

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**



**“ACTIVIDAD DESINFECTANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO  
DE HOJAS DE *Melia azedarach* Linn EN EL CULTIVO *in vitro*  
DE AJO (*Allium sativum*)”**

**TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:**

**INGENIERO AGRÓNOMO**

**JOAO ALESSANDRO ECHEVARRÍA FLORES**

**LIMA – PERÚ**

**2022**

---

**La UNALM es titular de los derechos patrimoniales de la presente investigación  
(Art 24 Reglamento de Propiedad Intelectual)**

**UNIVERSIDAD NACIONAL AGRARIA**

**LA MOLINA**

**FACULTAD DE AGRONOMÍA**

**“ACTIVIDAD DESINFECTANTE DEL EXTRACTO ETANÓLICO DE HOJAS  
DE *Melia azedarach* Linn EN EL CULTIVO *in vitro* DE AJO (*Allium sativum*)”**

Presentado por:

**JOAO ALESSANDRO ECHEVARRÍA FLORES**

TESIS PARA OPTAR EL TÍTULO DE:

**INGENIERO AGRÓNOMO**

Sustentado y aprobado ante el siguiente Jurado

.....  
PhD. Jorge Castillo Valiente

**PRESIDENTE**

.....  
Dr. Jorge Jiménez Dávalos

**ASESOR**

.....  
Dr. Gastón Zolla Benites

**CO ASESOR**

.....  
PhD. Hugo Soplín Villacorta

**MIEMBRO**

.....  
PhD. Elizabeth Heros Aguilar

**MIEMBRO**

LIMA - PERÚ

2022

## DEDICATORIA

*“A Dios, por ser el creador de todo y darnos la  
posibilidad de explorar su maravillosa creación”*

*“A mis padres, Esther y Juan Carlos, por  
su inmenso amor y su apoyo incondicional  
en todas las etapas de mi vida”*

*“A mi hermana, Evelyn, por enseñarme  
que con perseverancia y sacrificio  
se logran cosas muy importantes”*

*“A mis sobrinos, Gael y Gabriel, por  
quienes deseo hacer de este mundo un  
lugar mejor y que con su llegada a mi vida,  
han hecho de mi mundo un lugar maravilloso”*

*“A todos mis seres queridos que ya no se  
encuentran físicamente conmigo, pero  
siempre los llevo presente en mi corazón”*

## AGRADECIMIENTOS

A mi patrocinador, PhD. Jorge Jiménez Dávalos, y co-patrocinador, PhD. Gastón Zolla Benites por haberme dado la oportunidad de investigar este gran tema en el Programa de Investigaciones de Cereales y Granos Nativos, y haberme brindado todo su apoyo y tiempo en la culminación de este trabajo.

A la profesora, Mg. Sc. Mercedes Flores, por su ayuda en la identificación de árboles de *Melia azedarach* L. en el campus de la Universidad Nacional Agraria La Molina y sus consejos para la investigación.

A la Clínica de Diagnósis, por colaborar en esta investigación con el prestamo de insumos y sus áreas de laboratorio de hongos y nemátodos. Así mismo, agradezco al Blgo. Juan Flores, Mg. Sc. Heidi Huarhua, Mg. Sc. Luis Saire, Mg. Sc. Rin Tsuzuki por contribuir a la mejora de este trabajo con sus conocimientos, y a la Srta. Haydée Miguel y el Sr. Javier Santos por darme las facilidades de utilizar los ambientes.

A mi amiga y partner en esta investigación, Rosario Javier Astete, por ser pieza clave en este trabajo, desarrollando con gran destreza el análisis y filtrado de todos los metabolitos encontrados en los extractos.

A mis amigos del Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigaciones de Cereales y Granos Nativos, Ruthy, William, Ana, Anait, Ángel, Camila, Dayana, Diana, Eva, Gean Carlo, Jhon, José, Lilia, Manuel, Marie, Nancy, Piero, Susan, Typhi y Vladimir por todos sus consejos, apoyo y hacer que mi estancia en el laboratorio sea muy agradable con su compañía.

# ÍNDICE GENERAL

I.	INTRODUCCIÓN .....	1
II.	REVISIÓN DE LITERATURA.....	3
2.1	<i>Melia azedarach</i> L.....	3
2.1.1.	Origen y clasificación taxonómica .....	3
2.1.2.	Morfología .....	4
2.1.3.	Fitoquímica .....	4
2.1.4.	Actividad Antimicrobiana.....	5
2.2	<i>Allium sativum</i> L.....	6
2.2.1.	Origen y clasificación taxonómica .....	6
2.2.2.	Morfología del bulbillo.....	7
2.2.3.	Propiedades y uso .....	8
2.2.4.	Importancia económica.....	8
III.	MATERIALES Y MÉTODOS .....	9
3.1	UBICACIÓN DEL ÁREA EXPERIMENTAL.....	9
3.2	MATERIALES.....	9
3.2.1.	Material vegetal.....	9
3.2.2.	Materiales y equipos de laboratorio.....	10
3.3	METODOLOGÍA.....	11
3.3.1.	Extracción etanólica de hojas de <i>M. azedarach</i> .....	11
3.3.2	Prueba de desinfección en el cultivo in vitro de <i>A. Sativum</i> L.....	13
3.3.3.	Aplicación de los tratamientos.....	14
3.4	DISEÑO EXPERIMENTAL.....	15
3.5	EVALUACIONES EXPERIMENTALES.....	16
3.5.1.	Evaluaciones principales .....	16
3.5.2.	Evaluaciones secundarias .....	16
3.6	METABOLÓMICA.....	17
3.7	AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS PATÓGENOS .....	17
3.7.1.	Hongos .....	17
3.7.2.	Bacterias.....	18
IV.	RESULTADOS Y DISCUSIÓN.....	21
4.1	ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO DE <i>Melia azedarach</i> L.....	21

4.2	EFFECTO DEL EXTRACTO DE <i>M. azedarach</i> L. EN LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO .....	22
4.2.1.	Crecimiento del brote.....	23
4.2.2	Proliferación de raíz.....	24
4.3	ANÁLISIS METABOLÓMICO DEL EXTRACTO DE <i>M. azedarach</i> L. ....	25
4.4	CARACTERIZACIÓN DE PATÓGENOS .....	27
V.	CONCLUSIONES .....	30
VI.	RECOMENDACIONES.....	31
VII.	REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....	32
VIII.	ANEXOS .....	38

## ÍNDICE DE TABLAS

<b>Tabla 1:</b> Insumos, materiales y equipos utilizados en la investigación .....	10
<b>Tabla 2:</b> Tratamientos para desinfectar el bulbillo de ajo .....	14
<b>Tabla 3:</b> Impacto de los tratamientos en el crecimiento del brote .....	24
<b>Tabla 4:</b> Impacto de los tratamientos en la proliferación de raíces .....	24
<b>Tabla 5:</b> Abundancia relativa del Extracto de Melia – H <sub>2</sub> O (1:1) y Extracto de Melia – EtOH 70% (1:1) obtenidos por UHPLC-MS .....	26

## ÍNDICE DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b> Cortes longitudinal y transversal de un bulbillo de ajo mostrando .....	7
<b>Figura 2:</b> Árbol de <i>Melia azedarach</i> L. ....	9
<b>Figura 3:</b> <i>Allium sativum</i> L. variedad Morado Arequipeño. ....	10
<b>Figura 4:</b> Hojas y frutos de <i>Melia azedarach</i> L.....	11
<b>Figura 5:</b> Extracción y concentración de metabolitos de <i>M. azedarach</i> L. ....	12
<b>Figura 6:</b> Desinfección y cultivo in vitro .....	14
<b>Figura 7:</b> Aislamiento de hongos.....	18
<b>Figura 8:</b> Aislamiento de bacterias. ....	19
<b>Figura 9:</b> Efecto desinfectante del extracto.....	21
<b>Figura 10:</b> Tamaño promedio de los explantes y el número de raíces en cada tratamiento a 30 días después de la siembra.....	23
<b>Figura 11:</b> Características morfológicas microscópicas de hongos.....	28
<b>Figura 12:</b> Tinción Gram y prueba de KOH en bacterias. ....	29



## ÍNDICE DE ANEXOS

<b>Anexo 1:</b> Composición de las sales del Medio de cultivo Murashige & Skoog (1962).....	38
<b>Anexo 2:</b> Composición del PDA .....	38
<b>Anexo 3:</b> Composición del Agar Nutritivo .....	38
<b>Anexo 4:</b> Composición del Caldo Nutritivo .....	39
<b>Anexo 5:</b> Ensayo preliminar para identificar el tiempo de inmersión.....	39
<b>Anexo 6:</b> Conservación de bacterias .....	40
<b>Anexo 7:</b> Desinfección de los explantes.....	40
<b>Anexo 8:</b> Hoja evaluación día 10 .....	41
<b>Anexo 9:</b> Hoja evaluación día 20 .....	41
<b>Anexo 10:</b> Hoja evaluación día 30 .....	42
<b>Anexo 11:</b> Raíz evaluación día 10.....	43
<b>Anexo 12:</b> Raíz evaluación día 20.....	44
<b>Anexo 13:</b> Raíz evaluación día 30.....	45

## RESUMEN

La contaminación microbiana es la causa más importante de pérdidas en el cultivo de tejidos vegetales, por ello se utilizan diversos compuestos sintéticos y tóxicos para contrarrestar este problema: Sin embargo, también existen especies como *Melia azedarach* L. con propiedades antimicrobianas, insecticidas y nematocidas que puede ser una alternativa ecológica. El presente trabajo estudió el efecto desinfectante del extracto etanólico de hojas de *Melia azedarach* L. en bulbos de ajos. Se encontró que los tratamientos HgCl 0.1% (Control 1), Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1), Extracto de Melia – EtOH 70% (1:1), Extracto de Melia y EtOH 70% (Control 2) fueron estadísticamente iguales con una asepsia del 100%, 100%, 95%, 90% y 85% respectivamente, y superiores a Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:9) con un 35% de asepsia, evidenciando el poder desinfectante que posee el extracto de Melia en el cultivo de tejidos. El tratamiento con menor concentración del extracto inicial, Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:9), tuvo el mayor porcentaje de contaminación (65%), presentando además todos los patógenos encontrados en los otros tratamientos como los hongos del género *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* y las bacterias Gram-negativa y Gram-positiva. Se realizó un análisis metabolómico no dirigido a Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1) y Extracto de Melia – EtOH 70% (1:1) identificando 100 metabolitos, de éstos se eligieron los 17 compuestos que superan los 25E+06 de abundancia relativa en al menos uno de los extractos. Encontrando al antibiótico y antimicótico (Chalcone) y los fungicidas (Phacidin y Terbinafine). Todos esto muestra el gran potencial de los metabolitos secundarios y abre una gran oportunidad al Perú para explotar su diversidad vegetal y darle un valor agregado.

**Palabras clave:** Cinamomo, biodesinfectante, cultivo de tejidos, metabolómica, hongos, bacterias.

## SUMMARY

Microbial contamination is the most important cause of losses in plant tissue culture, therefore various synthetic and toxic compounds are used to counteract this problema: However, there are species such as *Melia azedarach* L. which have antimicrobial, insecticidal and nematicides properties that could be an ecological alternative. The present work studied the disinfecting effect of the ethanolic extract of leaves of *Melia azedarach* L. in garlic bulbs. It was found that in the treatments HgCl 0.1% (Control 1), Extract of Melia – H<sub>2</sub>O (1:1), Extract of Melia – EtOH 70% (1:1), Extract of Melia and EtOH 70% (Control 2) were statistically equal with an asepsis of 100%, 100%, 95%, 90% and 85% respectively, and superior to Extract of Melia – H<sub>2</sub>O (1:9) with 35% asepsis, evidencing the disinfecting power of the extract of melia in tissue culture. The treatment with the lowest concentration of the initial extract, Extract of Melia – H<sub>2</sub>O (1:9), had the highest percentage of contamination (65%), also presenting all the pathogens found in the other treatments such as fungi of the genus *Penicillium*, *Fusarium* and *Aspergillus* and Gram-negative and Gram-positive bacteria. A non-directed metabolomic analysis was carried out on Extract of Melia - H<sub>2</sub>O (1:1) and Extract of Melia – EtOH 70% (1:1) identifying 100 metabolites, of these the 17 compounds that exceed 25E+06 in abundance relative in at least one of the extracts were chosen. Finding the antibiotic and antifungal (Chalcone) and the fungicides (Phacidin and Terbinafine). All this shows the great potential of secondary metabolites and opens a great opportunity for Peru to exploit its plant diversity to give it added value.

**Key words:** Chinaberry, biodisinfecant, tissue culture, metabolomics, fungi, bacteria.

## I. INTRODUCCIÓN

La contaminación microbiana es la causa más importante de pérdidas en el área de cultivo de tejidos vegetales (Leifert y Woodward, 1998). Según Leifert y Cassells (2001) una amplia variedad de microorganismos (hongos filamentosos, levaduras, bacterias, virus y viroides), patógenos o no de las plantas cultivadas en condiciones naturales, han sido identificados como contaminantes *in vitro*; estos mismos pueden ser introducidos con el explante inicial o durante las manipulaciones en el laboratorio. Esta contaminación biológica se debe a la disponibilidad de nutrientes en el medio de cultivo (Cassells, 2012).

Para lograr el establecimiento del material vegetal de manera exitosa, libre de contaminación, se utilizan agentes desinfectantes, entre los principales tenemos: a) hipoclorito de sodio (NaClO), el más usado por los investigadores por su utilidad como germicida, agente oxidante, tóxico, pero de fácil remoción. b) etanol (C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH) es un esterilizante fuerte pero tóxico para las células vegetales, y c) cloruro de mercurio (HgCl<sub>2</sub>), el más efectivo a bajas concentraciones, sin embargo, es altamente tóxico y muy complicado removerlo mediante el enjuague (Roca y Mroginski, 1993). Dependiendo de la concentración y del tiempo de exposición el etanol y cloruro de mercurio afectan el crecimiento de las plantas en el cultivo de tejidos (Roca y Mroginski, 1993; Singh, 2018), mientras que el hipoclorito de sodio genera cambios a nivel cromosómico (Causil et al., 2017). Después de ser utilizados, los desinfectantes deben ser descartados siguiendo los respectivos protocolos de bioseguridad para reducir cualquier efecto en el medio ambiente. Por esta razón se requieren alternativas de origen biológico y amigables con el medio ambiente.

*Melia azedarach* L. es una especie nativa del Asia tropical que posee propiedades antimicrobianas, insecticidas y nematicidas. Este árbol caducifolio de 5 a 15 metros de altura, pariente cercano de Neem, de la familia Meliaceae, se encuentra ampliamente distribuida en los países tropicales y subtropicales, y contiene alcaloides, terpenoides,

saponinas, glucósidos, compuestos fenólicos y flavonoides que lo hacen candidato para el control de plagas y enfermedades (Kumar et al., 2003; Khan et al., 2008).

Este estudio pretende determinar el efecto del extracto etanólico de hojas de *Melia azedarach* L. en la desinfección de los explantes de ajo, basándose en las investigaciones con respecto a su actividad antibacteriana y antifúngica (Akacha et al, 2016). La propuesta busca ampliar el potencial de uso de los metabolitos secundarios de las plantas y teniendo en cuenta la amplia biodiversidad del país. En este sentido se pretende determinar la concentración adecuada del extracto etanólico de Melia que reemplace al cloruro de mercurio en la desinfección de los explantes en el cultivo *in vitro* del ajo.

Los objetivos que se plantean en el presente estudio son los siguientes:

- Evaluar el efecto desinfectante del extracto etanólico de hojas de *Melia azedarach* L. en explantes de ajo en el cultivo *in vitro*.
- Determinar la respuesta del explante a posibles efectos secundarios ocasionados por el extracto.
- Identificar los metabolitos que proporcionan la actividad desinfectante al extracto.
- Identificar los hongos y bacterias que no pudieran ser controlados.

## II. REVISIÓN DE LITERATURA

### 2.1 *Melia Azedarach* L.

#### 2.1.1. Origen y clasificación taxonómica

*M. azedarach* L. es nativo del Asia tropical y está muy extendido y adaptado en la mayoría de los países tropicales y subtropicales. Se ha introducido y adaptado en Filipinas, Estados Unidos de América, Brasil, Argentina, muchos países africanos y árabes (Khan et al., 2008).

El nombre científico de esta especie proviene del género *Melia*, deriva del griego “μελία” (melía) usado en la antigüedad para *Fraxinus ornus* (fresno de flor) con quien tiene un parecido en las hojas y significa ‘miel’, mientras que *azedarach* proviene del persa “ازادراخت” (āzād dirakht) que significa ‘árbol libre’ y utilizado antiguamente para los árboles venenosos como cinamomo por la toxicidad de sus frutos. Entre sus nombres comunes tenemos a: Cinamomo, Paraíso, Chinaberry, Persian lilac, Umbrella tree, Pride of India.

El Sistema Integrado de Información Taxonómica (ITIS, 2020) indica la siguiente jerarquía taxonómica para la especie:

Reino:	Plantae
División:	Tracheophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Sapindales
Familia:	Meliaceae
Género:	<i>Melia</i>
Especie:	<i>Melia azedarach</i> Linn.

### **2.1.2. Morfología**

Es un árbol caducifolio de unos 10 a 15 m de altura, tronco recto y delgado, con corteza oscura y fisurada, y copa globosa (Hoffmann, 1995). Tiene hojas alternas, normalmente bipinnadas, de hasta 60 cm de longitud, con pinnas de 5–7 folíolos peciolados, ovales, ligeramente dentados, de 2–5 cm de longitud, de color verde oscuro en el haz y más claro en el envés (Pennington y Sarukán, 1998). Las flores se disponen en panículas axilares, colgantes, numerosas, fragantes, de color blanco y violeta, con los estambres reunidos en un tubo central (Roig, 1974). Frutos drupáceos, globosos, de 1 cm de diámetro, amarillo-naranjados al principio, dispuestos en racimos muy ornamentales que permanecen en el árbol todo el invierno, y contienen 4–5 semillas (Fuentes et al., 2001).

### **2.1.3. Fitoquímica**

Las plantas poseen la capacidad de sintetizar metabolitos primarios y secundarios. Los metabolitos primarios desempeñan funciones vitales durante el desarrollo de la planta, mientras que los metabolitos secundarios, aunque no son fundamentales para que un organismo viva, tiene un rol importante en la interacción con su entorno porque permite protegerla contra el estrés, tanto abiótico (alta temperatura, excesos o deficiencia de humedad, lesiones, presencia de metales pesados o sales) como biótico (insectos, hongos, bacterias, nematodos) (Pagare et al., 2015).

Sen y Batra (2012a) afirman que *M. azedarach* L. contiene una serie de moléculas orgánicas, es decir, ácidos grasos saturados e insaturados, hidrocarburos, glucósidos, polisacáridos, compuestos fenólicos, alcaloides, flavonoides, fitosteroles, monoterpenos, triterpenos, sesquiterpenos, aceites esenciales y vitaminas. Se ha detectado gran variedad de compuestos en el extracto de hoja de *M. azedarach* que incluye Kaempferol, Quercetina (Flavonoides), Estigmasterol, Campesterol,  $\beta$ -sitosterol (fitoesteroles), Fitol (Diterpeno), 3-Metildecano, Heptadecano (hidrocarburo alcano), ácido hexadecánico, Ácido pentadecanoico (Ácidos n-alcanoicos), Ácido palmítico (Ácido graso saturado),  $\beta$ -Caroteno, tocoferol (Vitamina-E) y escualeno, 1-eicosanol (triterpeno), 3,7,11,15-Tetrametil-2-hexadecan-1-ol (terpeno alcohol).

#### **2.1.4. Actividad Antimicrobiana**

##### **a. Actividad antibacteriana**

Rhaymah, en el año 2006, estudió la actividad antibacteriana del extracto de hoja cruda de *M. azedarach* contra cepas bacterianas, Gram-negativa y Gram-positiva, utilizando el método de difusión en disco. La inhibición significativa se mostró con acetato de etilo y extractos acuosos de *M. azedarach*.

Otro estudio, fue llevado a cabo por Khan et al., en el 2011, sobre el potencial antibacteriano de los extractos polares y no polares de las semillas de *M. azedarach* contra dieciocho cepas aisladas de bacterias patógenas en seres humanos. Todos los extractos mostraron una actividad antibacteriana significativa, siendo el extracto de acetato de etilo el que presentó la más alta inhibición.

##### **b. Actividad antifúngica**

Distintos extractos de hojas de *M. azedarach*, se obtuvieron con los solventes: metanol, etanol, éter de petróleo y agua, y se probaron para ver la actividad antifúngica frente a *Aspergillus Níger*, *Aspergillus flavus*, *Fusarium oxysporum* y *Rhizopus stolonifer* (Sen y Batra, 2012b). Se demostró que los extractos alcohólicos obtuvieron la zona máxima de inhibición y la concentración mínima inhibitoria contra todos los microorganismos, mientras que el éter de petróleo y extracto acuoso mostraron la zona de inhibición más baja.

Akacha et al, en el año 2016, demostraron una importante actividad antifúngica del extracto etanólico de la hoja de *M. azedarach* con Phenotype MicroArrays (PM) en *Alternaria alternata* y *Fusarium solani*. Asimismo, con el método del disco, se exhibió un efecto inhibitorio significativo del extracto sobre *Fusarium oxysporum* f. sp. *melonis*, *F. sambucinum*, *F. oxysporum* f. sp. *lycopersici* y *Botrytis cinerea*, donde la concentración más alta obtuvo una inhibición del crecimiento del micelio de 8%, 19%, 36% y 38%, respectivamente.



### **c. Actividad antiviral**

El estudio realizado por Wachsman (1998), encontró que "Meliacina", un péptido aislado de hojas de *M. azedarach* L., inhibe la multiplicación de virus de la fiebre aftosa. Además, Alché et al., en el 2003, reportaron que "Meliacarpina", otro compuesto encontrado en el extracto purificado de hojas de *M. azedarach* L., inhibe la estomatitis vascular y la multiplicación del virus del herpes simple tipo 1 *in vitro* cuando se agrega después de la infección sin efectos citotóxicos.

## **2.2 *Allium Sativum* L.**

### **2.2.1. Origen y clasificación taxonómica**

El ajo es una planta de nombre científico *Allium sativum*, el término *Allium* procede de la palabra *All*, que significa “ardiente o caliente” mientras que el nombre “*sativum*” procede del latín que significa “cultivado”. Tiene origen en Asia Central, en estado silvestre se encuentra en la India, el Cauca y en la parte occidental, desde Asia Central, a través de Asia Menor y Egipto, se difundió por toda Europa, de donde pasó a África y luego del descubrimiento, a América (García y Sánchez-Muniz, 2000; Navarro, 2007).

ITIS, en el 2020, indica la siguiente jerarquía taxonómica para la especie es:

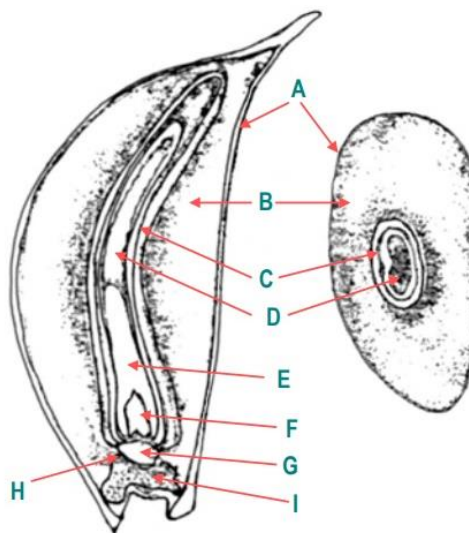
Reino:	Plantae
División:	Tracheophyta
Clase:	Magnoliopsida
Orden:	Asparagales
Familia:	Amaryllidaceae
Género:	<i>Allium</i>
Especie:	<i>Allium sativum</i> Linn.

### 2.2.2. Morfología del bulbillo

El bulbo de ajo está conformado por varios bulbillos o “dientes”, cuyo número, tamaño, forma y color depende de la variedad o del cultivar al que pertenece. Burba (2003) indica que cada “diente” es un bulbo en potencia, y está formado desde afuera hacia dentro por:

- Hoja de protección: Es una vaina (carece de lámina), envolvente y lignificada, que por lo general está coloreada.
- Hoja de reserva: Se trata de un tejido compacto que representa más del 85% del peso del bulbo. Las reservas acumuladas en ella serán utilizadas para la brotación del nuevo ejemplar.
- Hoja de brotación: es la responsable de proteger al nuevo brote durante la emergencia. Tiene forma tubular (carece de lámina), y su crecimiento se inhibe ante la luz, dejando pasar a las hojas verdaderas.
- Hojas verdaderas: Son aquellas que poseen lámina, y que pueden ser estériles o fértiles.

Todas estas hojas están apoyadas sobre su propio disco, del cual emergen raíces en forma de cabellera (Figura 1).



**Figura 1:** Cortes longitudinal y transversal de un bulbillo de ajo mostrando

A: hoja membranosa que envuelve al bulbillo; B: hoja de reservas nutritivas; C: hoja de brotación; D: primera hoja completa; E: segunda hoja completa; F: tercera hoja completa; G: disco de la futura planta; H: inicio de formación de raíces; I: zona de separación del bulbo madre (Burba, 2003).

### **2.2.3. Propiedades y uso**

Una de las propiedades más relevantes del ajo es la regulación del metabolismo de las grasas y la reducción del colesterol y del azúcar en la sangre. El consumo diario de uno o dos dientes de ajo en crudo reduce un 10% la tasa de colesterol negativo y aumenta el colesterol positivo. Es rico en aminoácidos esenciales, minerales, vitaminas B6 y C, azúcares como fructuosas y glucosa, entre otros. Además, contiene fósforo, silicio, azufre, y otros oligoelementos que lo hacen sumamente benéfico para el tratamiento de las enfermedades asociadas al envejecimiento (MINAGRI, 2011)

### **2.2.4. Importancia económica**

Según el portal Agraria.pe, las exportaciones de ajos el 2017 para el Perú fueron de un total de 11.641.028 kg con un valor de US\$ 18.168.059. Estos valores revelan un ligero decrecimiento en comparación al 2016, cuando se exportaron 12.548.609 kilos por un valor de US\$ 19.298.131. El principal mercado para los ajos peruanos durante el 2017 fue México, donde se lograron colocaciones por un valor de US\$ 6.155.249. A continuación, figuraron Estados Unidos (US\$ 4.980.447), Ecuador (US\$ 4.596.249), Brasil (US\$ 1.336.282), España (US\$ 437.427), Australia (US\$ 177.100), Países Bajos (US\$ 159.400), Reino Unido (US\$ 112.723), Colombia (US\$ 73.974), Chile (US\$ 20.429) y otros con cifras menores que juntos sumaron US\$ 118.779 (Agraria.pe, 2018).

MINAGRI (2018) reportó en el mes de enero del 2018 hubo un crecimiento de 2.5 millones de soles en el valor bruto de la producción con relación al similar mes del año 2017, así mismo, evidenció un incremento de 2,400 toneladas de producción. El aumento es aproximadamente un 60 por ciento.

### III. MATERIALES Y MÉTODOS

#### 3.1 UBICACIÓN DEL ÁREA EXPERIMENTAL

El presente experimento se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del Programa de Investigación y Proyección Social en Cereales y Granos Nativos de la Universidad Nacional Agraria La Molina, ubicada en el Departamento de Lima, Provincia de Lima, localizada a  $76^{\circ}56'37.41''$ (O) y  $12^{\circ}4'40.22''$ (S), a una altitud de 245 msnm.

#### 3.2 MATERIALES

##### 3.2.1. Material vegetal

###### a. Hojas de *M. azedarach* L.

Las hojas fueron tomadas de los árboles de Melia que están ubicados dentro del campus universitario de la Universidad Nacional Agraria La Molina (Figura 2).



**Figura 2:** Árbol de *Melia azedarach* L.

### b. Bulbos de *A. sativum* L.

Los bulbos de ajo de la variedad Morado Arequipeño fueron adquiridas en el Gran Mercado Mayorista de Lima, procedentes de Arequipa (Figura 3).



**Figura 3:** *Allium sativum* L. variedad Morado Arequipeño.

### 3.2.2. Materiales y equipos de laboratorio

**Tabla 1:** Insumos, materiales y equipos utilizados en la investigación

Insumos	Materiales	Equipos de laboratorio
Etanol al 97%	Tijera de podar	Estufa
Agua potable	Bolsas de papel	Incubadora
Agua destilada	Papel aluminio	Balanza de precisión
Sacarosa	Papel filtro	Extractor Soxhlet
Agar	Clips	Destilador simple
KOH al 3%	Paquetes de hielo en gel	Manto calefactor
Lugol	Termómetro	Autoclave
Fucsina	Mechero de alcohol	Microondas
Violeta de Genciana	Placas de Petri	Cámara de crecimiento
Alcohol – Acetona (1:1)	Vaso medidor	Agitador magnético
Cloruro de mercurio (HgCl <sub>2</sub> )	Matraz de Kitasato	Refrigeradora
Lactophenol cotton blue	Tubos de ensayo de vidrio	Microscopio
Medio de cultivo Murashige & Skoog (MS) (ANEXO 1)	Frascos de vidrio transparente	Estereoscopio
Medio de cultivo Papa – Dextrosa – Agar (© Liofilchem®) (ANEXO 2)	Frascos de vidrio color ámbar	Cabina de seguridad biológica Clase II tipo A2
Medio de cultivo Agar Nutritivo (Difco™) (ANEXO 3)	Balón de fondo redondo de 500 mL	Cabina de flujo laminar horizontal
Caldo nutritivo (Extracto de Res – Peptona) (ANEXO 4)	Balón de fondo redondo de 1000 mL	Medidor de pH inalámbrico
	Hojas de bisturí n° 10	
	Mango de bisturí n° 3	
	Asa bacteriológica	
	Porta y cubre objeto	
	Pinza	
	Parafilm	
	Cámara digital	
	Cuaderno de notas	

### 3.3 METODOLOGÍA

#### 3.3.1. Extracción etanólica de hojas de *M. azedarach*

##### a. Colección y secado de hojas

Se colectaron 800 g de hojas maduras y sanas (Figura 4), que se encontraban en el tercio medio de la rama del árbol, evitando las hojas jóvenes (apicales) o senescentes (basales). Posteriormente se lavaron las hojas y fueron colocadas en bolsas de papel que se llevaron a la estufa a 55°C por 3 días. Después del secado, se trituraron hasta conseguir un polvo grueso, y se obtuvo un peso total de 460 g.



**Figura 4:** Hojas y frutos de *Melia azedarach* L.

Crédito: University of North Carolina at Chapel Hill Herbarium (NCU), NCU Accession #458110

##### b. Extracción con etanol

Para realizar la extracción, se formaron paquetes con papel filtro y clips, y en cada uno se colocaron 20 g. del material seco. El paquete se introdujo dentro de la cámara extractora del Soxhlet juntamente con 300 mL de etanol y el extracto se colectó en el balón de fondo redondo de 500 mL. La temperatura del manto calefactor fue de 78°C, el calor necesario para conseguir la evaporación del disolvente. Se utilizó agua fría como refrigerante. Cada



### **3.3.2 Prueba de desinfección en el cultivo in vitro de A. Sativum L.**

#### **a. Medio de cultivo**

Para el crecimiento y nutrición del explante se empleó las sales del medio de cultivo MS (Murashige y Skoog, 1962) al 50 por ciento y suplementado con 30 g/L de sacarosa, 6 g/L de agar y ajustado a un pH de 5.6. Luego se vertió 15 mL del medio de cultivo en cada tubo de ensayo y se autoclavaron a la temperatura de 121°C y 1 atm de presión, durante 15 minutos.

#### **b. Selección del material**

Se seleccionaron dientes de ajo de la variedad Morado Arequipeño que se encontraban libres de signos o síntomas de enfermedades, así como de daño mecánico.

#### **c. Preparación del material**

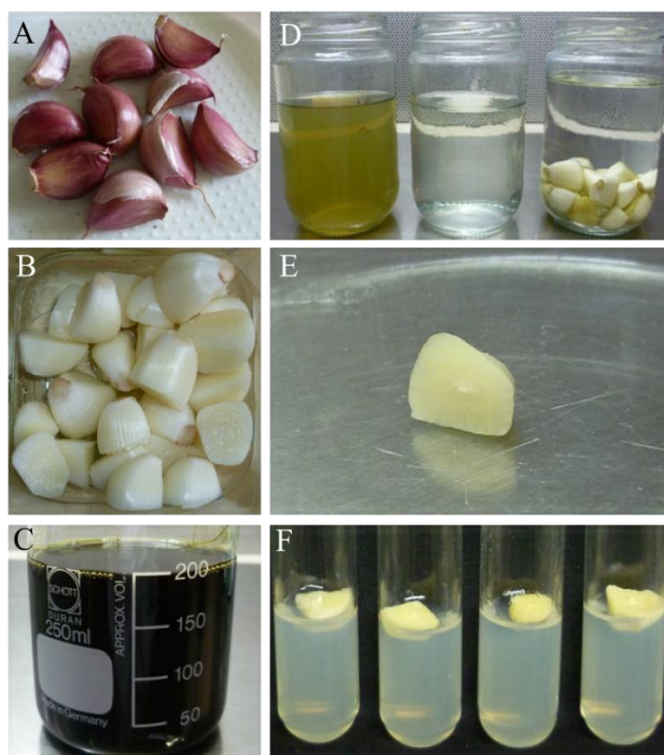
Los dientes se cortaron de manera transversal por la mitad y se les retiró la cáscara, se utilizó la mitad inferior donde se encuentra la hoja de brotación, las hojas funcionales, el disco de la futura planta y los primordios radicales. Posteriormente se enjuagaron tres veces con agua destilada para eliminar cualquier resto que haya quedado del agente desinfectante.

#### **d. Desinfección**

Los explantes se sumergieron por 10 minutos en el tratamiento Cloruro de mercurio al 0.1% y el resto de los tratamientos con extracto de Melia por 15 minutos (este tiempo fue determinado en un ensayo preliminar). Seguidamente los explantes fueron enjuagados tres veces con agua destilada estéril, después pasaron a una placa Petri esterilizada para ser reducidos de diez a quince milímetros con un bisturí, consecutivamente con una pinza esterilizada se sembraron los explantes dentro del medio de cultivo Murashige y Skoog contenidos en tubos de ensayo, y después fueron sellados con parafilm para evitar el ingreso de agentes contaminantes.

Finalmente, para el desarrollo de los explantes se incubaron en un cuarto de crecimiento a 24°C con un fotoperiodo de 16/8 horas de luz/oscuridad y una intensidad lumínica de 2000 lux.





**Figura 6:** Desinfección y cultivo in vitro

A. Dientes de ajo, B. Dientes de ajo lavados sin cascara y cortados a la mitad, C. Inmersión de los dientes de ajo en el extracto de Melia, D. Triple lavado en agua destilada autoclavada, E. Explante final para siembra in vitro, F. Explantes en medio de cultivo.

### 3.3.3. Aplicación de los tratamientos

La Tabla 2 describe los tratamientos utilizados para la desinfección de los bulbillos de ajo.

**Tabla 2:** Tratamientos para desinfectar el bulbillo de ajo

Tratamiento	Descripción
T0 (Control 1)	Cloruro de mercurio al 0.1%
T1 (Control 2)	Etanol al 70%
T2	Extracto de Melia sin dilución
T3	Extracto de Melia – Etanol al 70 % (1:1)
T4	Extracto de Melia – H <sub>2</sub> O (1:1)
T5	Extracto de Melia – H <sub>2</sub> O (1:9)

Todos los tratamientos con dilución, a excepción de T3, fueron enraizados con H<sub>2</sub>O destilada y autoclavada hasta un volumen de 100 mL.

### 3.4 DISEÑO EXPERIMENTAL

El diseño estadístico utilizado fue el Diseño Completamente al Azar (DCA) con seis tratamientos, 20 repeticiones, cada una con un explante (unidad experimental).

#### Modelo Aditivo Lineal:

$$y_{ij} = \mu + \tau_i + \epsilon_{ij}$$

Dónde:

$y_{ij}$ : es el valor observado por el efecto de la  $i$ -ésima concentración de desinfectante en la  $j$ -ésima repetición.

$\mu$ : es el efecto de la media general.

$\tau_i$ : es el efecto de la  $i$ -ésima concentración de desinfectante.

$\epsilon_{ij}$ : es el efecto del error experimental de la  $i$ -ésima concentración de desinfectante en la  $j$ -ésima repetición.

La distribución normal y la homogeneidad de las varianzas se probaron con la prueba de Shapiro-Francia y la prueba de Levene, respectivamente. Como los datos no tenían una distribución normal, se utilizó la prueba no paramétrica de Kruskal-Wallis y se realizaron comparaciones múltiples de medias calculadas mediante la prueba post-hoc de Dunn (con la metodología Benjamini-Hochberg para el ajuste del valor  $p$ ). Se aplicó un nivel de significancia de 0.05 en todas las pruebas. Para todos los análisis se utilizó el programa estadístico R versión 4.0.0.

La prueba estadística simplificada de Kruskal-Wallis es:

$$H = \frac{12}{N(N+1)} \sum_{i=1}^a \frac{R_i^2}{n_i} - 3(N+1)$$

Donde:

$R$ : es el rango asignado a cada valor observado ( $y$ ); clasificado en orden ascendente y la observación más pequeña recibe el rango 1.

$R_i$ : es la sumatoria de los rangos en la  $i$ -ésima concentración de desinfectante.

$n_i$ : es el número de observaciones en la  $i$ -ésima concentración de desinfectante.

$N$ : es el número total de observaciones.

### **3.5 EVALUACIONES EXPERIMENTALES**

#### **3.5.1. Evaluaciones principales**

Las variables evaluadas fueron las siguientes:

##### **a. Desinfección**

Es determinado por la ausencia de micelio y/o halo bacteriano en el explante y/o medio de cultivo. Se expresó en porcentaje.

- **Contaminación por hongos**

Se definió solo por la presencia de micelio en el explante y/o medio de cultivo. Se expresó en porcentaje.

- **Contaminación por bacterias**

Se determinó por la presencia de halo bacteriano en el medio de cultivo. Se expresó en porcentaje.

#### **3.5.2. Evaluaciones secundarias**

Con el fin de ver si el extracto tuvo un efecto secundario en el desarrollo del explante se efectuaron las siguientes evaluaciones, cada 48 horas:

##### **a. Crecimiento del brote**

La evaluación se realizó con la ayuda de una regla milimetrada, se tomó la medida de la hoja principal desde el corte del diente hasta el ápice de la hoja. Se expresó en milímetros.

##### **b. Proliferación de raíces**

Se contabilizaron visualmente las raíces que emergieron del diente de ajo. Se expresó en unidades.

### **3.6 METABOLÓMICA**

El servicio de metabolómica fue dado por Creative-Proteomics (<https://www.creative-proteomics.com>) en los Estados Unidos de Norteamérica. Las muestras para el análisis del “Ext de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1)” y “Ext de Melia – Etanol al 70% (1:1)” fueron preparados a partir del Extracto etanólico inicial. Para el análisis se tomaron 100µL de cada muestra.

Los metabolitos de los extractos se analizaron en el sistema de cromatografía líquida de ultra alta performance (UHPLC) serie Dionex – LTQ-Orbitrap system. Para la separación se usó la columna Waters BEH C18 (5cm x 2.1 mm x 1.7 um) a 50°C de temperatura. El volumen de inyección fue de 5µL. Las fases móviles fueron solvente A (ácido fórmico al 0.1% en agua) y solvente B (0.1% de ácido fórmico en acetonitrilo – isopropanol, 1:2). El flujo fue de 0.4 mL/min y el gradiente cromatográfico del solvente A es 96% en el primer minuto, va bajando de 96% a 60% hasta llegar a los 10 minutos y llega a 0% a los 30 minutos. La concentración del solvente B es complementario a A durante la corrida. En el espectrómetro de masa (MS): el rango de escaneo de masa de 70 a 1800m/z, el voltaje de capilaridad fue de 3000V (modo positivo) y 2000V (modo negativo), fragmentor 175V, la temperatura de capilaridad fue seteado a 450°C, y el flujo de gas continuo 0.3mL/min. La data cruda fue anotada con el software XCMS en función de su m/z (masa) y el tiempo de retención (RT) de la señal de los iones. La base de datos de Mass Bank fue utilizada para la identificación de los metabolitos.

### **3.7 AISLAMIENTO E IDENTIFICACIÓN DE LOS PATÓGENOS**

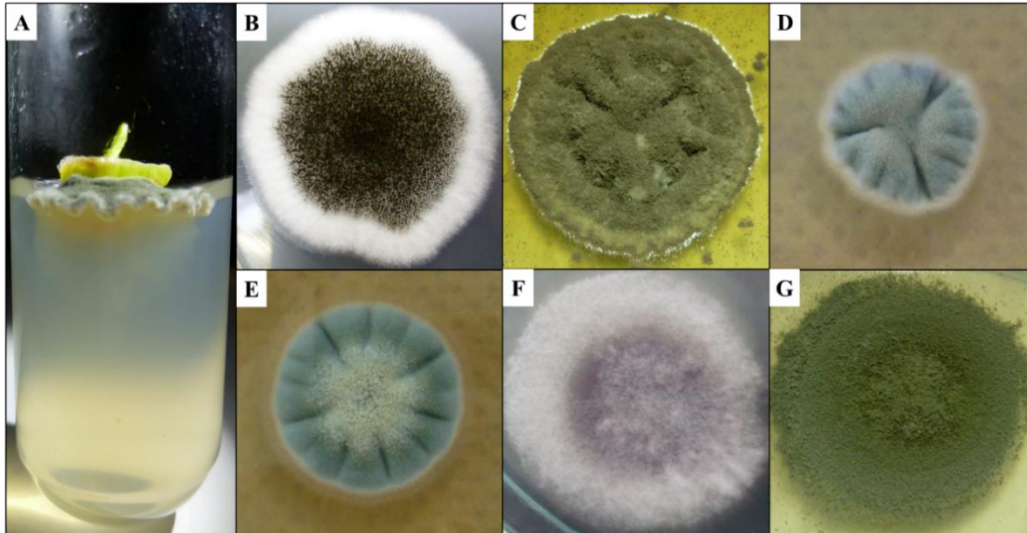
Con la finalidad de conocer aquellos microorganismos que no lograron ser controlados, se procedió a aislarlos del medio de cultivo para ser identificados posteriormente.

#### **3.7.1. Hongos**

##### **a. Aislamiento**

Para su aislamiento, dentro de la cabina de seguridad biológica, se picó con un asa de Kohle al tubo con micelio y se llevó a la placa Petri con medio de cultivo de Papa – Dextrosa – Agar (PDA) y se realizó cuatro veces en puntos distintos del medio contaminado para tener la mayor representatividad de los posibles hongos. Se llevaron a incubar a 25°C en oscuridad por cuatro días. Aquellas placas que presentaron colonias con características morfológicas

macroscópicas diferentes (color, forma, estrías, coloración del medio de cultivo) se volvieron a aislar (Figura 7). La conservación del material aislado se realizó en placas con PDA a 10°C.



**Figura 7:** Aislamiento de hongos.

A. Explante contaminado por hongos, B-G. Hongos aislados en PDA para su posterior identificación.

## **b. Identificación**

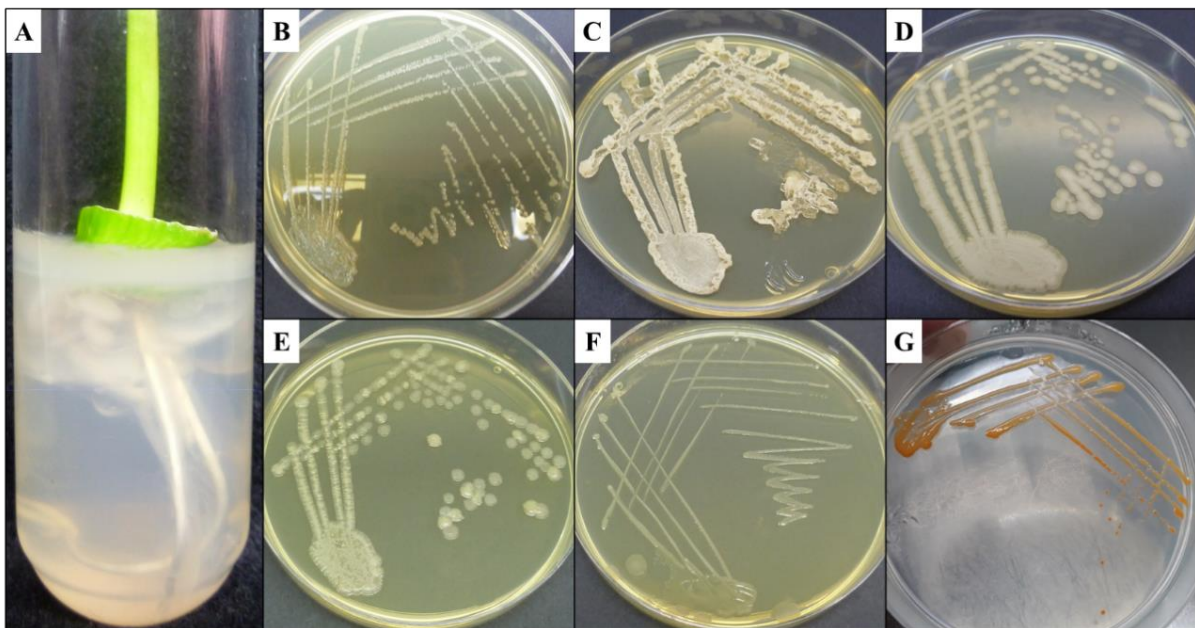
La identificación se realizó colocando en el centro de un portaobjeto una gota de Lactophenol cotton blue, un tinte de contraste, en ella se introdujo con el asa de Kohle una muestra de hifas de la parte externa de la colonia, las hifas de esta zona son jóvenes y no se quiebran fácilmente (Aneja, 2007). Posteriormente se llevó al microscopio con cámara incorporada para desagregar las hifas en el líquido, luego se colocó el cubreobjeto y se procedió a buscar las características que nos permite identificar el género según las llaves de identificación de Barnett y Hunter (1986).

## **3.7.2. Bacterias**

### **a. Asilamiento**

Las bacterias fueron aisladas desde los tubos con halo bacteriano haciéndole perforaciones con el asa de Kohle al medio contaminado, después se le adicionó tres mililitros de medio líquido Extracto de Res – Peptona (Caldo Nutritivo), se agitó suavemente y seguidamente se dejó reposar por cinco minutos, se extrajo 1.5 mL de caldo con bacterias a un vial, luego se cogió 30 microlitros para adicionarse a una placa Petri con medio de cultivo de Extracto de

Res – Peptona – Agar (Agar Nutritivo) y ser esparcido con una espátula de Drigalski (Qiu et al., 2018). Posteriormente se llevó a incubación a 37°C por 12 horas o 24 horas, dependiendo de la aparición de las colonias, seguido se tomó un grupo de colonias y se realizó la técnica de estriado por agotamiento para una mayor separación de colonias y poder apreciar las diferentes características morfológicas macroscópicas (forma, tamaño, color) de las bacterias dentro de una misma muestra después de la incubación. Para cada colonia diferente se efectuó la técnica de estriado por agotamiento y la incubación se repitió hasta la obtención de colonias idénticas en una placa con agar nutritivo (Figura 8). La conservación del material aislado se encuentra en el ANEXO 6.



**Figura 8:** Aislamiento de bacterias.

A. Explante contaminado por bacterias, B-G. Bacterias aisladas en Agar nutritivo por la técnica de agotamiento.

## **b. Identificación**

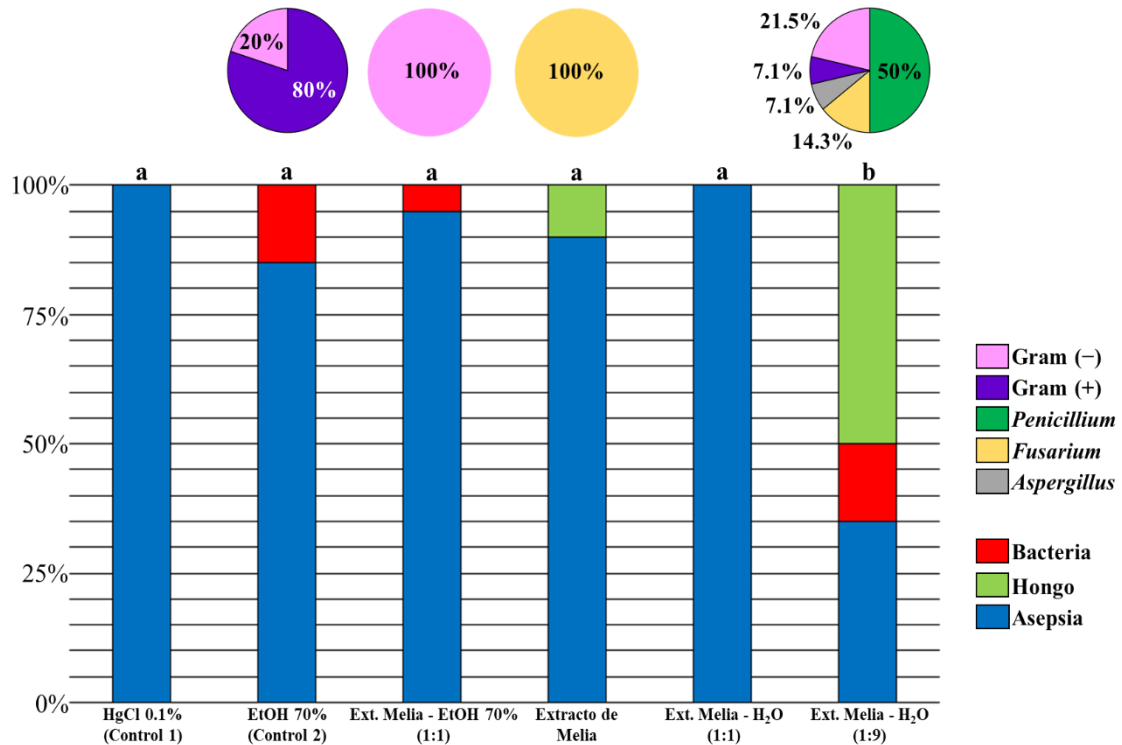
La tinción Gram fue la técnica escogida para la caracterización fenotípica de las bacterias, la coloración de la pared celular a través de la violeta de genciana y safranina generan un contraste para su diferenciación. Las bacterias Gram-positiva se identifican por reflejar el color morado, ello es debido a sus capas gruesas de peptidoglucano (90% de la pared celular) en sus células y las bacterias Gram-negativa tienen paredes celulares con capas delgadas de peptidoglucano (10% de la pared celular) y alto contenido de lípidos, estos se tiñen de rojizo. Algunas bacterias no se tiñen como se espera al realizar la tinción Gram (Smith y Hussey, 2005).

Los resultados se corroboraron con la prueba de KOH. Las bacterias Gram-negativa producen una reacción positiva en el hidróxido de potasio porque sus paredes celulares se rompen fácilmente cuando se exponen a soluciones alcalinas y al separar el asa de Kohle de la placa se genera una hebra o hilo al volverse viscoso por la liberación de ADN. En las bacterias Gram-positiva no existe ninguna reacción (no viscoso) (Powers, 1995).

## IV. RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### 4.1 ACTIVIDAD ANTIBACTERIANA Y ANTIFÚNGICA DEL EXTRACTO DE *Melia azedarach* L.

La resistencia que desarrollan los microorganismos es un fenómeno natural pero el mal uso y el uso excesivo de antimicrobianos acelera este proceso; esto significa una amenaza global significativa para la salud pública, la seguridad alimentaria y la inocuidad de los alimentos, así como para la vida, la producción animal y el desarrollo económico y agrícola. La intensificación de la producción agrícola ha llevado a un uso creciente de antimicrobianos, y se espera que se duplique en 2030 (FAO, 2017). Esta demanda no es ajena a la industria de cultivo de tejidos vegetales. En tal sentido se evaluó *in vitro* la eficacia de los diferentes tratamientos a base de extracto de *Melia* en la desinfección de dientes de ajo.



**Figura 9:** Efecto desinfectante del extracto.

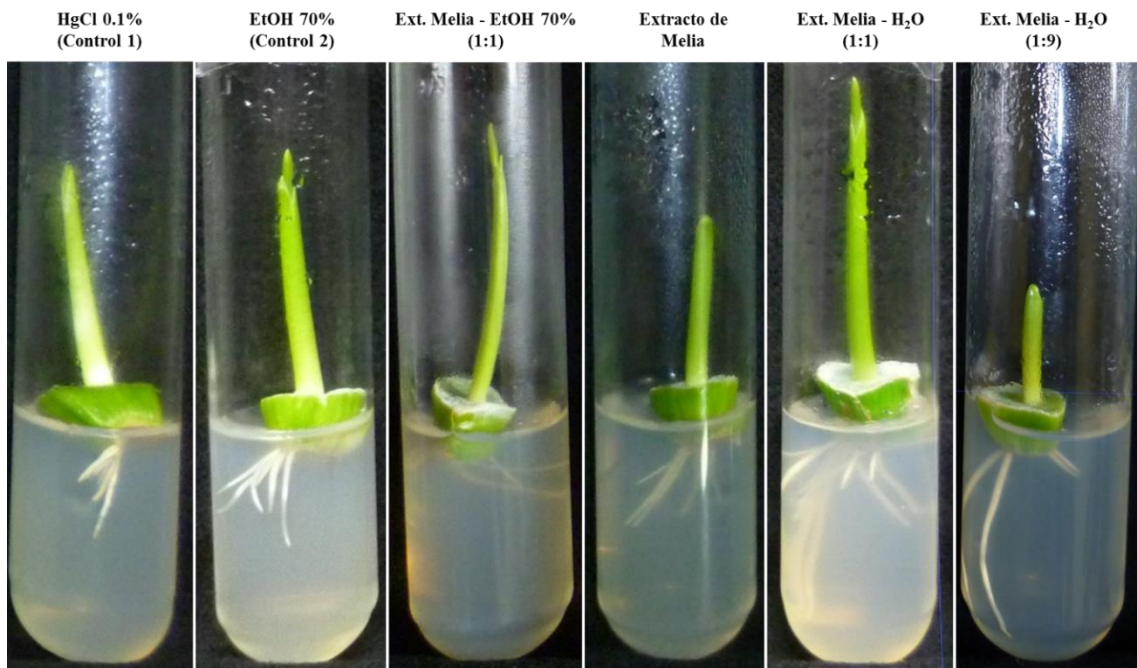
Las diferencias significativas se representan con letras (Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn,  $p < 0.05$ )



La figura 9 muestra los resultados de la desinfección en los explantes de ajo *in vitro*. En los tratamientos con HgCl 0.1% (Control 1) y Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1) se evidenció un 100% de asepsia en todos los explantes evaluados a los 30 días después la siembra. Con el Extracto de Melia – EtOH 70% (1:1) se observó solamente un 5% de contaminación. Esta contaminación fue bacteriana y se debió únicamente a bacterias Gram-negativa. En el control 2 (EtOH 70%) se incrementó la contaminación al 15% y no se observó presencia de hongos. En este tratamiento el 80% de la contaminación se debió a bacterias Gram-positiva y un 20% fue a bacterias Gram-negativa. El Extracto de Melia tuvo una asepsia del 90% y solamente presentó contaminación por hongos del género *Fusarium*. Mientras que el Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:9) tuvo una contaminación del 65% y se debió a hongos (71.4%) y a bacterias (28.6%). Los hongos presentes en este tratamiento fueron *Penicillium* (50%), *Fusarium* (14.3%) y *Aspergillus* (7.1%). A nivel bacteriano, se encontró en un 21.5% a las Gram-negativa y 7.1% de Gram-positiva. Vanzela et al., en el 2020, recolectaron muestras sanas de ajo (sin signos de alguna enfermedad) en los mercados de 12 estados de Brasil y encontraron en 32 muestras (de 36) infección fúngica con una predominancia de los géneros *Aspergillus* (50.3%), *Penicillium* (34.7%) y *Fusarium* (11%) a pesar de ser desinfectadas superficialmente con hipoclorito de sodio y el fungicida Dicloran al 18%. *Aspergillus restrictus* fue reportado como endófito de ajo (Ortega et al., 2020), además se ha puesto en conocimiento los aislamientos de las especies *Penicillium allii* (Valdez et al., 2006) y *Fusarium proliferatum* (Palmero et al., 2012) en este cultivo. Los tres géneros mencionados y muchos otros han sido reportados como hongos endófitos de cultivos de la familia Amaryllidaceae. (Caruso et al., 2020). Por otra parte, en China fueron reportadas 35 bacterias endófitas de bulbos sanos de ajo (Wang et al., 2019), mientras que en Brasil se reportaron 48 bacterias endófitas, 31 fueron Gram-positiva y 17 Gram-negativa (Costa Júnior et al., 2020).

#### **4.2 EFECTO DEL EXTRACTO DE *M. azedarach* L. EN LA PROMOCIÓN DE CRECIMIENTO**

El crecimiento de las hojas y la producción de raíces en el explante luego de la desinfección son muy importantes para determinar el efecto del extracto sobre el desarrollo del explante. Por ello, se cuantificó el tamaño del brote y el número de raíces para compararse con los testigos (Figura 10).



**Figura 10:** Tamaño promedio de los explantes y el número de raíces en cada tratamiento a 30 días después de la siembra.

#### 4.2.1. Crecimiento del brote

A los 10 días no se observaron diferencias significativas en el crecimiento de los brotes (Tabla 3). Sin embargo, a los 20 días, los explantes desinfectados con el Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1) presentaron el mayor crecimiento (19.10 mm), sin diferencias significativas con Extracto de Melia – EtOH 70% (1:1) ni con EtOH 70% (Control 2) y este incremento en el crecimiento fue significativo versus los tratamientos Extracto de Melia, Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:9) y HgCl 0.1% (Control 1) con unas medias de 10.50 mm, 9.20 mm y 8.60 mm, respectivamente. En el Día 30, los tratamientos con mayor crecimiento fueron Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1), Extracto de Melia – EtOH 70% (1:1), EtOH 70% (Control 2) y HgCl 0.1% (Control 1) con medias de 46.30 mm, 44.15 mm, 41.45 mm y 38.50 mm respectivamente, sin diferencias significativas entre sí. Los tratamientos con menor crecimiento fueron Extracto de Melia y Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:9) con medias de 26.60 mm y 16.80 mm, respectivamente.

**Tabla 3:** Impacto de los tratamientos en el crecimiento del brote

Tratamientos	Longitud del brote (mm)		
	Día 10	Día 20	Día 30
HgCl 0.1% (Control 1)	1.80 ± 0.14a	08.60 ± 0.62b	38.50 ± 4.56a
EtOH 70% (Control 2)	1.70 ± 0.38a	13.20 ± 2.28ab	41.45 ± 7.03a
Ext. Melia – EtOH 70% (1:1)	2.15 ± 0.61a	14.30 ± 2.30ab	44.15 ± 6.99a
Extracto de Melia	1.65 ± 0.32a	10.50 ± 1.84b	26.60 ± 5.22ab
Ext. Melia – H <sub>2</sub> O (1:1)	2.70 ± 0.57a	19.10 ± 2.42a	46.30 ± 6.30a
Ext. Melia – H <sub>2</sub> O (1:9)	2.60 ± 0.28a	09.20 ± 1.82b	16.80 ± 3.92b

N=20; media ± ES; Las diferencias significativas se representan con letras (Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn,  $p < 0.05$ )

#### 4.2.2 Proliferación de raíz

Durante la evaluación de número de raíces por diente a los 10 días no hubo diferencias significativas entre los tratamientos (Tabla 4). Sin embargo, este patrón de crecimiento vario y mantuvo la misma tendencia a los 20 y 30 días. Siendo el tratamiento con mayor proliferación de raíces el Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1) siendo significativamente superior a los demás tratamientos.

**Tabla 4:** Impacto de los tratamientos en la proliferación de raíces

Tratamientos	Número de raíces por bulbillo (unid)		
	Día 10	Día 20	Día 30
HgCl 0.1% (Control 1)	0.0 ± 0.0a	1.00 ± 0.50b	06.90 ± 1.05b
EtOH 70% (Control 2)	0.0 ± 0.0a	0.85 ± 0.53b	06.15 ± 1.46b
Ext. Melia – EtOH 70% (1:1)	0.0 ± 0.0a	1.75 ± 0.61b	06.75 ± 1.18b
Exttracto de Melia	0.0 ± 0.0a	1.55 ± 0.60b	06.00 ± 1.11b
Ext. Melia – H <sub>2</sub> O (1:1)	0.1 ± 0.1a	5.35 ± 0.63a	12.70 ± 1.36a
Ext. Melia – H <sub>2</sub> O (1:9)	0.0 ± 0.0a	1.45 ± 0.58b	03.60 ± 1.41b

N=20; media ± ES; Las diferencias significativas se representan con letras (Kruskal-Wallis con la prueba post hoc de Dunn,  $p < 0.05$ )

### 4.3 ANÁLISIS METABOLÓMICO DEL EXTRACTO DE *M. azedarach* L.

Los resultados observados en la figura 9, muestran presencias de patógenos diferentes tanto en hongos como en bacterias en los diversos tratamientos, por ello, se realizó un análisis metabolómico no dirigido a los dos tratamientos con mejores resultados y poder dar así una mejor explicación a la diferencia entre estos. Se encontraron cerca de 100 compuestos, sin embargo, para la presente investigación solo se ha enfocado en los más abundantes y al no poseer unidades fueron expresados como abundancia relativa (área de pico).

La Tabla 5 muestra los resultados de los metabolitos encontrados en Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1) y Extracto de Melia – EtOH 70% (1:1), estos metabolitos poseen diferentes propiedades: antifúngico (Phacidin (Funk y Mc Mullan 1974) y Terbinafine (Bueno et al, 2009)), antibacteriano y antifúngico (Chalcone) (Singh et al, 2014), antioxidante (Cyanidin-3,5-di-O-glucoside (Sritalahareuthai et al, 2020) y Cyanidin (Kim et al, 2010)), antihelmínticos (Albendazole (Kamaraj et al, 2010) y Oxamniquine (McCarthy y Moore, 2014)), antihistamínicos (Desloratadine) (Keerthana y Vidyavathi, 2018), antiinflamatorio (Austri cine) (Sreeja et al, 2018), uterotónicos (Ergonovine (Balki et al, 2014) y Methylergometrine (Sharma et al, 2014)), antiviral (3-Glu-7-Rha Quercetin) (Kim et al, 2013), antihipersentivo (Fosinopril) (Angulo et al, 2002), nutriente esencial en el metabolismo humano ayudando a mantener la estructura de las membranas celulares y tiene funciones en la señalización celular y como neurotransmisor (Choline) (Nakano et al, 2013), biomarcador de exposición a chlorine (3-Chloro-L-tyrosine) (Nishio et al, 2020), generador de depresión respiratoria (Norbuprenorphine) (Ohtani et al, 1997) y ácido hidroxi-graso (16-Hydroxyhexadecanoic acid) (Aparaschivei et al, 2016). Además, los solventes de extracción y de dilución afectan el contenido de compuestos fitoquímicos y sus actividades biológicas como antibiótico o antioxidante (Felhi et al., 2016), esto explica la relación de mayor abundancia relativa de los compuestos: Phacidin, Cyanidin-3,5-di-O-glucoside, Norbuprenorphine, Chalcone, Cyanidin, Ergonovine, 3-Chloro-L-tyrosine, Austri cine y Albendazole en el Extracto de Melia diluido con H<sub>2</sub>O versus el Extracto de Melia diluido con Etanol al 70%.

**Tabla 5:** Abundancia relativa del Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1) y Extracto de Melia – EtOH 70% (1:1) obtenidos por UHPLC-MS

Pico	Compuesto	Masa	RT	Ext. de Melia – H <sub>2</sub> O (1:1)	Ext. de Melia – EtOH 70% (1:1)
1	Choline	104.1075	0.29	91.81E+06	99.91E+06
2	3-Chloro-L-tyrosine	215.0349	0.31	25.27E+06	24.54E+06
3	Austricine	262.1205	0.35	73.11E+06	68.17E+06
4	Albendazole	265.0885	0.45	49.26E+06	48.69E+06
5	Phacidin	294.1467	0.50	368.73E+06	274.14E+06
6	Desloratadine	310.1237	0.65	0.45E+06	72.61E+06
7	Chalcone	208.0888	4.41	65.57E+06	65.16E+06
8	3-Glu-7-Rha Quercetin	610.1534	4.49	29.49E+06	43.99E+06
9	Cyanidin-3,5-di-O-glucoside	611.1612	4.50	102.21E+06	0.11E+06
10	Cyanidin	287.0556	5.39	188.09E+06	165.88E+06
11	Terbinafine	291.1987	10.5	27.56E+06	28.83E+06
12	Oxamniquine	279.1583	14.69	29.50E+06	31.25E+06
13	Ergonovine	325.1790	17.56	57.66E+06	38.61E+06
14	Methylergometrine	339.1992	18.94	39.17E+06	31.85E+06
15	16-Hydroxyhexadecanoic acid	272.2307	18.98	6.45E+06	30.74E+06
16	Fosinopril	563.3012	22.46	2.18E+06	122.63E+06
17	Norbuprenorphine	413.2566	22.61	32.52E+06	26.19E+06

RT = Tiempo de retención (minutos)

Phacidin es un antifúngico producido por el ascomiceto *Potebniomyces balsamicola* var. *Boycei*, su eficacia ha sido probada contra hongos (*Saccharomyces*, *Alternaria*, *Penicillium*, *Trichoderma*), pseudohongos (*Phytophthora* y *Pythium*) y levaduras (*Candida*) (Funk y Mc Mullan 1974). Este metabolito presentó mayor abundancia relativa en el Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1) con respecto al Extracto de Melia – EtOH 70% (1:1), y a su vez es el compuesto con mayor abundancia (Tabla 5). Lo detectado en la cromatografía tiene congruencia con los resultados obtenidos en la figura 9, donde no hubo contaminación por hongos en sus respectivos tratamientos.

Terbinafine es un antimicótico de la familia alilamina y actúa inhibiendo la síntesis de ergosterol. Hasta antes de 2017 este compuesto se producía de manera sintética, sin embargo, hoy en día se ha encontrado de manera natural en la actinobacteria *Streptomyces* (Abdel-Kader y Muharram, 2017) y ha sido reportado como una bacteria endófito del género *Melia* (Zhao, 2018). Otro metabolito de esta actinobacteria es 3-Chloro-L-tyrosine siendo utilizado como indicador de envenenamiento por chlorine en autopsias. (Nishio et al, 2020). La

abundancia relativa de este antifúngico es ligeramente superior en el Extracto de Melia – EtOH 70% (1:1) versus Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1), este compuesto también ha tenido un rol importante en la desinfección de los explantes (Figura 9) porque se ha reportado su efecto contra hongos del género *Fusarium* y *Tricophyton* (Bueno et al, 2009) que no han sido probados contra Phacidin.

Chalcone tiene una distribución generalizada en el reino Plantae y es una estructura química simple (Zhuang et al, 2017). Ciertos derivados naturales o sintéticos de chalcone han demostrado tener efectos antifúngicos sobre *Aspergillus*, *Candida* y efectos antibacterianos sobre *Aerogenes*, *Pseudomonas* (Singh et al, 2014), *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Micrococcus*, *Escherichia*, *Helicobacter*, cepas de bacterias anaeróbicas, incluso en cepas farmacorresistentes, siendo un potente inhibidor generalmente de las bacterias Gram-positiva (Ni et al, 2004). En la figura 9 se observa la presencia solo de bacteria Gram-negativa en el tratamiento con Extracto de Melia – Etanol al 70% (1:1) y sin bacterias en Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1), esto tiene relación con la abundancia relativa de Chalcone mostrado en la Tabla 5, donde el metabolito en Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1) es levemente superior a comparación del Extracto de Melia – Etanol al 70% (1:1).

#### 4.4 CARACTERIZACIÓN DE PATÓGENOS

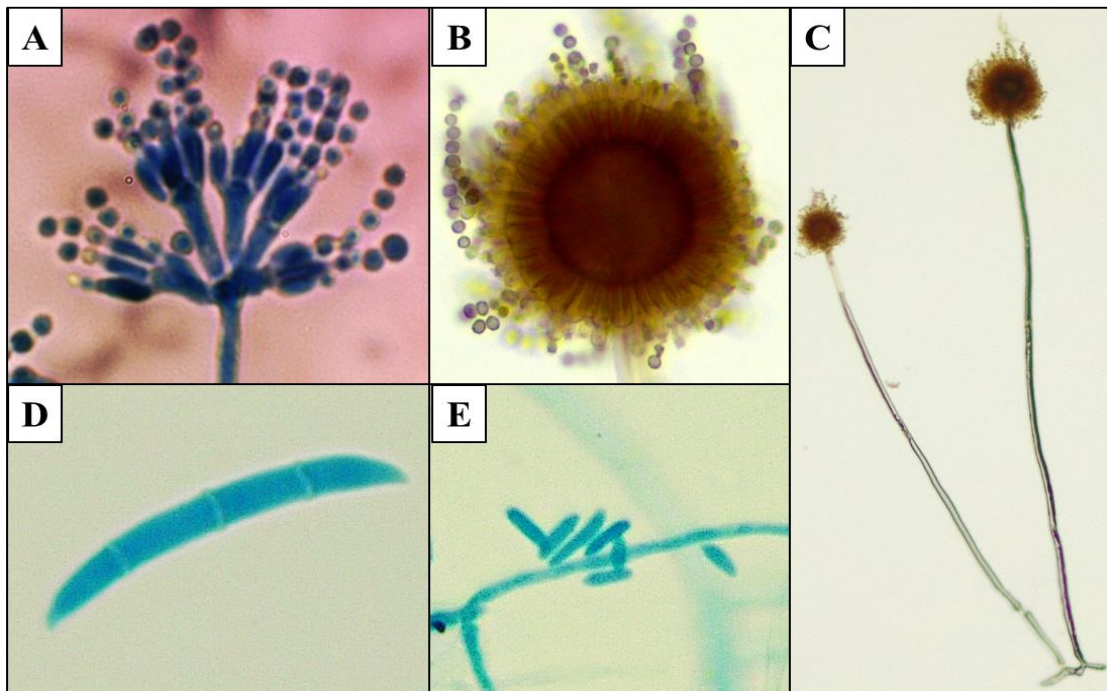
##### a. Hongos

De los 12 hongos aislados, 7 fueron del género *Penicillium*, 4 de *Fusarium* y 1 de *Aspergillus* (Figura 11). Las características de los hongos para identificar el género propuesto por Barnett y Hunter (1986) fueron los siguientes:

**Penicillium:** Micelio septado, conidióforos que surgen del micelio solos, ramificados cerca del ápice, terminados en fiálides y dispuestas estrechamente en una cabeza en forma de cepillo, conidias hialinas o de colores brillantes en cadenas basípetas, unicelulares, en su mayoría globosos u ovoides (Figura 11A).

**Aspergillus:** Micelio septado, conidióforos erectos, simples, vesícula globosa o hinchazón clavada, portando fiálides en el ápice o irradiando desde toda la superficie; conidias unicelulares, en cadenas basípetas, globosos, a menudo de diferentes colores en masa (Figura 11B y 11C).

**Fusarium:** Micelio extenso y algodonoso en cultivo, a menudo con algún tinte de rosa, violeta o amarillo, en el micelio o medio; conidióforos variables, delgados y simples, o robustos, cortos, de irregularidad ramificada o con un verticilo de fiálides, solos o agrupados en esporodocios; macroconidias de varias células ligeramente curvados o doblados en los extremos puntiagudos, típicamente en forma de canoa; microconidios unicelulares, ovoides u oblongos, solos o encadenados (Figura 11D y 11E).

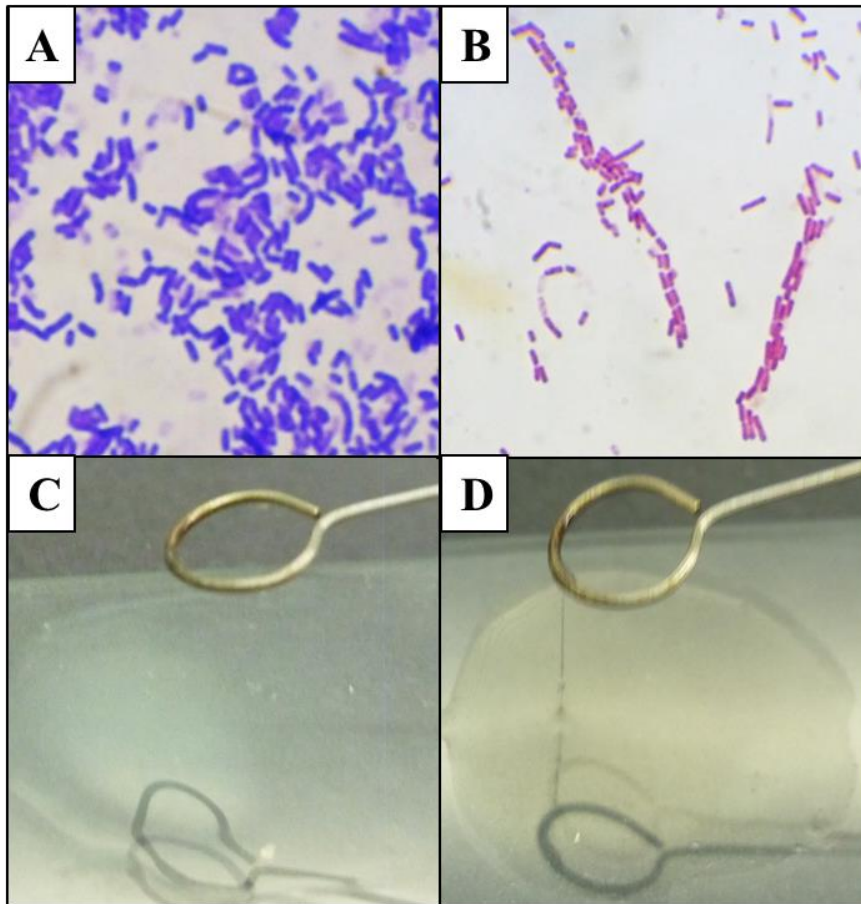


**Figura 11:** Características morfológicas microscópicas de hongos.

A. *Penicillium*: Conidióforo, métulas con fiálides y conidias en cadena, B. *Aspergillus*: Vesícula, fiálides y conidias en cadenas, C. Conidióforo de *Aspergillus*, D. Macroconidia de *Fusarium*, E. Microconidias de *Fusarium*.

## b. Bacterias

La tinción Gram en las 10 bacterias aisladas mostró que el 50% presentó la coloración violeta (Gram-positiva) debido a su capa gruesa de peptidoglucano (Figura 12A) y el resto la coloración rojiza (Gram-negativa) por su capa delgada de peptidoglucano (Figura 12B). Esto se corroboró con la prueba de KOH, quien destruye la pared celular delgada de algunas bacterias y al entrar en contacto con el ADN se forma una viscosidad, confirmando 5 bacterias Gram-positiva (no viscoso) (Figura 12C) y 5 Gram-negativa (viscoso) (Figura 12D).



**Figura 12:** Tinción Gram y prueba de KOH en bacterias.

A. Tinción violeta (Gram-positiva), B. Tinción roja (Gram-negativa), C. Sin presencia de hebra (Gram-positiva), D. Con presencia de hebra (Gram-negativa).



## V. CONCLUSIONES

1. Se encontró efecto desinfectante de los tratamientos utilizando la *Melia azedarach* L. en el cultivo *in vitro* de explantes de ajo. El tratamiento Extracto de Melia – H<sub>2</sub>O (1:1) dio el mejor resultado.
2. El uso del extracto de *Melia azedarach* L. tuvo efecto en el desarrollo del brote y raíces, manifestándose a partir de los 20 días después de la introducción de los explantes *in vitro*.
3. Se lograron identificar y elegir 17 metabolitos que superan los  $25 \times 10^6$  de abundancia relativa en los extractos utilizados entre ellos, los antimicóticos (Phacidin y Terbinafine) y el antibiótico y antifúngico (Chalcone).
4. Hongos del género *Penicillium*, *Fusarium* y *Aspergillus* y bacterias Gram-positiva y Gram-negativa fueron identificados como microorganismos contaminantes en el cultivo de tejidos de ajo.

## VI. RECOMENDACIONES

1. Investigar la eficiencia del Extracto de *Melia* en el medio de cultivo de tejidos y en diversos tipos de explantes.
2. Estudiar la actividad antimicrobiana del Extracto de *Melia* frente a hongos y bacterias de interés fitosanitario.
3. Hacer un análisis metabolómico dirigido en algunos de los compuestos de interés mostrados en la presente investigación.
4. Realizar más estudios del extracto de *Melia azedarach* para identificar su poder antioxidante, debido a la presencia de flavonoides (Cyanidin-3,5-di-O-glucoside y Cyanidin)
5. Determinar el perfil metabólico de hojas, frutos, corteza, flores y raíces del árbol *Melia azedarach* L. extraídos con diferentes solventes.
6. Promover estudios de bioprospección a nivel metabolómico que permita potenciar el uso y valor de la gran diversidad de plantas nativas, y para ello se requiere de una plataforma metabolómica no dirigida nacional.

## VII. REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdel-Kader, M., & Muharram, M. (2017). New microbial source of the antifungal allylamine "Terbinafine". *Saudi pharmaceutical journal: SPJ: the official publication of the Saudi Pharmaceutical Society*, 25(3), 440–442.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jsps.2016.06.006>
- Agraria.pe. (2018) Exportaciones de ajos cerraron el año pasado en más de US\$ 11.6 millones. (5 jul 2018). Recuperado de: <http://agraria.pe/noticias/exportaciones-de-ajos-cerraron-el-ano-pasado-en-mas-de-us-11-15975>
- Akacha, M., Lahbib, K., Daami-Remadi, M., & Boughanmi, N. (2016). Antibacterial, antifungal and anti-inflammatory activities of *Melia azedarach* ethanolic leaf extract. *Bangladesh Journal of Pharmacology*, 11(3), 666-674.  
Doi: <https://doi.org/10.3329/BJP.V11I3.27000>
- Alché, L., Ferek, G.A., Meo, M., Coto, C., & Maier, M. (2003). An Antiviral Meliacarpin from Leaves of *Melia azedarach* L. *Zeitschrift für Naturforschung C*, 58(3-4), 215-219. Doi: <https://doi.org/10.1515/znc-2003-3-413>
- Aneja, K.R. (2007). *Experiments in Microbiology, Plant Pathology and Biotechnology*. 4th edition.
- Angulo, E., Robles, N. R., Grois, J., Barquero, A., & Pérez Miranda, M. (2002). Comparación de la actividad antihipertensiva de fosinopril e irbesartan [Comparison of the antihypertensive activity of fosinopril and irbesartan]. *Anales de medicina interna (Madrid, Spain: 1984)*, 19(11), 571–575.
- Aparaschivei, D., Todea, A., Păușescu, I., Badea, V., Medeleanu, M., Șișu, E., Puiu, M., Chiriță-Emandi, A., & Peter, F. (2016). Synthesis, characterization and enzymatic degradation of copolymers of  $\epsilon$ -caprolactone and hydroxy-fatty acids. *Pure and Applied Chemistry*, 88(12), 1191-1201. Doi: <https://doi.org/10.1515/pac-2016-0920> .
- Balki, M., Erik-Soussi, M., Kingdom, J., & Carvalho, J.C. (2014). Comparative efficacy of uterotonic agents: *in vitro* contractions in isolated myometrial strips of labouring and non-labouring women. *Canadian journal of anaesthesia = Journal canadien d'anesthésie*, 61(9), 808–818.

Doi: <https://doi.org/10.1007/s12630-014-0190-1>

- Barnett, H.L. & Hunter, B.B. (1986). *Illustrated Genera of Imperfect Fungi*. 4th edition.
- Bueno, J.G., Martinez, C., Zapata, B., Sanclemente, G., Gallego, M., & Mesa, A.C. (2010). *In vitro* activity of fluconazole, itraconazole, voriconazole and terbinafine against fungi causing onychomycosis. *Clinical and experimental dermatology*, 35(6), 658–663. Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1365-2230.2009.03698.x>
- Burba, J.L. (2003). Producción de ajo. Documentos Proyecto Ajo/INTA - Documento 069. Estación Experimental Agropecuaria La Consulta.
- Cassells, A. (2012). Pathogen and biological contamination management in plant tissue culture: phytopathogens, vitro pathogens, and vitro pests. *Methods in molecular biology*, 877, 57-80. Doi: [https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4\\_6](https://doi.org/10.1007/978-1-61779-818-4_6)
- Causil V., L., Coronado G., J., Verbel M., L., Vega J., M., Donado E., K., & Pacheco G., C. (2017). Cytotoxic effect of sodium hypochlorite (NaClO) in apical cells of onion roots (*Allium cepa* L.). *Revista Colombiana De Ciencias Hortícolas*, 11(1), 97-104. Doi: <https://doi.org/10.17584/rcch.2017v11i1.5662>
- Costa Júnior, P.S., Cardoso, F.P., Martins, A.D., Teixeira Buttrós, V.H., Pasqual, M., Dias, D.R., Schwan, R.F., & Dória, J. (2020). Endophytic bacteria of garlic roots promote growth of micropropagated meristems. *Microbiological research*, 241, 126585. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.micres.2020.126585>
- FAO - Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura. (15 nov. 2017). Recuperado de: <http://www.fao.org/zhc/detail-events/es/c/452719/>
- Felhi, S., Baccouch, N., Ben Salah, H., Smaoui, S., Allouche, N., Gharsallah, N., & Kadri, A. (2016). Nutritional constituents, phytochemical profiles, *in vitro* antioxidant and antimicrobial properties, and gas chromatography–mass spectrometry analysis of various solvent extracts from grape seeds (*Vitis vinifera* L.). *Food Science and Biotechnology*, 25(6), 1537–1544. Doi: <https://doi.org/10.1007/s10068-016-0238-9>
- Fuentes, V., Granada, M., Lemes, C., Rodríguez, C. (2001). Estudios fenológicos en plantas medicinales XII. *Revista Cubana Plantas Medicinales*, 6(3): 87-90.
- Funk, A., & McMullan, E. (1974). Phacidin, a fungal growth inhibitor from *Potebniamyces balsamicola* var. *boycei*. *Canadian journal of microbiology*, 20(3), 422-425. Doi: <https://doi.org/10.1139/m74-066>
- García, L.J., & Sánchez-Muniz, F.J. (2000). Revisión: Efectos cardiovasculares del ajo (*Allium sativum*). *Archivos Latinoamericanos De Nutrición*, 50(3), 219-229.
- Hoffmann, A. (1995). *Los árboles urbanos de Chile*. Segunda Edición.

- ITIS. (2020a). Taxonomic Serial No.: 29024. (7 jul 2020). Recuperado de: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=29024#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=29024#null)
- ITIS. (2020b). Taxonomic Serial No.: 42652. (7 jul 2020). Recuperado de: [https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search\\_topic=TSN&search\\_value=42652#null](https://www.itis.gov/servlet/SingleRpt/SingleRpt?search_topic=TSN&search_value=42652#null)
- Kamaraj, C., Rahuman, A.A., Bagavan, A., Mohamed, M.J., Elango, G., Rajakumar, G., Zahir, A.A., Santhoshkumar, T., & Marimuthu, S. (2010). Ovicidal and larvicidal activity of crude extracts of *Melia azedarach* against *Haemonchus contortus* (Strongylida). *Parasitology research*, 106(5), 1071–1077.
- Doi: <https://doi.org/10.1007/s00436-010-1750-0>
- Keerthana, M., & Vidyavathi, M. (2018). Screening and evaluation of fungal resources for loratadine metabolites. *Journal of biosciences*, 43(5), 823–833.
- Doi: <https://doi.org/10.1007/s12038-018-9797-7>
- Khan, A.V., Khan, A.D., & Shukla, I. (2008). *In Vitro* Antibacterial Potential of *Melia azedarach* Crude Leaf Extracts Against Some Human Pathogenic Bacterial Strains. *Ethnobotanical Leaflets*, 12, 439-445.
- Khan, A. V., Ahmed, Q. U., Mir, M. R., Shukla, I., & Khan, A. A. (2011). Antibacterial efficacy of the seed extracts of *Melia azedarach* against some hospital isolated human pathogenic bacterial strains. *Asian Pacific journal of tropical biomedicine*, 1(6), 452–455. Doi: [https://doi.org/10.1016/s2221-1691\(11\)60099-3](https://doi.org/10.1016/s2221-1691(11)60099-3)
- Kim, J.E., Kwon, J.Y., Seo, S.K., Son, J.E., Jung, S.K., Min, S.Y., Hwang, M.K., Heo, Y.S., Lee, K.W., & Lee, H.J. (2010). Cyanidin suppresses ultraviolet B-induced COX-2 expression in epidermal cells by targeting MKK4, MEK1, and Raf-1. *Biochemical pharmacology*, 79(10), 1473–1482. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2010.01.008>
- Kim, H.J., Kim, B.G., & Ahn, J.H. (2013). Regioselective synthesis of flavonoid bisglycosides using *Escherichia coli* harboring two glycosyltransferases. *Applied microbiology and biotechnology*, 97(12), 5275–5282.
- Doi: <https://doi.org/10.1007/s00253-013-4844-7>
- Kumar, R., Singh, R., Meera, P., & Kalidhar, S. (2003). Chemical components and insecticidal properties of Bakain (*Melia azedarach* L.) – A review. *Agricultural Reviews*, 24(2), 101-115.

- Leifert, C., & Woodward, S. (1998). Laboratory contamination management: the requirement for microbiological quality assurance. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52(1-2), 83-88. Doi: <https://doi.org/10.1023/A%3A1005905604043>
- Leifert, C., & Cassells, A. (2001). Microbial hazards in plant tissue and cell cultures. *In Vitro Cellular & Developmental Biology - Plant*, 37, 133-138.  
Doi: <https://doi.org/10.1007/s11627-001-0025-y>
- McCarthy, J., & Moore, T. (2014). 42 – Drugs for Helminths. *Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases, 1*, 519-527.  
Doi: <https://doi.org/10.1016/B978-1-4557-4801-3.00042-4>
- MINAGRI. (2011). Agro al día. (5 jul 2018). Recuperado de: [http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/ajo/ajo\\_feb11.pdf](http://agroaldia.minagri.gob.pe/biblioteca/download/pdf/manuales-boletines/ajo/ajo_feb11.pdf)
- MINAGRI. (2018). Valor Bruto De La Producción Agropecuaria. Sistema Integrado de Estadísticas Agrarias. (5 jul 2018). Recuperado de: [http://siea.minag.gob.pe/siea/sites/default/files/vbp-enero18\\_060318.pdf](http://siea.minag.gob.pe/siea/sites/default/files/vbp-enero18_060318.pdf)
- Murashige, T., & Skoog, F.K. (1962). A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiologia Plantarum*, 15, 473-497.  
Doi: <https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1962.tb08052.x>
- Nakano, M., Tateishi-Karimata, H., Tanaka, S., & Sugimoto, N. (2014). Choline ion interactions with DNA atoms explain unique stabilization of A-T base pairs in DNA duplexes: a microscopic view. *The journal of physical chemistry. B*, 118(2), 379–389.  
Doi: <https://doi.org/10.1021/jp406647b>
- Navarro, M. (2007). Posibilidades terapéuticas del bulbo de ajo (*Allium sativum*). *Revista de fitoterapia*; 7(2), 132-151.
- Ni, L., Meng, C., & Sikorski, J. (2004). Recent advances in therapeutic chalcones. *Expert Opinion on Therapeutic Patents*, 14(12), 1669-1691.  
Doi: <https://doi.org/10.1517/13543776.14.12.1669>
- Nishio, T., Toukairin, Y., Hoshi, T., Arai, T., & Nogami, M. (2020). Determination of 3-chloro-L-tyrosine as a novel indicator of chlorine poisoning utilizing gas chromatography-mass spectrometric analysis. *Legal medicine (Tokyo, Japan)*, 47, 101782. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.legalmed.2020.101782>
- Ohtani, M., Kotaki, H., Nishitateno, K., Sawada, Y., & Iga, T. (1997). Kinetics of respiratory depression in rats induced by buprenorphine and its metabolite, norbuprenorphine. *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics*, 281(1), 428–433.

- Pagare, S., Bhatia, M., Tripathi, N., Pagare, S., & Bansal, Y.K. (2015). Secondary Metabolites of Plants and their Role: Overview. *Current Trends in Biotechnology and Pharmacy*, 9, 293-304.
- Pennington, T., Sarukán, J. (1998). Árboles tropicales de México. Segunda edición.
- Powers, E.M. (1995). Efficacy of the Ryu nonstaining KOH technique for rapidly determining gram reactions of food-borne and waterborne bacteria and yeasts. *Applied and environmental microbiology*, 61(10), 3756-3758.  
Doi: <https://doi.org/10.1128/aem.61.10.3756-3758.1995>
- Qiu, Z., Lu, X., Li, N., Zhang, M., & Qiao, X. (2018). Characterization of garlic endophytes isolated from the black garlic processing. *MicrobiologyOpen*, 7(1), e00547. Doi: <https://doi.org/10.1002/mbo3.547>
- Rhaymah, M. (2006). Anticomplementary activities of aqueous extract of the fruit of *Melia azedarach* and *Cotoneaster prostratae* in rats. *Journal of Animal and Veterinary Advances*, 5(3), 197-199.
- Roca, W., Mroginski, L. (1993). Cultivo de tejidos en la agricultura: Fundamentos y aplicaciones. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT).
- Roig, T. (1974). Plantas medicinales, aromáticas o venenosas de Cuba.
- Sen, A., Batra, A. 2012a. Chemical composition of methanol extract of the leaves of *Melia azedarach* L. *Asian Journal of Pharmaceutical and Clinical Research*, 5(3), 42-45.
- Sen, A., Batra, A. 2012b. Evaluation of antimicrobial activity of different solvent extracts of medicinal plant: *Melia azedarach* L. *International Journal of Current Pharmaceutical Research*, 4(2), 67-73.
- Sharma, M., Kaur, P., Kaur, K., Kaur, A., Kaur, P.K., Kaur, M.M. (2014) A comparative study of oxytocin/misoprostol/methylergometrine for active management of the third stage of labor. *The Journal of Obstetrics and Gynecology of India*, 64(3):175-179. Doi: <https://doi.org/10.1007/s13224-014-0512-9>
- Singh, P., Anand, A., & Kumar, V. (2014). Recent developments in biological activities of chalcones: A mini review. *European journal of medicinal chemistry*, 85, 758–777. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.ejmech.2014.08.033>
- Singh, C. (2018). Review on Problems and its Remedy in Plant Tissue Culture. *Asian Journal of Biological Sciences*, 11(4), 165-172.  
Doi: <https://doi.org/10.3923/AJBS.2018.165.172>
- Smith, A.C., & Hussey, M.A. (2005). Gram Stain Protocols.

- Sreeja, P.S., Arunachalam, K., Martins, D., Lima, J., Balogun, S.O., Pavan, E., Saikumar, S., Dhivya, S., Kasipandi, M., & Parimelazhagan, T. (2018). *Sphenodesme involucrata* var. *paniculata* (C.B. Clarke) Munir.: Chemical characterization, anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of methanol extract of leaves. *Journal of ethnopharmacology*, 225, 71–80. Doi: <https://doi.org/10.1016/j.jep.2018.06.035>
- Sritalahareuthai, V., Temviriyankul, P., On-Nom, N., Charoenkiatkul, S., & Suttisansanee, U. (2020). Phenolic Profiles, Antioxidant, and Inhibitory Activities of *Kadsura heteroclita* (Roxb.) Craib and *Kadsura coccinea* (Lem.) A.C. Sm. *Foods*, 9, 1222. Doi: <https://doi.org/10.3390/foods9091222>
- Vanzela, D.O., Massi, F.P., de Oliveira, A.L., Fungaro, M.H., & Sartori, D. (2020). Isolation and Identification of *Aspergillus* Section *Nigri*, and Genotype Associated with Ochratoxin A and Fumonisin B<sub>2</sub> Production in Garlic Marketed in Brazil. *Current Microbiology*, 77, 1150 - 1158. Doi: <https://doi.org/10.1007/s00284-020-01915-6>
- Wachsman, M., Castilla, V., & Coto, C. (1998). Inhibition of foot and mouth disease virus (FMDV) uncoating by a plant-derived peptide isolated from *Melia azedarach* L. leaves. *Archives of Virology*, 143(3), 581-590.  
Doi: <https://doi.org/10.1007/s007050050314>
- Wang, J., Shi, L., Wang, D., Li, L., Loake, G.J., Yang, X., & Jiang, J. (2019). White rot disease protection and growth promotion of garlic (*Allium sativum*) by endophytic bacteria. *Plant Pathology*. Doi: <https://doi.org/10.1111/ppa.13066>
- Zhuang, C., Zhang, W., Sheng, C., Zhang, W., Xing, C., & Miao, Z. (2017). Chalcone: A Privileged Structure in Medicinal Chemistry. *Chemical reviews*, 117(12), 7762–7810. Doi: <https://doi.org/10.1021/acs.chemrev.7b00020>



## VIII. ANEXOS

### Anexo 1: Composición de las sales del Medio de cultivo Murashige & Skoog (1962)

COMPUESTO	FORMULA QUÍMICA	DOSIS (mg/L)
Nitrato de amonio	$\text{NH}_4\text{NO}_3$	1650.000
Nitrato de potasio	$\text{KNO}_3$	1900.000
Cloruro de calcio dihidratado	$\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	440.000
Sulfato de magnesio heptahidratado	$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	370.000
Fosfato de potasio monobásico	$\text{KH}_2\text{PO}_4$	170.000
Ácido bórico	$\text{H}_3\text{BO}_3$	6.200
Sulfato de manganeso tetrahidratado	$\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$	22.300
Sulfato de zinc heptahidratado	$\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	8.600
Ioduro de potasio	$\text{KI}$	0.830
Molibdato de sodio dihidratado	$\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.250
Sulfato de cobre pentahidratado	$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0.025
Cloruro de cobalto hexahidratado	$\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$	0.025

### Anexo 2: Composición del PDA

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
Infusión de papa (proveniente de 200 gr de papa)	4 gr/L
Dextrosa	20 gr/L
Agar	17 gr/L

### Anexo 3: Composición del Agar Nutritivo

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
Extracto de carne	3 gr/L
Peptona	5 gr/L
Agar	15 gr/L

**Anexo 4: Composición del Caldo Nutritivo**

COMPUESTO	CONCENTRACIÓN
Extracto de carne	3 gr/L
Peptona	5 gr/L

**Anexo 5: Ensayo preliminar para identificar el tiempo de inmersión**

Tabla 5.1. Prueba de normalidad

Shapiro-Francia normality test						
W = 0.5529			p-value = 0.0000000001529			
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''	1

Tabla 5.2. Prueba de homogeneidad de varianzas

Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")				
group	Df	F value	Pr(>F)	Signif.
	5	1.512	0.2015	.
	114			

Tabla 5.3. Prueba de no paramétrica

Kruskal-Wallis rank sum test		
Kruskal-Wallis chi-squared = 39.719	df = 5	p-value = 0.0000001701

Tabla 5.4. Prueba de comparaciones múltiples

**Pairwise comparisons using Dunn's-test for multiple comparisons of independent simples, p-values adjusted with the Benjamini-Hochberg method**

Comparison	P.adj	Signif.
T2 (10 min) - T2 (15 min)	0.0000414	***
T2 (10 min) - T2 (30 min)	0.0000025	***
T2 (15 min) - T2 (30 min)	0.8910171	
T2 (10 min) - T4 (15 min)	0.0000034	***
T2 (15 min) - T4 (15 min)	1.0000000	
T2 (30 min) - T4 (15 min)	1.0000000	
T2 (10 min) - T4 (30 min)	0.0000051	***
T2 (15 min) - T4 (30 min)	1.0000000	
T2 (30 min) - T4 (30 min)	1.0000000	
T4 (15 min) - T4 (30 min)	1.0000000	
T2 (10 min) - T0 (10 min)	0.0000007	***
T2 (15 min) - T0 (10 min)	1.0000000	
T2 (30 min) - T0 (10 min)	1.0000000	
T4 (15 min) - T0 (10 min)	1.0000000	
T4 (30 min) - T0 (10 min)	1.0000000	

**Anexo 6:** Conservación de bacterias

En un tubo de polipropileno con 5 mL de Caldo Nutritivo se introduce una colonia de bacteria, luego es llevado a baño maría a 37 °C y en movimiento por 12 horas para su multiplicación. Después, en un vial con 1 mL de glicerol al 50%, se le adiciona 1 mL de caldo con bacteria, rápidamente se agita para mezclar e inmediatamente se sumerge en nitrógeno líquido. Finalmente es almacenado a -80 °C para su conservación.

**Anexo 7:** Desinfección de los explantes

Tabla 7.1. Prueba de normalidad

<b>Shapiro-Francia normality test</b>						
W = 0.7646		p-value = 6.342E-11				
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''	1

Tabla 7.2. Prueba de homogeneidad de varianzas

<b>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")</b>				
group	Df	F value	Pr(>F)	Signif.
	5	4.0315	0.002094	**
	114			

Tabla 7.3. Prueba de no paramétrica

<b>Kruskal-Wallis rank sum test</b>		
Kruskal-Wallis chi-squared = 45.702	df = 5	p-value = 0.00000001044

Tabla 7.4. Prueba de comparaciones múltiples

**Pairwise comparisons using Dunn's-test for multiple comparisons of independent simples, p-values adjusted with the Benjamini-Hochberg method**

Comparison	P.adj	Signif.
T0 - T1	0.4193192153748	
T0 - T2	0.5825080222986	
T1 - T2	0.7138262771557	
T0 - T3	0.7687359907830	
T1 - T3	0.6472311358873	
T2 - T3	0.8327973233483	
T0 - T4	1.0000000000000	
T1 - T4	0.4892057512706	
T2 - T4	0.7281350278732	
T3 - T4	0.9085061709254	
T0 - T5	0.0000001542894	***
T1 - T5	0.0000482789860	***
T2 - T5	0.0000078388086	***
T3 - T5	0.0000011346547	***
T4 - T5	0.0000003085787	***

**Anexo 8:** Hoja evaluación día 10

Tabla 8.1. Prueba de normalidad

<b>Shapiro-Francia normality test</b>						
W = 0.8748			p-value = 0.0000001182			
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''	1

Tabla 8.2. Prueba de homogeneidad de varianzas

<b>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")</b>				
	Df	F value	Pr(>F)	Signif.
group	5	2.5514	0.03153	*
	114			

Tabla 8.3. Prueba de no paramétrica

<b>Kruskal-Wallis rank sum test</b>		
Kruskal-Wallis chi-squared = 39.719	df = 5	p-value = 0.1088

**Anexo 9:** Hoja evaluación día 20

Tabla 9.1. Prueba de normalidad

<b>Shapiro-Francia normality test</b>						
W = 0.94974			p-value = 0.0004147			
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''	1

Tabla 9.2. Prueba de homogeneidad de varianzas

<b>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")</b>				
	Df	F value	Pr(>F)	Signif.
group	5	3.0266	0.01329	*
	114			

Tabla 9.3. Prueba de no paramétrica

<b>Kruskal-Wallis rank sum test</b>		
Kruskal-Wallis chi-squared = 14.709	df = 5	p-value = 0.01168

Tabla 9.4. Prueba de comparaciones múltiples

**Pairwise comparisons using Dunn's-test for multiple comparisons of independent simples, p-values adjusted with the Benjamini-Hochberg method**

Comparison	P.adj	Signif.
T0 - T1	0.38552756	
T0 - T2	0.86087937	
T1 - T2	0.46084912	
T0 - T3	0.31116255	
T1 - T3	0.79987053	
T2 - T3	0.33341675	
T0 - T4	0.02822063	*
T1 - T4	0.23323186	
T2 - T4	0.03243027	*
T3 - T4	0.28061348	
T0 - T5	0.80243497	
T1 - T5	0.31818206	
T2 - T5	0.71361926	
T3 - T5	0.24218162	
T4 - T5	0.01508836	*

**Anexo 10:** Hoja evaluación día 30

Tabla 10.1. Prueba de normalidad

<b>Shapiro-Francia normality test</b>						
W = 0.94876			p-value = 0.0003608			
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''	1

Tabla 10.2. Prueba de homogeneidad de varianzas

<b>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")</b>				
group	Df	F value	Pr(>F)	Signif.
	5	1.8419	0.1102	
	114			

Tabla 10.3. Prueba de no paramétrica

<b>Kruskal-Wallis rank sum test</b>		
Kruskal-Wallis chi-squared = 20.548	df = 5	p-value = 0.0009858

Tabla 10.4. Prueba de comparaciones múltiples

**Pairwise comparisons using Dunn's-test for multiple comparisons of independent simples, p-values adjusted with the Benjamini-Hochberg method**

Comparison	P.adj	Signif.
T0 - T1	0.947483884	
T0 - T2	0.156128044	
T1 - T2	0.186205101	
T0 - T3	0.893299562	
T1 - T3	0.899726878	
T2 - T3	0.134688049	
T0 - T4	0.766508774	
T1 - T4	0.702482214	
T2 - T4	0.052872089	
T3 - T4	0.819871030	
T0 - T5	0.008460154	**
T1 - T5	0.010323427	*
T2 - T5	0.297251759	
T3 - T5	0.007961532	**
T4 - T5	0.002996952	**

**Anexo 11: Raíz evaluación día 10**

Tabla 11.1. Prueba de normalidad

<b>Shapiro-Francia normality test</b>						
W = 0.13484			p-value < 2.2E-16			
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''	1

Tabla 11.2. Prueba de homogeneidad de varianzas

<b>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")</b>				
group	Df	F value	Pr(>F)	Signif.
	5	1	0.4211	
	114			

Tabla 11.3. Prueba de no paramétrica

<b>Kruskal-Wallis rank sum test</b>		
Kruskal-Wallis chi-squared = 5	df = 5	p-value = 0.4159

**Anexo 12:** Raíz evaluación día 20

Tabla 12.1. Prueba de normalidad

<b>Shapiro-Francia normality test</b>						
W = 0.79019			p-value = 2.811E-10			
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''	1

Tabla 12.2. Prueba de homogeneidad de varianzas

<b>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")</b>				
group	Df	F value	Pr(>F)	Signif.
	5	0.8974	0.4855	
	114			

Tabla 12.3. Prueba de no paramétrica

<b>Kruskal-Wallis rank sum test</b>		
Kruskal-Wallis chi-squared = 38.332	df = 5	p-value = 0.0000003236

Tabla 12.4. Prueba de comparaciones múltiples

**Pairwise comparisons using Dunn's-test for multiple comparisons of independent simples, p-values adjusted with the Benjamini-Hochberg method**

Comparison	P.adj	Signif.
T0 - T1	0.833549165157	
T0 - T2	0.633241109775	
T1 - T2	0.521409053009	
T0 - T3	0.443122411078	
T1 - T3	0.306232551998	
T2 - T3	0.745023618224	
T0 - T4	0.000002539836	***
T1 - T4	0.000001101776	***
T2 - T4	0.000064663433	***
T3 - T4	0.000371935449	***
T0 - T5	0.604107588879	
T1 - T5	0.490243198771	
T2 - T5	0.971631853014	
T3 - T5	0.775464651797	
T4 - T5	0.000073396521	***

**Anexo 13:** Raíz evaluación día 30

Tabla 13.1. Prueba de normalidad

<b>Shapiro-Francia normality test</b>						
W = 0.97226			p-value = 0.01562			
Signif. codes:	0 '***'	0.001 '**'	0.01 '*'	0.05 '.'	0.1 ''	1

Tabla 13.2. Prueba de homogeneidad de varianzas

<b>Levene's Test for Homogeneity of Variance (center = "median")</b>				
group	Df	F value	Pr(>F)	Signif.
	5	0.3853	0.858	
	114			

Tabla 13.3. Prueba de no paramétrica

<b>Kruskal-Wallis rank sum test</b>		
Kruskal-Wallis chi-squared = 25.218	df = 5	p-value = 0.0001265

Tabla 13.4. Prueba de comparaciones múltiples

**Pairwise comparisons using Dunn's-test for multiple comparisons of independent simples, p-values adjusted with the Benjamini-Hochberg method**

Comparison	P.adj	Signif.
T0 - T1	0.85630447920	
T0 - T2	0.85368614740	
T1 - T2	0.93664041640	
T0 - T3	0.87600608630	
T1 - T3	0.92899825361	
T2 - T3	0.92391409444	
T0 - T4	0.01503324860	*
T1 - T4	0.00557469067	**
T2 - T4	0.00652761639	**
T3 - T4	0.01144859734	*
T0 - T5	0.09836046366	
T1 - T5	0.22538082594	
T2 - T5	0.18470392845	
T3 - T5	0.12180123640	
T4 - T5	0.00001700527	***