657	12.797
		1%	77.004	74.174	100.000	100.000	96.203	99.226
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	2° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	33.276	35.281	44.024	44.978	45.472	58.769
		1%	80.890	84.422	97.348	97.538	100.000	100.000
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	3° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	20.035	12.670	12.276	12.389	12.611	15.821
		1%	51.050	41.741	40.692	41.427	43.286	56.121
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000



Tabla 12. Porcentaje de crecimiento de *Botrytis cinerea* frente al extracto de *Minthostachys mollis* a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10% durante 7 días

Medio	PRUEBA	Concentración	% CRECIMIENTO					
			2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
APD	1° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	32.060	28.401	33.332	39.686	44.351	49.017
		1%	46.689	45.497	56.876	66.591	76.128	85.665
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	2° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	33.779	28.831	32.600	41.418	47.477	51.534
		1%	54.220	53.941	65.745	70.165	76.167	84.249
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	3° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	31.763	25.505	28.444	33.480	40.870	48.259
		1%	48.639	45.581	55.957	63.121	71.630	80.138
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
KIWICHA	1° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5.0%	0.000	14.465	14.246	16.226	19.998	23.769
		2.5%	48.769	50.218	61.965	66.791	71.530	76.269
		1%	60.984	66.309	82.382	100.000	100.000	100.000
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	2° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		2.5%	48.500	51.215	59.271	67.673	69.331	70.988
		1%	89.129	76.714	88.660	98.689	100.000	100.000
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
	3° PRUEBA	10%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		7.5%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
		5.0%	0.000	11.574	15.941	15.774	18.032	20.291
		2.5%	40.815	47.566	50.334	58.985	61.798	64.612
		1%	84.279	86.179	97.723	99.535	100.000	100.000
		0%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000

**ANEXO 4. Porcentaje de inhibición micelial de *Botrytis cinerea* de las tres pruebas frente a los extractos etanólicos**

Tabla 13. Porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* frente al extracto de *Phyllanthus niruri* a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10% durante 7 días

Medio	PRUEBA	Concentración	% INHIBICIÓN					
			2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
APD	1° PRUEBA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	74.568	81.126	79.105	78.899	78.455	77.476
		1%	61.507	54.168	41.577	40.038	18.367	2.663
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2° PRUEBA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	74.031	79.513	80.143	80.209	80.063	80.163
		1%	74.342	34.169	16.117	16.936	10.919	0.000
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	3° PRUEBA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	77.666	82.343	83.810	81.720	78.874	76.113
		1%	77.226	28.501	23.075	11.811	0.000	0.000
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
KIWICHA	1° PRUEBA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	78.696	86.647	86.567	86.527	86.343	87.203
		1%	22.996	25.826	0.000	0.000	3.797	0.774
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2° PRUEBA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	66.724	64.719	55.976	55.022	54.528	41.231
		1%	19.110	15.578	2.652	2.462	0.000	0.000
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	3° PRUEBA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	79.965	87.330	87.724	87.611	87.389	84.179
		1%	48.950	58.259	59.308	58.573	56.714	43.879
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

Tabla 14. Porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* frente al extracto de *Minthostachys mollis* a las concentraciones de 0%, 1%, 2.5%, 5%, 7.5% y 10% durante 7 días

Medio	PRUEBA	Concentración	% INHIBICIÓN					
			2 días	3 días	4 días	5 días	6 días	7 días
APD	1° PRUEBA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	67.940	71.599	66.668	60.314	55.649	50.983
		1%	53.311	54.503	43.124	33.409	23.872	14.335
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2° PRUEBA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	66.221	71.169	67.400	58.582	52.523	48.466
		1%	45.780	46.059	34.255	29.835	23.833	15.751
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	3° PRUEBA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	68.237	74.495	71.556	66.520	59.130	51.741
		1%	51.361	54.419	44.043	36.879	28.370	19.862
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
KIWICHA	1° PRUEBA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5.0%	100.000	85.535	85.754	83.774	80.002	76.231
		2.5%	51.231	49.782	38.035	33.209	28.470	23.731
		1%	39.016	33.691	17.618	0.000	0.000	0.000
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	2° PRUEBA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		2.5%	51.500	48.785	40.729	32.327	30.669	29.012
		1%	10.871	23.286	11.340	1.311	0.000	0.000
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000
	3° PRUEBA	10%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		7.5%	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000	100.000
		5.0%	100.000	88.426	84.059	84.226	81.968	79.709
		2.5%	59.185	52.434	49.666	41.015	38.202	35.388
		1%	15.721	13.821	2.277	0.465	0.000	0.000
		0%	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000	0.000

## ANEXO 5. Cuadros estadísticos de la prueba de Tukey

Tabla 15. Prueba post hoc Tukey del crecimiento micelial (en cm) de *Botrytis cinerea* frente al extracto de *Phyllanthus niruri* en medio de APD al sétimo día

### Comparaciones múltiples

Variable dependiente: Crecimiento micelial a los 7 días

HSD de Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
10%	7.5%	,000000	,045465	1,000	-,15271	,15271
	5%	,000000	,045465	1,000	-,15271	,15271
	2.5%	-1,170333*	,045465	,000	-1,32305	-1,01762
	1%	-5,253000*	,045465	,000	-5,40571	-5,10029
	0%	-5,300000*	,045465	,000	-5,45271	-5,14729
7.5%	10%	,000000	,045465	1,000	-,15271	,15271
	5%	,000000	,045465	1,000	-,15271	,15271
	2.5%	-1,170333*	,045465	,000	-1,32305	-1,01762
	1%	-5,253000*	,045465	,000	-5,40571	-5,10029
	0%	-5,300000*	,045465	,000	-5,45271	-5,14729
5%	10%	,000000	,045465	1,000	-,15271	,15271
	7.5%	,000000	,045465	1,000	-,15271	,15271
	2.5%	-1,170333*	,045465	,000	-1,32305	-1,01762
	1%	-5,253000*	,045465	,000	-5,40571	-5,10029
	0%	-5,300000*	,045465	,000	-5,45271	-5,14729
2.5%	10%	1,170333*	,045465	,000	1,01762	1,32305
	7.5%	1,170333*	,045465	,000	1,01762	1,32305
	5%	1,170333*	,045465	,000	1,01762	1,32305
	1%	-4,082667*	,045465	,000	-4,23538	-3,92995
	0%	-4,129667*	,045465	,000	-4,28238	-3,97695
1%	10%	5,253000*	,045465	,000	5,10029	5,40571
	7.5%	5,253000*	,045465	,000	5,10029	5,40571
	5%	5,253000*	,045465	,000	5,10029	5,40571
	2.5%	4,082667*	,045465	,000	3,92995	4,23538
	0%	-,047000	,045465	,898	-,19971	,10571
0%	10%	5,300000*	,045465	,000	5,14729	5,45271
	7.5%	5,300000*	,045465	,000	5,14729	5,45271
	5%	5,300000*	,045465	,000	5,14729	5,45271
	2.5%	4,129667*	,045465	,000	3,97695	4,28238
	1%	,047000	,045465	,898	-,10571	,19971

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla 16 Prueba post hoc Tukey del crecimiento micelial (en cm) de *Botrytis cinerea* frente al extracto de *Phyllanthus niruri* en medio de kiwicha al sétimo día

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: Crecimiento micelial a los 7 días

HSD de Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
10%	7.5%	,000000	,635060	1,000	-2,13312	2,13312
	5%	,000000	,635060	1,000	-2,13312	2,13312
	2.5%	-1,544000	,635060	,220	-3,67712	,58912
	1%	-4,511000*	,635060	,000	-6,64412	-2,37788
	0%	-5,300000*	,635060	,000	-7,43312	-3,16688
7.5%	10%	,000000	,635060	1,000	-2,13312	2,13312
	5%	,000000	,635060	1,000	-2,13312	2,13312
	2.5%	-1,544000	,635060	,220	-3,67712	,58912
	1%	-4,511000*	,635060	,000	-6,64412	-2,37788
	0%	-5,300000*	,635060	,000	-7,43312	-3,16688
5%	10%	,000000	,635060	1,000	-2,13312	2,13312
	7.5%	,000000	,635060	1,000	-2,13312	2,13312
	2.5%	-1,544000	,635060	,220	-3,67712	,58912
	1%	-4,511000*	,635060	,000	-6,64412	-2,37788
	0%	-5,300000*	,635060	,000	-7,43312	-3,16688
2.5%	10%	1,544000	,635060	,220	-,58912	3,67712
	7.5%	1,544000	,635060	,220	-,58912	3,67712
	5%	1,544000	,635060	,220	-,58912	3,67712
	1%	-2,967000*	,635060	,006	-5,10012	-,83388
	0%	-3,756000*	,635060	,001	-5,88912	-1,62288
1%	10%	4,511000*	,635060	,000	2,37788	6,64412
	7.5%	4,511000*	,635060	,000	2,37788	6,64412
	5%	4,511000*	,635060	,000	2,37788	6,64412
	2.5%	2,967000*	,635060	,006	,83388	5,10012
	0%	-,789000	,635060	,809	-2,92212	1,34412
0%	10%	5,300000*	,635060	,000	3,16688	7,43312
	7.5%	5,300000*	,635060	,000	3,16688	7,43312
	5%	5,300000*	,635060	,000	3,16688	7,43312
	2.5%	3,756000*	,635060	,001	1,62288	5,88912
	1%	,789000	,635060	,809	-1,34412	2,92212

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla 17. Prueba post hoc Tukey del crecimiento micelial (en cm) de *Botrytis cinerea* frente al extracto de *Minthostachys mollis* en medio de APD al sétimo día

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: Crecimiento micelial a los 7 días

HSD de Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
10%	7.5%	,000000	,059038	1,000	-,19830	,19830
	5%	,000000	,059038	1,000	-,19830	,19830
	2.5%	-2,629000*	,059038	,000	-2,82730	-2,43070
	1%	-4,417333*	,059038	,000	-4,61564	-4,21903
	0%	-5,300000*	,059038	,000	-5,49830	-5,10170
7.5%	10%	,000000	,059038	1,000	-,19830	,19830
	5%	,000000	,059038	1,000	-,19830	,19830
	2.5%	-2,629000*	,059038	,000	-2,82730	-2,43070
	1%	-4,417333*	,059038	,000	-4,61564	-4,21903
	0%	-5,300000*	,059038	,000	-5,49830	-5,10170
5%	10%	,000000	,059038	1,000	-,19830	,19830
	7.5%	,000000	,059038	1,000	-,19830	,19830
	2.5%	-2,629000*	,059038	,000	-2,82730	-2,43070
	1%	-4,417333*	,059038	,000	-4,61564	-4,21903
	0%	-5,300000*	,059038	,000	-5,49830	-5,10170
2.5%	10%	2,629000*	,059038	,000	2,43070	2,82730
	7.5%	2,629000*	,059038	,000	2,43070	2,82730
	5%	2,629000*	,059038	,000	2,43070	2,82730
	1%	-1,788333*	,059038	,000	-1,98664	-1,59003
	0%	-2,671000*	,059038	,000	-2,86930	-2,47270
1%	10%	4,417333*	,059038	,000	4,21903	4,61564
	7.5%	4,417333*	,059038	,000	4,21903	4,61564
	5%	4,417333*	,059038	,000	4,21903	4,61564
	2.5%	1,788333*	,059038	,000	1,59003	1,98664
	0%	-,882667*	,059038	,000	-1,08097	-,68436
0%	10%	5,300000*	,059038	,000	5,10170	5,49830
	7.5%	5,300000*	,059038	,000	5,10170	5,49830
	5%	5,300000*	,059038	,000	5,10170	5,49830
	2.5%	2,671000*	,059038	,000	2,47270	2,86930
	1%	,882667*	,059038	,000	,68436	1,08097

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla 18 Prueba post hoc Tukey del crecimiento micelial (en cm) de *Botrytis cinerea* frente al extracto de *Minthostachys mollis* en medio kiwicha al sétimo día

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: Crecimiento micelial a los 7 días

HSD de Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
10%	7.5%	,000000	,249147	1,000	-,83687	,83687
	5%	-,778333	,249147	,074	-1,61520	,05853
	2.5%	-3,742667*	,249147	,000	-4,57953	-2,90580
	1%	-5,300000*	,249147	,000	-6,13687	-4,46313
	0%	-5,300000*	,249147	,000	-6,13687	-4,46313
7.5%	10%	,000000	,249147	1,000	-,83687	,83687
	5%	-,778333	,249147	,074	-1,61520	,05853
	2.5%	-3,742667*	,249147	,000	-4,57953	-2,90580
	1%	-5,300000*	,249147	,000	-6,13687	-4,46313
	0%	-5,300000*	,249147	,000	-6,13687	-4,46313
5%	10%	,778333	,249147	,074	-,05853	1,61520
	7.5%	,778333	,249147	,074	-,05853	1,61520
	2.5%	-2,964333*	,249147	,000	-3,80120	-2,12747
	1%	-4,521667*	,249147	,000	-5,35853	-3,68480
	0%	-4,521667*	,249147	,000	-5,35853	-3,68480
2.5%	10%	3,742667*	,249147	,000	2,90580	4,57953
	7.5%	3,742667*	,249147	,000	2,90580	4,57953
	5%	2,964333*	,249147	,000	2,12747	3,80120
	1%	-1,557333*	,249147	,000	-2,39420	-,72047
	0%	-1,557333*	,249147	,000	-2,39420	-,72047
1%	10%	5,300000*	,249147	,000	4,46313	6,13687
	7.5%	5,300000*	,249147	,000	4,46313	6,13687
	5%	4,521667*	,249147	,000	3,68480	5,35853
	2.5%	1,557333*	,249147	,000	,72047	2,39420
	0%	,000000	,249147	1,000	-,83687	,83687
0%	10%	5,300000*	,249147	,000	4,46313	6,13687
	7.5%	5,300000*	,249147	,000	4,46313	6,13687
	5%	4,521667*	,249147	,000	3,68480	5,35853
	2.5%	1,557333*	,249147	,000	,72047	2,39420
	1%	,000000	,249147	1,000	-,83687	,83687

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla 19. Prueba post hoc de Tukey del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* frente al extracto de *Phyllanthus niruri* en medio APD al sétimo día

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: Porcentaje de inhibición a los 7 días

HSD de Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
10%	7.5%	,000000	,857034	1,000	-2,87871	2,87871
	5%	,000000	,857034	1,000	-2,87871	2,87871
	2.5%	22,082667*	,857034	,000	19,20396	24,96138
	1%	99,112333*	,857034	,000	96,23362	101,99104
	0%	100,000000*	,857034	,000	97,12129	102,87871
7.5%	10%	,000000	,857034	1,000	-2,87871	2,87871
	5%	,000000	,857034	1,000	-2,87871	2,87871
	2.5%	22,082667*	,857034	,000	19,20396	24,96138
	1%	99,112333*	,857034	,000	96,23362	101,99104
	0%	100,000000*	,857034	,000	97,12129	102,87871
5%	10%	,000000	,857034	1,000	-2,87871	2,87871
	7.5%	,000000	,857034	1,000	-2,87871	2,87871
	2.5%	22,082667*	,857034	,000	19,20396	24,96138
	1%	99,112333*	,857034	,000	96,23362	101,99104
	0%	100,000000*	,857034	,000	97,12129	102,87871
2.5%	10%	-22,082667*	,857034	,000	-24,96138	-19,20396
	7.5%	-22,082667*	,857034	,000	-24,96138	-19,20396
	5%	-22,082667*	,857034	,000	-24,96138	-19,20396
	1%	77,029667*	,857034	,000	74,15096	79,90838
	0%	77,917333*	,857034	,000	75,03862	80,79604
1%	10%	-99,112333*	,857034	,000	-101,99104	-96,23362
	7.5%	-99,112333*	,857034	,000	-101,99104	-96,23362
	5%	-99,112333*	,857034	,000	-101,99104	-96,23362
	2.5%	-77,029667*	,857034	,000	-79,90838	-74,15096
	0%	,887667	,857034	,897	-1,99104	3,76638
0%	10%	-100,000000*	,857034	,000	-102,87871	-97,12129
	7.5%	-100,000000*	,857034	,000	-102,87871	-97,12129
	5%	-100,000000*	,857034	,000	-102,87871	-97,12129
	2.5%	-77,917333*	,857034	,000	-80,79604	-75,03862
	1%	-,887667	,857034	,897	-3,76638	1,99104

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.



Tabla 20. Prueba post hoc de Tukey del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* frente al extracto de *Phyllanthus niruri* en medio kiwicha al séptimo día

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: Porcentaje de inhibición a los 7 días

HSD de Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
10%	7.5%	,000000	11,980777	1,000	-40,24248	40,24248
	5%	,000000	11,980777	1,000	-40,24248	40,24248
	2.5%	29,129000	11,980777	,220	-11,11348	69,37148
	1%	85,115667*	11,980777	,000	44,87319	125,35815
	0%	100,000000*	11,980777	,000	59,75752	140,24248
7.5%	10%	,000000	11,980777	1,000	-40,24248	40,24248
	5%	,000000	11,980777	1,000	-40,24248	40,24248
	2.5%	29,129000	11,980777	,220	-11,11348	69,37148
	1%	85,115667*	11,980777	,000	44,87319	125,35815
	0%	100,000000*	11,980777	,000	59,75752	140,24248
5%	10%	,000000	11,980777	1,000	-40,24248	40,24248
	7.5%	,000000	11,980777	1,000	-40,24248	40,24248
	2.5%	29,129000	11,980777	,220	-11,11348	69,37148
	1%	85,115667*	11,980777	,000	44,87319	125,35815
	0%	100,000000*	11,980777	,000	59,75752	140,24248
2.5%	10%	-29,129000	11,980777	,220	-69,37148	11,11348
	7.5%	-29,129000	11,980777	,220	-69,37148	11,11348
	5%	-29,129000	11,980777	,220	-69,37148	11,11348
	1%	55,986667*	11,980777	,006	15,74419	96,22915
	0%	70,871000*	11,980777	,001	30,62852	111,11348
1%	10%	-85,115667*	11,980777	,000	-125,35815	-44,87319
	7.5%	-85,115667*	11,980777	,000	-125,35815	-44,87319
	5%	-85,115667*	11,980777	,000	-125,35815	-44,87319
	2.5%	-55,986667*	11,980777	,006	-96,22915	-15,74419
	0%	14,884333	11,980777	,809	-25,35815	55,12681
0%	10%	-100,000000*	11,980777	,000	-140,24248	-59,75752
	7.5%	-100,000000*	11,980777	,000	-140,24248	-59,75752
	5%	-100,000000*	11,980777	,000	-140,24248	-59,75752
	2.5%	-70,871000*	11,980777	,001	-111,11348	-30,62852
	1%	-14,884333	11,980777	,809	-55,12681	25,35815

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla 21. Prueba post hoc de Tukey del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* frente al extracto de *Minthostachys mollis* en medio de APD al sétimo día

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: Porcentaje de inhibición a los 7 días

HSD de Tukey

(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
10%	7.5%	,000000	1,114622	1,000	-3,74393	3,74393
	5%	,000000	1,114622	1,000	-3,74393	3,74393
	2.5%	49,603333*	1,114622	,000	45,85941	53,34726
	1%	83,350667*	1,114622	,000	79,60674	87,09459
	0%	100,000000*	1,114622	,000	96,25607	103,74393
7.5%	10%	,000000	1,114622	1,000	-3,74393	3,74393
	5%	,000000	1,114622	1,000	-3,74393	3,74393
	2.5%	49,603333*	1,114622	,000	45,85941	53,34726
	1%	83,350667*	1,114622	,000	79,60674	87,09459
	0%	100,000000*	1,114622	,000	96,25607	103,74393
5%	10%	,000000	1,114622	1,000	-3,74393	3,74393
	7.5%	,000000	1,114622	1,000	-3,74393	3,74393
	2.5%	49,603333*	1,114622	,000	45,85941	53,34726
	1%	83,350667*	1,114622	,000	79,60674	87,09459
	0%	100,000000*	1,114622	,000	96,25607	103,74393
2.5%	10%	-49,603333*	1,114622	,000	-53,34726	-45,85941
	7.5%	-49,603333*	1,114622	,000	-53,34726	-45,85941
	5%	-49,603333*	1,114622	,000	-53,34726	-45,85941
	1%	33,747333*	1,114622	,000	30,00341	37,49126
	0%	50,396667*	1,114622	,000	46,65274	54,14059
1%	10%	-83,350667*	1,114622	,000	-87,09459	-79,60674
	7.5%	-83,350667*	1,114622	,000	-87,09459	-79,60674
	5%	-83,350667*	1,114622	,000	-87,09459	-79,60674
	2.5%	-33,747333*	1,114622	,000	-37,49126	-30,00341
	0%	16,649333*	1,114622	,000	12,90541	20,39326
0%	10%	-100,000000*	1,114622	,000	-103,74393	-96,25607
	7.5%	-100,000000*	1,114622	,000	-103,74393	-96,25607
	5%	-100,000000*	1,114622	,000	-103,74393	-96,25607
	2.5%	-50,396667*	1,114622	,000	-54,14059	-46,65274
	1%	-16,649333*	1,114622	,000	-20,39326	-12,90541

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

Tabla 22. Prueba post hoc de Tukey del porcentaje de inhibición de *Botrytis cinerea* frente al extracto de *Minthostachys mollis* en medio kiwicha al sétimo día

**Comparaciones múltiples**

Variable dependiente: Porcentaje de inhibición a los 7 días

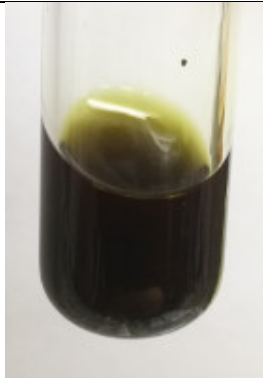

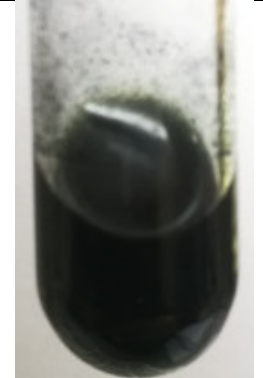
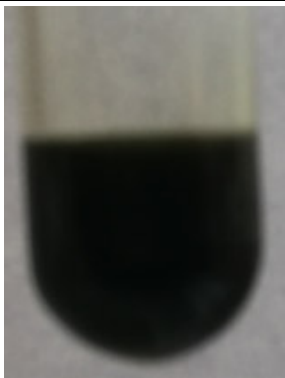
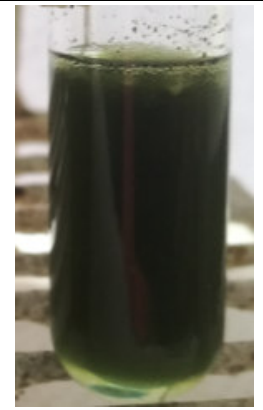

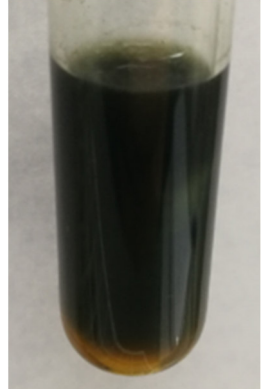

HSD de Tukey

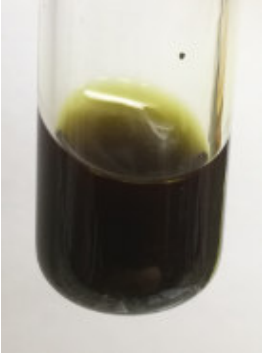





(I) Concentración	(J) Concentración	Diferencia de medias (I-J)	Error típico	Sig.	Intervalo de confianza al 95%	
					Límite inferior	Límite superior
10%	7.5%	,000000	4,700698	1,000	-15,78927	15,78927
	5%	14,686667	4,700698	,074	-1,10261	30,47594
	2.5%	70,623000*	4,700698	,000	54,83373	86,41227
	1%	100,000000*	4,700698	,000	84,21073	115,78927
	0%	100,000000*	4,700698	,000	84,21073	115,78927
7.5%	10%	,000000	4,700698	1,000	-15,78927	15,78927
	5%	14,686667	4,700698	,074	-1,10261	30,47594
	2.5%	70,623000*	4,700698	,000	54,83373	86,41227
	1%	100,000000*	4,700698	,000	84,21073	115,78927
	0%	100,000000*	4,700698	,000	84,21073	115,78927
5%	10%	-14,686667	4,700698	,074	-30,47594	1,10261
	7.5%	-14,686667	4,700698	,074	-30,47594	1,10261
	2.5%	55,936333*	4,700698	,000	40,14706	71,72561
	1%	85,313333*	4,700698	,000	69,52406	101,10261
	0%	85,313333*	4,700698	,000	69,52406	101,10261
2.5%	10%	-70,623000*	4,700698	,000	-86,41227	-54,83373
	7.5%	-70,623000*	4,700698	,000	-86,41227	-54,83373
	5%	-55,936333*	4,700698	,000	-71,72561	-40,14706
	1%	29,377000*	4,700698	,000	13,58773	45,16627
	0%	29,377000*	4,700698	,000	13,58773	45,16627
1%	10%	-100,000000*	4,700698	,000	-115,78927	-84,21073
	7.5%	-100,000000*	4,700698	,000	-115,78927	-84,21073
	5%	-85,313333*	4,700698	,000	-101,10261	-69,52406
	2.5%	-29,377000*	4,700698	,000	-45,16627	-13,58773
	0%	,000000	4,700698	1,000	-15,78927	15,78927
0%	10%	-100,000000*	4,700698	,000	-115,78927	-84,21073
	7.5%	-100,000000*	4,700698	,000	-115,78927	-84,21073
	5%	-85,313333*	4,700698	,000	-101,10261	-69,52406
	2.5%	-29,377000*	4,700698	,000	-45,16627	-13,58773
	1%	,000000	4,700698	1,000	-15,78927	15,78927

\*. La diferencia de medias es significativa al nivel 0.05.

## ANEXO 6. Screening fitoquímico

Tabla 23. Tabla de resultados del ensayo fitoquímico

		Extracto de <i>Phyllanthus niruri</i>	Extracto de <i>Minthostachys mollis</i>
Prueba fitoquímica	Metabolitos (Control)		
Tricloruro férrico	Compuestos fenólicos		
Shinoda	Flavonoides		
Dragendorff	Alcaloides		

		Extracto de <i>Phyllanthus niruri</i>	Extracto de <i>Minthostachys mollis</i>
Prueba fitoquímica	Metabolitos (Control)		
Mayer	Alcaloides		
Afrosimétrica	Saponinas		

## **ANEXO 7. Preparación de medios de cultivos**

### **A) Agar Papa Dextrosa (APD)**

- Agar Papa Dextrosa comercial (Merck) 39 g
- Agua bidestilada 1000 mL

El agua bidestilada se ajusta a pH de 5.6, luego agregar el agar papa dextrosa comercial y finalmente, esterilizar a 121 °C durante 33 minutos.

### **B) Agar Sabouraud Glucosado (ASG)**

- Peptona 10 g
- Glucosa 40 g
- Agar agar 15 g
- Agua bidestilada 1000 mL

Disolver el agar en ebullición, luego agregar la peptona y glucosa. Ajustar el pH a 5.6 y finalmente, esterilizar a 121 °C durante 33 minutos.

### **C) Agar Malta**

- Extracto de malta 20 g
- Agar agar 15 g
- Agua bidestilada 1000 mL

Disolver el agar en ebullición, luego agregar el extracto de malta. Ajustar el pH a 5.6 y finalmente, esterilizar a 121 °C durante 33 minutos.

### **D) Agar con diferentes harinas (kiwicha, kañihua y coca)**

Se tomó como base la preparación del medio de Agar Avena.

- Harina 100 g
- Agar agar 15 g
- Agua bidestilada 1000 mL

Disolver la harina en el agua y hervir hasta desaparecer los grumos, luego filtrar por algodón y gasa y enrasar a un litro. Agregar el agar, ajustar el pH a 5.6 y finalmente, esterilizar a 121 °C durante 33 minutos.

**E) Medio de Agar Papa Dextrosa + extracto de planta estéril a diferentes concentraciones**

- Agar Papa Dextrosa comercial 3.9 g
- Agua bidestilada 100 mL
- Agar agar
- Extracto a diferentes concentraciones

Concentración	Total (mL)	APD comercial (mL)	Extracto (mL)	Agar agar (g)
10%	100 mL	90 mL	10 mL	0.20 g
7.5%	100 mL	92.5 mL	7.5 mL	0.15 g
5%	100 mL	95 mL	5 mL	0.10 g
2.5%	100 mL	97.5 mL	2.5 mL	0.05 g
1%	100 mL	99 mL	1 mL	0.02 g
0%	100 mL	100 mL	0 mL	0 g

El agua bidestilada se ajusta a pH de 5.6, luego agregar el agar papa dextrosa comercial y el agar agar correspondiente para cada concentración. Esterilizar a 121 °C durante 33 minutos y finalmente, agregar el extracto de planta estéril correspondiente para cada concentración y ajustar el pH entre 5.5 a 6.0.

**F) Medio de harina de kiwicha + extracto de planta estéril a diferentes concentraciones**

- Harina de kiwicha 7.5 g
- Agar agar 15 g
- Agua bidestilada 100 mL
- Extracto a diferentes concentraciones

Concentración	Total (mL)	APD comercial (mL)	Extracto (mL)	Agar agar (g)
10%	100 mL	90 mL	10 mL	0.15 g
7.5%	100 mL	92.5 mL	7.5 mL	0.11 g
5%	100 mL	95 mL	5 mL	0.08 g
2.5%	100 mL	97.5 mL	2.5 mL	0.04 g
1%	100 mL	99 mL	1 mL	0.02 g
0%	100 mL	100 mL	0 mL	0 g

Disolver la harina en el agua y hervir hasta desaparecer los grumos, luego filtrar por algodón y gasa y enrasar a 100 mL. Agregar el agar correspondiente para cada concentración, ajustar el pH a 5.6. Esterilizar a 121 °C durante 33 minutos y finalmente, agregar el extracto de planta estéril correspondiente para cada concentración y ajustar pH entre 5.5 a 6.0.