Oaxaca de Juárez, Oaxaca a 30 de octubre del 2018.

Estimado Dr. Rafael Fernández Nava, Editor POLIBOTANICA, y revisores anónimos,

Tras realizar una cuidadosa revisión de nuestra propuesta de artículo, sobre la base de las sugerencias realizadas por los revisores, hemos procedido a su envío para una nueva evaluación.

Queremos manifestar nuestro más sincero agradecimiento a los revisores por su trabajo, sus anotaciones nos han permitido no solo mejorar significativamente el manuscrito sino también reflexionar sobre futuras investigaciones. A continuación detallamos cómo hemos atendido las sugerencias de los revisores en la nueva versión de nuestra propuesta de artículo. Esperamos que el trabajo realizado logre el visto bueno definitivo del Equipo Editorial de POLIBOTANICA. Si no fuese así, todos los autores estamos a su disposición para resolver cualquier cuestión o proceder con nuevas revisiones hasta donde fuese necesario.

Las modificaciones y comentarios de respuesta a los revisores se incluyen al final de esta carta, marcados en negrita, bajo las sugerencias de los revisores.

Atentamente.

Los autores.

Cabe resaltar que se realizaron todas las modificaciones de redacción solicitadas por los revisores 1,2 y 4 en los párrafos y subtítulos indicados por ellos en las observaciones específicas que muy acertadamente enviaron en el dictamen y el revisor 2 en un archivo por separado.

Los revisores 1 y 3 plantean revisar la traducción para verificar y mejorar la gramática y sintaxis del texto. Revisor 1 adjunta una traducción propuesta.

**En la presente versión del manuscrito hemos incluido el siguiente Abstract modificado, considerando gran parte de la traducción propuesta por el revisor 1.**

***Aspergillus parasiticus* and *A. niger* are two mycotoxin-producing fungi species, particularly aflatoxins and ochratoxins respectively. These toxins can cause diseases in humans and animals, in addition to substantial economic losses caused by the contaminating grain crops, cotton, dried fruits among other crops. In this study, we evaluate the effect of the garlic crude extract on the *in vitro* development of *Aspergillus parasiticus* and *A. niger* as a way to control the occurrence of these fungi on crops and other foods. The garlic crude extract (ECA) was elaborated by maceration using PBS pH 7.2 as solvent. The effect of the extract on the development of the fungi was evaluated by measuring of inhibition zones, puncture, colony forming units (CFU) and determination of minimum inhibitory concentration (MIC). The interaction of the garlic crude extract with the fungi was observed using visible light microscopy. The garlic crude extract induced inhibition zones of 12 mm in *A. parasiticus* and 15.5 mm for *A. niger*, it also inhibited growth in 13 and 46.8% respectively. The CMI for *A. parasiticus* was found to be the 1:2 dilution (50 μL of crude extract) and the 1:32 dilution (3.12 μL of crude extract) for *A. niger*. The treatment also inhibited the production of mycelium and sporulation of the two fungi especies.**

**The garlic crude extract showed antifungal activity against *A. parasiticus* and *A. niger*.**

Revisores 1,2 y 3 plantean hacer una revisión bibliográfica para actualizar y en donde los materiales vegetales utilizados, sean más cercanos al menos al género que se está trabajando en la investigación, que además constituirían una buena fuente de información para los antecedentes, la discusión y soporte de los resultados en este trabajo. El revisor 2 sugiere en especial incluir artículos de la Revista Iberoamericana de Micología.

**En la presente versión del manuscrito hemos incluido la siguiente bibliografía nueva, con el fin de satisfacer las sugerencias de los revisores, considerando los artículos sugeridos por el revisor 1 y la revista sugerida por el revisor 2.**

1. **Centeno, S., Calvo, M. A., Adelantado, C., & Figueroa, S. (2010). Antifungal Activity of Extracts of Rosmarinus officinalis and Thymus vulgaris against *Aspergillus flavus* and *A. ochraceus*. Pakistan Journal of Biological Sciences, 13(9), 452–455.**
2. **Corrales, I., & Reyes, J. (2016). Actividad Antimicrobiana y Antifúngica de *Allium sativum* en Estomatología. 16 de Abril, (254), 59–68.**
3. **Kyung, K. H. (2012). Antimicrobial Properties of *Allium* Species. *Current Opinion in Biotechnology*, *23*, 142–147. https://doi.org/10.1016/j.copbio.2011.08.004**
4. **Ledezma, E., & Apitz, R. (2006). Ajoene, el Principal Compuesto Activo Derivado del Ajo *(Allium sativum*), un Nuevo Agente Antifúngico. *Revista Iberoamericana de Micología*, *23*, 75–80.**
5. **Lora, C., Lujan, M., Robles, H., Saravia, V., & Cabeza, J. (2010). Efecto in vitro de Diferentes Concentraciones de *Allium sativum* (Ajo) Frente a Dermatofitos y *Candida albicans*. *UCV-Scientia*, *2*(2), 23–33.**
6. **Magro, A., Carolino, M., Bastos, M., & Mexia, A. (2006). Efficacy of Plant Extracts Against Stored Products Fungi. *Revista Iberoamericana de Micologìa*, *23*, 176–178.**
7. **Moctezuma Zárate, M., Pedraza Ramos, M., Cárdenas Gonzáles, J., Martinez Juárez, V., & Acosta Rodriguez, J. (2016). Efecto del ajo *(Allium sativum*) sobre el crecimiento de algunas especies de hongos. *Tlatemoani, Revista Académica de Investigación*.**
8. **Pundir, R. K., & Jain, P. (2010). Antimicrobial Activity of Allium sativum Ethanolic Extract against Food Associated Bacteria and Fungi. *Drug Invention Today*, *2*(4), 229–232.**
9. **Samuel, J. K., Andrews, B., & Jebashree, H. S. (2000). In vitro Evaluation of the Antifungal Activity of *Allium sativum* Bulb Extract against Trichophyton rubrum, a Human Skin Pathogen. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *16*, 617–620. https://doi.org/10.1023/A:1008972016316**
10. **Sandosskumar, R., Karthikeyan, M., Mathiyazhagan, S., Mohankumar, M., Chandrasekar, G., & Velazhahan, R. (2007). Inhibition of Aspergillus flavus Growth and Detoxification of Aflatoxin B1 by the Medicinal Plant Zimmu (*Allium sativum L. x Allium cepa L*.). *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, *23*, 1007–1014. https://doi.org/10.1007/s11274-006-9327-x**
11. **Tagoe, D. N. ., Nyarko, H. D., & Akpaka, R. (2011). A Comparison of the Antifungal Properties of Onion (*Allium cepa*), Ginger (*Zingiber officinale*) and Garlic (*Allium sativum*) against *Aspergillus flavus, Aspergillus niger* and *Cladosporium herbarum*. *Medicinal Plant*, *5*(3), 281–287. https://doi.org/10.3923/rjmp.2011.281.287**
12. **Tequida, M., Cortez, M., Rosas, E. C., López, S., & Corrales, C. (2002). Efecto de Extractos Alcohólicos de Plantas Silvestres Sobre la Inhibición de Crecimiento de *Aspergillus flavus , Aspergillus niger , Penicillium Fusarium moniliforme y Fusarium poae.* *Revista Iberoamericana de Micología*, *1*(6), 84–88.**
13. **Torres, J., & Romero, H. (2012). Actividad Antifúngica In vitro del Ajoeno en Cinco Aislamientos Clínicos de Histoplasma capsulatum var. capsulatum. *Revista Iberoamericana de Micologia*, *29*(1), 24–28. https://doi.org/10.1016/j.riam.2011.04.001**
14. **Villa, A., Pérez, R., Morales, H., Basurto, M., Soto, J., & Martínez, E. (2014). Situación Actual en el Control de *Fusarium spp*. y Evaluación de la Actividad Antifúngica de Extractos Vegetales. *Acta Agronòmica*, *64*(2), 194–205.** [**https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358**](https://doi.org/10.15446/acag.v64n2.43358)**.**

Los Revisores 1,3 y 4 plantean incluir las referencias de las técnicas empleadas y mejorar redacción, el revisor 2 sugiere nombrar las técnicas de punción y halos de inhibición como lo marca la referencia en la bibliografía citada.

**Tomando en cuenta lo planteado por los revisores se hicieron los ajustes de redacción y se incluyeron, las citas de la metodología planteada:**

**Moreno, S., González, L. M., Salcedo, S. M., Cárdenas, M. L., & Perales, A. (2011). Efecto Antifúngico de Extractos de Gobernadora (*Larrea tridentata L.)* sobre la Inhibición In vitro de *Aspergillus flavus* y *Penicillium SP*. Polibotánica, (32), 193–205.**

**Se modificaron los nombres de las técnicas de halos de inhibición y punción por técnica de pozo en agar y técnica de dilución del extracto en agar respectivamente.**

**Para los ensayos de Unidades Formadoras de Colonias (UFC) nos basamos en:**

**Dìaz, E. (2015). Evaluación del Efecto de la Interacción de las LectinasConcavalina A *y Dolichos biflorus* con *Aspergillus parasiticus*. Instituto Tecnológico de Oaxaca.**

Los revisores 1,2 y 4 plantean unificar las unidades ya sea en porcentaje o en ppm, el revisor 1 hace énfasis en describir como se conocen con certeza las concentraciones de los extractos. Además sugieren uniformizar las unidades de medida µL o µl.

**En la versión corregida del manuscrito se hace énfasis en que el extracto crudo concentrado se consideró una concentración del 100% y a partir de esa concentración se realizaron las otras concentraciones empleadas en los ensayos en % V/V, decidimos unificar las unidades en %. Se uniformizaron las unidades de medida en µL y utilizar un espacio entre las unidades de medida y los datos.**

Todos los revisores plantearon que la conclusión puede ser redactada de mejor manera y que responda de manera contundente al objetivo planteado.

**En la presente versión del manuscrito hemos modificado la redacción de la conclusión, esperando satisfacer las sugerencias de los revisores:**

***Allium sativum* inhibe el crecimiento de *A. flavus* y *A. niger* *in vitro*. Debido a que se trabajó con un extracto acuoso, se puede atribuir el efecto antifúngico a la presencia de alicina; se presentó un mayor efecto sobre *A. niger* en algunos de los ensayos.La concentración mínima inhibitoria para *A. parasiticus* se encontró en la dilución 1:2 y para *A. niger* en 1:32, y las concentraciones fungicidas se observaron en las concentraciones 1:2 y 1:16 respectivamente. Se demostró mediante microscopia que a mayor concentración de extracto crudo de ajo mayor inhibición de la producción de micelio y esporulación en comparación con el control. En general, el efecto de los extractos de ajo dependerá de su concentración, volumen, tipo de extracción y la especie de hongo a estudiar.**

Los revisores 1 y 4 proponen modificar los títulos de las tablas 1 y 2, además el revisor 2 propone agregar imágenes y quitar tablas, comentario que coincide con el revisor 1 quien solicita quitar la tabla 3 por lo que se anexaron las imágenes 1 y 2 .

**Considerando las propuestas de los revisores se cambiaron los títulos a:**

**Tabla 1. Valores promedio (mm) de los halos de inhibición de *A. parasiticus* y *A. niger* en respuesta a diferentes porcentajes de extracto crudo de ajo.**

**Tabla 2. Valores promedio (mm) del crecimiento radial de *A. parasiticus* y *A. niger* en respuesta a diferentes porcentajes de extracto crudo de ajo.**

**Imágenes agregadas:**

**Figura 1. Unidades Formadoras de Colonias de *A. parasiticus* después de 48 horas de incubación con extractos de ajo al a) 50%, b) 66%, c) 75%, d) 80%, e) 100% y f) control sin extracto.**

**Figura 2. Unidades Formadoras de Colonias de *A. niger* después de 48 horas de incubación con extractos de ajo al a) 50%, b) 66%, c) 75%, d) 80%, e) 100% y f) control sin extracto.**

Revisor 1 propone las siguientes modificaciones y observaciones:

El ajo es un bulbo perteneciente a la familia Liliaceae **(De acuerdo al ITIS, el ajo actualmente se encuentra ubicado dentro de la familia Amaryllidaceae)** que se caracteriza por tener un sistema radicular **(¿De qué tipo? Creo que falto un poco de descripción, o la coma está de más),** está compuesto de 6 a 12 bulbillos reunidos en una base por medio de una película delgada (Cordova, 2010; Bender y Bárcenas, 2013).

**Modificación: El ajo (*Allium sativum)* es un bulbo perteneciente a la familia Amaryllidaceae que se caracteriza por tener un sistema radicular constituido por una raíz bulbosa compuesta de 6 a 12 bulbillos, reunidos en su base por medio de una película delgada para formar la “cabeza del ajo” (Bender & Bárcenas, 2013; Còrdova, 2010),**

Material vegetal o ajo. **Con poner Material vegetal, está bien no es necesario o ajo. Eso ya se describe posteriormente).**

**Modificación: únicamente se dejó como subtítulo Material vegetal.**

Estudio *in vitro* de las propiedades antifúngicas del extracto de ajo. **Creo que en lugar de Estudio quedaría mejor la palabra evaluación, pues considero que estudio sería todo el proyecto y aquí está haciendo referencia a una etapa del mismo.**

**Modificación: Evaluación *in vitro* de las propiedades antifúngicas del extracto de ajo.**

Evaluación del efecto fungicida del extracto crudo de ajo. **Creo que este subtitulo sobra, pues lo que se describe se relaciona con la determinación de la CMI.**

**Modificación: Para determinar la concentración mínima inhibitoria, a partir de 100 μL de extracto crudo, en tubos Eppendorf, se realizaron diluciones seriadas con PBS (1:2, 1:4, 1:8, 1:16, 1:32, 1:64), posteriormente se agregaron 100 μL de una suspensión de esporas (1.5 x 106 esporas/mL) y 100 μL de Caldo Papa Dextrosa (CPD); los tubos se incubaron 48 h a 28 + 2°C. Se realizó microscopía de luz visible para confirmar la ausencia de crecimiento micelial. Para evaluar el efecto fungicida del extracto de ajo sobre los hongos, los tubos que no presentaron crecimiento micelial visible en la prueba de CMI, se lavaron con agua destilada estéril por centrifugación y las esporas se resuspendieron en 100 μL de agua destilada estéril, se inocularon en placas de PDA y se incubaron por seis días a 28 °C +2°C.**

Interacción del extracto crudo de ajo con los hongos. Se realizó la misma técnica descrita para determinar la CMI y después de 48 h de incubación se realizó microscopia de luz visible (**¿Cómo se realizó esto? Es necesario describir sobre que se hicieron las observaciones cuantas, en cuantos campos, etc, etc.)**

**Modificación: Se realizó la misma técnica descrita para determinar la CMI y después de 48 h de incubación se realizó la observación por microscopia de luz visible para identificar los cambios morfológicos de esporas y micelio, el ensayo se realizó por triplicado.**

Análisis estadístico (**Es necesario mencionar bajo que diseño experimental se realizaron los bioensayos).**  Se realizó un análisis de varianza (ANOVA) de un solo factor y una comparación de Tukey (p<0.05), utilizando el programa estadístico MINITAB (versión16).

**Modificación: Se utilizó un diseño experimental complemente al azar y se realizó un análisis de varianza (ANOVA****) de un solo factor. Además, se realizó una comparación de medias con la prueba de Tukey (p<0.05), utilizando el programa estadístico MINITAB (versión16).**

**Párrafo**: Resultados y Discusión (**Es necesario hacer un análisis de los resultados, con base en lo que arroja el análisis de varianza. Determinar los niveles de significancia entre cada uno de los tratamientos)**

**Modificación:**

1. **Técnica del pozo en agar: Los extractos crudos de ajo mostraron efecto inhibitorio sobre el crecimiento de *A. parasiticus* y *A. niger*, presentando halos de inhibición durante las 72 horas de incubación. El análisis de Tukey (p<0.05) indicó que al cabo de 72 de incubación existe diferencia significativa entre las medias de los resultados del extracto al 100% y las concentraciones al 50, 66 y 75 %. Por otro lado, todas las concentraciones muestran diferencia significativa con respecto al control.**
2. **Técnica de dilución del extracto en agar. En los ensayos de dilución del extracto en agar, El análisis de Tukey (p<0.05) indicó que al cabo de 144 de incubación existe diferencia significativa entre las medias de los resultados del extracto al 0.38 y 0.4% con respecto al control de A. parasiticus (Tabla 2),**

**Punción. En esta sección es necesario revisar los resultados mostrados en la tabla y reescribir los resultados.**  La concentración que inhibió en mayor porcentaje el crecimiento del hongo fue la de 4000 ppm **(En cuál de las especies?)** con 46.8% **Esta cifra no la veo en la tabla** (Tabla 2).

**Modificación: El crecimiento disminuyó en 10 y 13% con colonias de 69.6 y 66.8 mm respectivamente, después de 144 horas de incubación*.* Con *A. niger,* el extracto de ajo mostró una diferencia significativa en todas las concentraciones con respecto al control. La concentración que inhibió en mayor porcentaje el crecimiento del hongo fue la de 0.4% con un 46.8% con una colonia de 40.1 mm (Tabla 2).**

Revisor 4 propone las siguientes observaciones y modificaciones:

Respetuosamente sugiero el cambio del título por “Extractos crudos de *Allium sativum* sobre del desarrollo *in vitro* de *Aspergillus parasiticus* y *Aspergillus niger*. Ya que “Efecto” es redundante.

**Los autores consideramos que debido a que los otros tres revisores no hicieron alguna observación al título en ese sentido, se podría quedar como se envió originalmente**.

**Material vegetal o ajo:** Se utilizaron ajos (*Allium sativum*) cultivados en el municipio de San Jerónimo Tlacochahuaya perteneciente al estado de Oaxaca, México **(Época, orgánico convencional??, comprado en el mercado ¿?? Directo al productor ¿?? Es importante describir la procedencia de la materia prima ya que ésta puede determinar el contenido de aleloquímicos).**

**Modificación: Se utilizaron ajos (*Allium sativum*) obtenidos directamente del productor y cultivados entre enero y junio del 2017 en el municipio de San Jerónimo Tlacochahuaya, perteneciente al estado de Oaxaca, México.**

**Preparación de extracto:** Los dientes de ajo fueron pelados y macerados en un mortero de porcelana con PBS **[Significado entre paréntesis (PBS)]** pH 7.2 en relación 1:1 (p/v). Posteriormente el extracto se centrifugó por 10 min a 3000 rpm para quitar los sólidos disueltos. Se mantuvo en refrigeración hasta **(Falta mencionar Temperatura ¿?? Condiciones de almacenamiento Y tiempo de almacenamiento ya que muchos productos con el tiempo se pueden degradar)** su uso **(Mencionar si esta metodología ya está reportada…autores de la misma).**

**Modificación: El extracto de ajo se preparó al momento de realizar los ensayos y se mantuvo en refrigeración entre 4 y 10º C hasta su uso. Los dientes de ajo fueron pelados y macerados a temperatura ambiente en un mortero de porcelana con solución salina amortiguada por fosfatos (PBS) pH 7.2 en relación 1:1 (p/v), esta solución se consideró la concentración al 100% . Posteriormente el extracto se centrifugó por 10 min a 3000 rpm para quitar los sólidos disueltos.**